Određivanje koncentracije proteina-usporedba Bradford, Lowry i Buret metode

Sesar, Vedrana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:949058

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Vedrana Sesar

Određivanje koncentracije proteina i usporedba Bradford, Lowry i Biuret metode

Diplomski rad

Mentor:

doc. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić

Neposredni voditelj:

Jelena Brdarić, mag. edu. chem

Osijek, 2017.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Katarini Mišković-Špoljarić na vodstvu pri izradi ovog rada, te neposrednoj voditeljici Jeleni Brdarić na pomoći, trudu i satima posvećenim mom Diplomskom radu.

Najveće hvala mojoj roditeljima i sestrama Kristini i Mariji na svim odricanjima, razumijevanju i neizmjernoj podršci tijekom studiranja.

Hvala i mojim prijateljima i kolegama, posebno Tatjani Šafarik, Mariji Štajnbrikner, Mariji Škobić, Antoniji Đurin, Jeleni Bijelić, Ireni Kuliš i Tihani Njegovec, koje su mi uljepšali studentske dane i s kojima je sve bilo lakše.

I na kraju, hvala mom dečku Mateju na strpljenju i podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA I USPOREDBA BRADFORD, LOWRY I BIURET METODE

Vedrana Sesar

Rad je izrađen na: Odjel za kemiju
Mentor: Katarina Mišković-Špoljarić, doc. dr. sc.
Neposredni voditelj: Jelena Brdarić, mag. edu. chem.

Sažetak:
Određivanje koncentracije proteina u uzorku bitan je korak svake analize. Danas su poznate razne metode kvantifikacije proteina, ali klasične spektrofotometrijske metode, kao što su Biuret, Lowry i Bradford metoda, najčešće su korištene metode u biokemijskim i medicinskim istraživanjima. Sve metode imaju prednosti i nedostatke, a temelje se na reakciji metalnih iona i boja s proteinima, pri čemu nastaje produkt karakteristične boje čija se apsorbancija prati na određenoj valnoj duljini.. Mjerenje apsorbancije za Biuret metodu je na valnoj duljini od 540 nm, te na 595 nm za Lowry i Bradford metodu. Cilj ovoga rada je ispitati i usporediti osjetljivost Biuret, Lowry i Bradford metode za određivanje koncentracija proteina izoliranih iz humanih stanica karcinoma vrata maternice, poznatih pod nazivom HeLa stanice. Koncentracija proteina određena je i modificiranom Bradford metodom, gdje se za pripremu Bradford reagensa, umjesto CBB G-250 koristila CBB R-250. Najviše koncentracije proteina određene su modificiranom Bradford metodom, dok su korištenjem komercijalnog Bradford reagensa izmjerene najniže koncentracije.
Također, opisan je i metodički dio na temu „Aminokiseline i proteini“ za 4. razred srednje škole koji sadrži pisanu pripremu za nastavni sat, radni listić, te dva pokusa. Ova nastavna tema obrađuje se kombinacijom frontalnog rada i grupni rada (izvođenje predviđenih pokusa u 4 skupine).

Diplomski rad obuhvaća: *72* stranice, *25* slika, *8* tablica, *36* literaturnih navoda.
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: Biuret metoda/Bradford metoda/HeLa stanice/Lowry metoda/proteini
Rad prihvaćen: 5. rujna 2017.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:
1. Katarina Mišković-Špoljarić, doc. dr. sc.
2. Elvira Kovač-Andrić, doc. dr. sc.
3. Dajana Gašo-Sokač, doc. dr. sc.

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

DETERMINATION OF PROTEIN CONCENTRATION AND A COMPARISON OF BRADFORD, LOWRY AND BIURET METHODS

Vedrana Sesar

Thesis completed at: Department of Chemistry
Supervisor: Katarina Mišković-Špoljarić, doc. dr. sc.
Principal investigator: Jelena Brdarić, mag.edu.chem.

Abstract
Determination of protein concentration in a simple is a important step in every analysis. Today different methods for quantitation of protein are developed, but classic spectrophotometric methods, such as Biuret, Lowry i Bradford method, are the most often used in biochemical and medical research. All methods have some advantages and disadvantages, and they are based on reaction of metal ions and dye with proteins to give caracteristically coloured product. Measurment of absorbance are preformed at wavelenght of 540 nm for Biuret method, and at 595 nm for Lowry and Bradford method. The aim of this study is determine and compare sensitivity of Biuret, Lowry i Bradford method fod determination of concentration of proteins, which are isolated from human cervical carcionoma cells, also known as HeLa cells. Concentration of proteins are also determined by modified Bradford method, where for preparation of Bradford reagent, CBB R-250 are used instead of CBB G-250. The highest concentration of proteins are determined by modified Bradford method, but the lowest concentration are determined by use commercial Bradford reagent.
This thesis also contains a part with teaching methods on high school level including printed preparation for lesson „Aminoacids and proteins“, corresponding working papers and two experiments for group work. This lesson is prefomed through combination of a lecture and group work (students are divided into 4 groups and they preform two experiments).

Thesis includes: *72* pages, *25* figures, *8* tables, *36* references
Original in: Croatian
Keywords: Biuret method/Bradford method/HeLa cells/Lowry method/proteins
Thesis accepted: 5 September 2017.
Reviewers:
1. Katarina Mišković-Špoljarić, Ph.D. Assistant Professor
2. Elvira Kovač-Andrić, Ph.D. Assistant Professor
3. Dajana Gašo-Sokač, Ph.D. Assistant Professor

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. LITERATURNI PREGLED 3

2.1. PROTEINI 4

2.1.1. Aminokiseline 4

2.1.2. Peptidna veza 8

2.2. STRUKTURA PROTEINA 11

2.2.1. Primarna struktura 11

2.2.2. Sekundarna struktura 12

2.2.3. Tercijarna struktura 13

2.2.4. Kvaterna struktura 13

2.3. PROČIŠĆAVANJE PROTEINA 14

2.3.1. Ekstrakcija proteina iz stanica 14

2.3.2. Tehnike pročišćavanja proteina 15

2.3.3. Elektroforeza 16

2.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA 17

2.4.1. Biuret metoda 18

2.4.2. Lowryjeva metoda 20

2.4.3. Bradford metoda 21

2.5. CILJ ISTRAŽIVANJA 24

3. MATERIJALI I METODE 25

3.1. UZORCI 26

3.2. KEMIKALIJE 26

3. 3. UREĐAJI I PRIBOR 27

3.4. PRIPREMA UZORAKA I IZOLACIJA PROTEINA 28
3.5. METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE PROTEINA 29
3.5.1. Biuret metoda 29
3.5.2. Lowryjeva metoda 31
3.5.3. Bradford metoda 33
3.6. STATISTIČKA ANALIZA 34
4. REZULTATI 35
4.1. BIURET METODA 36
4.2. LOWRYJEVA METODA 39
4.3. BRADFORD METODA 41
4.4. USPOREDBA METODA 45
5. RASPRAVA 47
6. ZAKLJUČAK 51
7. METODIČKI DIO 53
7.1. UVOD 54
7.2. PRIPREMA ZA NASTAVNI SAT 55
7.3. POKUS 60
7.3.1. POKUS 1: Denaturiranje bjelanjka jajeta 60
7.3.2. POKUS 1: Denaturiranje bjelanjka jajeta- rješenja 61
7.3.3. POKUS 2: Biuret reakcija 62
7.3.4. POKUS 2: Biuret reakcija- rješenja 63
7.4. PRIMJER RADNOG LISTIĆA- Aminokiseline i proteini 64
7.5. PRIMJER RADNOG LISTIĆA- Aminokiseline i proteini- rješenja 66
KRATICE 68

LITERATURA 69

ŽIVOTOPIS 71

1. UVOD

Proteini su organski spojevi koji imaju temeljnu važnost za život svakog živog bića, a građeni su od samo dvadesetak vrsta aminokiselina. Određivanje ukupnih proteina važno je i ima brojne primjene od medicinsko-laboratorijske dijagnostike pa do istraživanja, posebno u polju biokemije.

Danas su poznate razne tehnike kojima se može odrediti koncentracija proteina u uzorku. Gravimetrijske metode koriste se za određivanje osušenih proteina, kao i metode temeljene na elementarnoj analizi, na primjer Kjeldahl metoda. Ove metode većinom su zamijenjene kolorimetrijskim i spektrofotometrijskim metodama koje su jednostavne, brze i jeftine, za razliku od modernih instrumentalnih metoda, kao što su masena spektrometrija, apsorpcijska spektroskopija, koje su skupe i kompliciranе za izvođenje .

Kolorimetrijske metode temelje se na činjenici da se određeni metalni ioni i boje vežu na proteine u specifičnom omjeru masa, uz nastajanje obojenog produkta, čija se koncentracije mjeri pomoću spektrofotometra. Ove metode nazivaju se indirektnim metodama, jer se koncentracija proteina izračunava iz izmjerene apsorbancije otopine proteina.

U ovom radu korištene su tri kolorimetrijske metode: Biuret, Lowry i Bradford metoda, koje su ujedno najčešće korištene kolorimetrijske metode za određivanje koncentracije proteina. Uzorci korišteni za određivanje količine proteina su ljudske stanice karcinoma grlića maternice, tj. HeLa stanice.

Upravo je izbor metode kompatibilne s uzorkom najteži i najbitniji dio određivanja koncentracije proteina. Postoji nekoliko kriterija za izbor: priroda proteina, prisutnost interferirajućih tvari, te željena brzina, točnost i osjetljivost metode. Niti jedna metoda nije potpuno točna i specifična za sve proteine. Tako, točnost rezultata često ovisi o sastavu aminokiselina u proteinu, prisutnosti prostetičkih skupina, sastavu pufera te izboru proteinskog standarda. Ovisno o korištenoj metodi, moguća su razna ometanja zbog prisutnosti drugih tvari.

Cilj ovoga diplomskog rada je odrediti koncentracije proteina izoliranih iz HeLa stanica pomoću triju metoda, Biuret, Lowry i Bradford, te usporediti dobivene rezultate.

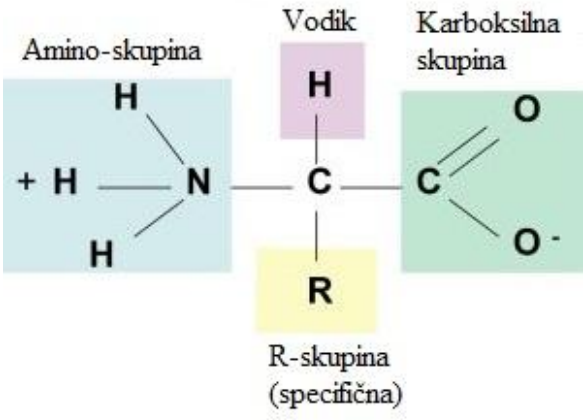
2. LITERATURNI PREGLED

2.1. PROTEINI

Proteini su najraširenije biološke makromolekule, prisutne u svim stanicama, a time i u svim živim sustavima. Odlikuju se velikom raznolikošću; postoje tisuće različitih vrsta, čija veličina može biti u rasponu od relativno malih peptida, pa sve do velikih polimera. Osim po veličini proteini se razlikuju i po svojim biološkim funkcijama: prema [1] djeluju kao katalizatori, prenose i pohranjuju ostale molekule, npr. kisik, osiguravaju mehaničku potporu i imunološku zaštitu, provode gibanje, prenose živčane impulse te kontroliraju rast i diferencijaciju.

2.1.1. Aminokiseline

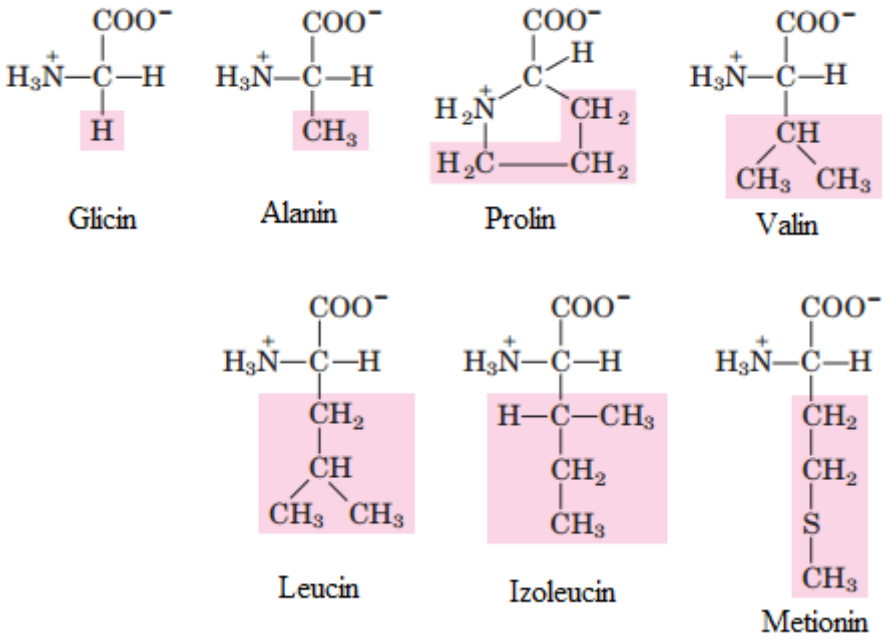
Proteini su građeni od aminokiselina kovalentno povezanih u linearne polimere. Svaka aminokiselina sadrži središnji ugljikov atom ili α-ugljikov atom na kojega su vezani amino skupina, atom vodika, karboksilna skupina i specifična alkilna R-skupina, koja se još naziva bočnim ogrankom i različita je za svaku aminokiselinu (slika 2.1.). Četiri različite skupine vezane na ugljikov atom uzrok su kiralnosti aminokiselina, koje se mogu pojaviti kao L- i D-izomer, ali proteini sadrže samo L-aminokiseline.



Slika 2.1. Opća struktura aminokiseline, preuzeto i prilagođeno [2]

U proteinima je pronađeno dvadeset različitih specifičnih bočnih ogranaka, od najjednostavnijeg vodikovog atoma u aminokiselini glicin, pa sve do imidazolne skupine u aminokiselini histidin. Razlika u sastavu i građi bočnih ogranaka dovodi do međusobnih razlika u naboju, hidrofobnosti i kemijskoj reaktivnosti. Aminokiseline se mogu podijeliti u pet skupina s obzirom na polarnost bočnog ogranka, to jest njegovu tendenciju stvaranja interakcija s molekulama vode pri pH vrijednosti 7:

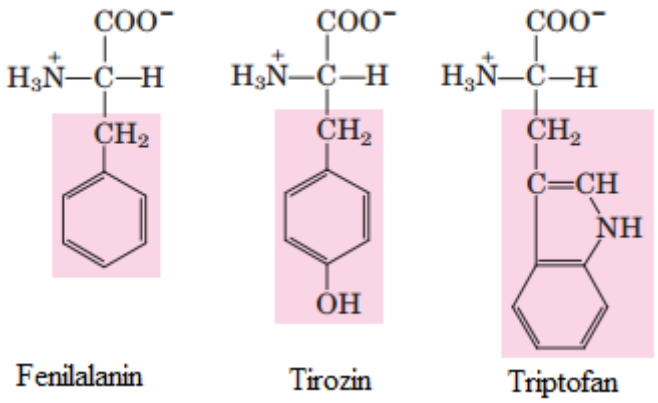
1. *Aminokiseline s nepolarnim, alifatskim bočnim ograncima* (slika 2.2.); koji su i hidrofobni. U ovu skupinu spadaju aminokiseline alanin, valin, leucin i izoleucin, koji svojim bočnim ograncima stabiliziraju strukturu proteina pomoću hidrofobnog učinka, što znači, da se hidrofobne skupine međusobno približavaju i slažu u kompaktne strukture. Već spomenuta najjednostavnija aminokiselina glicin, također je nepolarna, a mali bočni ogranak neznatno utječe na hidrofobne interakcije. U ovoj skupini nalazi se i aminokiselina metionin, koja sadrži nepolarnu tioestersku skupinu; te aminokiselina prolin, koja također ima alifatski bočni ogranak koji je za razliku od bočnih ogranaka drugih aminokiselina vezan u cikličku strukturu.



Slika 2.2. Aminokiseline s nepolarnim, alifatskim bočnim ograncima;

preuzeto i prilagođeno iz [3, str. 79]

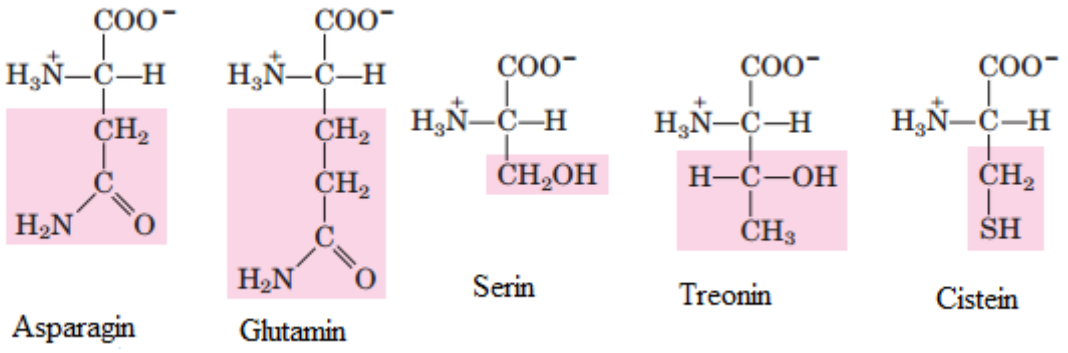
2. *Aminokiseline s aromatskim bočnim ograncima* (slika 2.3.). U ovu skupinu spadaju fenilalanin, tirozin i triptofan. Tirozin sadrži dodatnu hidroksilnu funkcijsku skupinu, pomoću koje može stvarati vodikove veze, a triptofan sadrži indolsku skupinu koja sadrži dušik, te su zbog toga polarniji od fenilalanina. Nadalje, tirozin i triptofan, a u manjoj mjeri i fenilalnin, apsorbiraju ultraljubičasto zračenje, što se može iskoristiti pri karakterizaciji proteina pomoću apsorpcije svjetlosti.



Slika 2.3. Aminokiseline s aromatskim bočnim ograncima;

preuzeto i prilagođeno iz [3, str. 79]

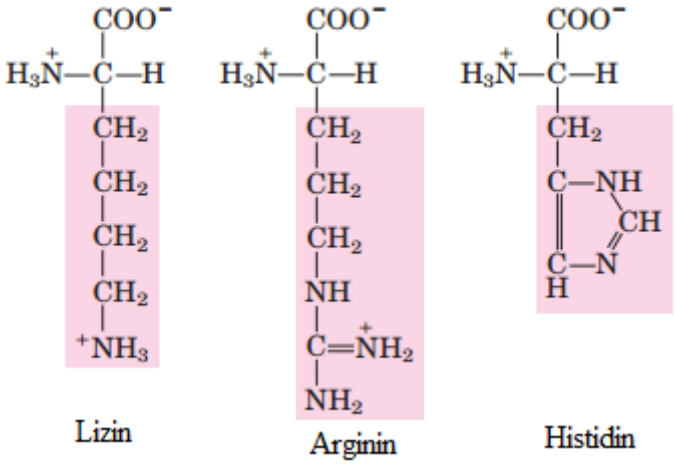
3. *Aminokiseline s polarnim, nenabijenim bočnim ograncima* (slika 2.4.), koji imaju bolju topljivost u vodi i više su hidrofilni od aminokiselina koje se nalaze u prvoj i drugoj skupini. Razlog bolje topljivosti i hidrofilnosti su funkcijske skupine koje se nalaze u bočnim ograncima i koje imaju sposobnost stvaranja vodikovih veza s molekulama vode. U ovoj skupini nalaze se aminokiseline serin, treonin, asparagin, glutamin i cistein. Serin i treonin sadrže hidroksilnu funkcijsku skupinu, cistein sadrži tiolnu koja je reaktivnija od hidroksilne i ima mogućnost stvaranja disulfidnih mostova; a asparagin i glutamin sadrže amidne skupine.



Slika 2.4. Aminokiseline s polarnim, nenabijenim bočnim ograncima;

preuzeto i prilagođeno iz [2, str. 79]

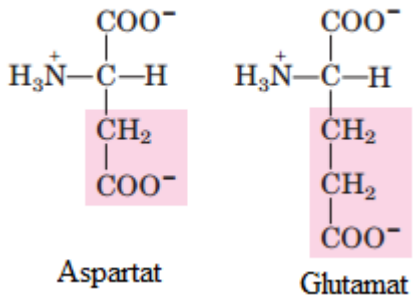
4. *Aminokiseline s pozitivno nabijenim bočnim ograncima* (slika 2.5.). Lizin sadrži primarnu amino skupinu na alifatskom lancu svog bočnog ogranka; arginin ima pozitivno nabijenu gvanidinsku skupinu, a histidin imidazolsku skupinu kojoj naboj pri neutralnom pH ovisi o neposrednom okruženju i zbog tog svojstva se često nalazi u aktivnim mjestima enzima gdje služi kao proton donor ili akceptor.



Slika 2.5. Aminokiseline s pozitivno nabijenim bočnim ograncima;

preuzeto i prilagođeno iz [3, str. 79]

5. *Aminokiseline s negativno nabijenim bočnim ograncima* (slika 2.6.). U ovoj skupini nalaze se dvije aminokiseline kojima je bočni ogranak negativno nabijen pri pH 7,0: aspartat ili asparaginska kiselina i glutamat ili glutaminska kiselina. Obje aminokiselina sadrže karboksilnu skupinu u bočnom ogranku.



Slika 2.6. Aminokiseline s negativno nabijenim bočnim ograncima;

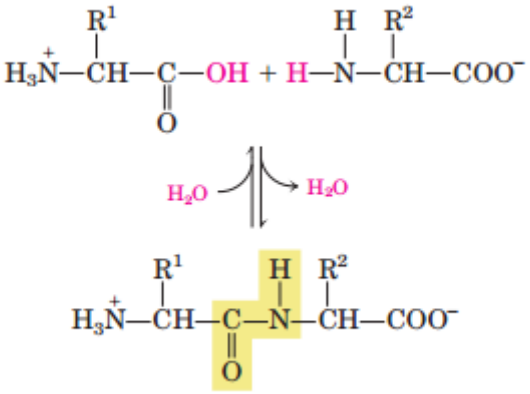
preuzeto i prilagođeno iz [3, str. 79]

Godine 1806. otkrivena je prva aminokiselina, asparagin, a 1938. godine posljednja od dvadeset aminokiselina, treonin. Sve aminokiselina imaju i trivijalne nazive, često izvedene iz naziva izvora iz kojih su izolirane, npr. glutamat je pronađen u pšeničnom glutenu. Osim trivijalnih naziva, aminokiseline se označavaju troslovnim kraticama, u većini slučajeva to su prva tri slova imena aminokiseline, ili jednoslovnim simbolima, koji su kod većine aminokiselina prva slova njihova imena, a kod ostalih su nastali kao rezultat dogovora. Uz ovih dvadeset aminokiselina postoje i druge manje uobičajene. Neke od njih nastaju kao ostaci nakon sinteze proteina, dok su druge prisutne u živim organizmima, ali nisu sastavni dio proteina.

2.1.2. Peptidna veza

Proteini nastaju povezivanjem α-karboksilne skupine jedne aminokiseline s α-amino-skupinom druge aminokiseline, pri čemu nastaje kovalentna veza, nazvana

peptidnom vezom (slika 2.7.). Amino skupina jedne aminokiseline ponaša se kao nukleofil, napada karbonilni ugljik druge aminokiseline i zamjenjuje hidroksilnu skupinu s druge aminokiseline. Nastanak peptidne veze praćen je gubitkom molekule. Ova reakcija primjer je reakcije kondenzacije, koje su česte u živim stanicama.

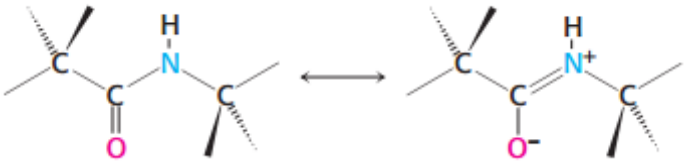


Slika 2.7. Stvaranje peptidne veze preuzeto iz [3, str. 85]

Povezivanjem aminokiselina nastaje polipeptidni lanac, a svaka aminokiselina unutar lanca naziva se aminokiselinskim ostatkom. Lanac koji se sastoji od nekoliko aminokiselinskih ostataka naziva se oligopeptidom ili samo peptidom, a lanac nastao povezivanjem većeg broja aminokiselina naziva se polipeptidom. Ponekad je teško odrediti granicu između proteina i polipeptida. Naziv ‘protein’ rezerviran je za polimere nastale vezanjem više od 40 aminokiselina [4]. Proteini mogu sadržavati i po nekoliko tisuća aminokiselinskih ostataka. Najveći poznati protein je mišićni protein titin, koji se sastoji od 27 000 aminokiselina [1].

Peptidni lanac je polaran, na jednom kraju nalazi se slobodna α-amino-skupina, a na drugom α-karboksilna skupina [1]. Dvije aminokiseline mogu se povezati na dva načina, jer obje sadrže i karboksilnu i amino-skupinu pa time mogu nastati dva različita dipeptida. Iz tog razloga, važno je kojim redom se zapisuju aminokiseline. Aminokiselina koja sadrži slobodnu amino-skupinu naziva se *N*-terminalnom aminokiselinom, a aminokiselina koja sadrži slobodnu karboksilnu skupinu naziva se *C*-terminalnom aminokiselinom. Prema dogovoru, *N*-terminalna aminokiselina uvijek se piše na lijevoj strani lanca, a *C*-terminalna na desnoj strani.

Tridesetih godina prošlog stoljeća, Linus Pauling i Robert Corey postavili su temelje za razumijevanje strukture proteina i peptidne veze. Istraživanja kristala aminokiselina i jednostavnih dipeptida i tripeptida pomoću rendgenske kristalografije pokazala su da je peptidna C-N veza nešto kraća od C-N veze u aminima. To se može objasniti rezonancijskim strukturama peptidne veze (slika 2.8.). Naime, par elektrona parcijalno se dijeli između karbonilnog kisika i amidnog dušika, pa time kisik ima parcijalni negativni naboj, a dušik parcijalni pozitivni naboj.



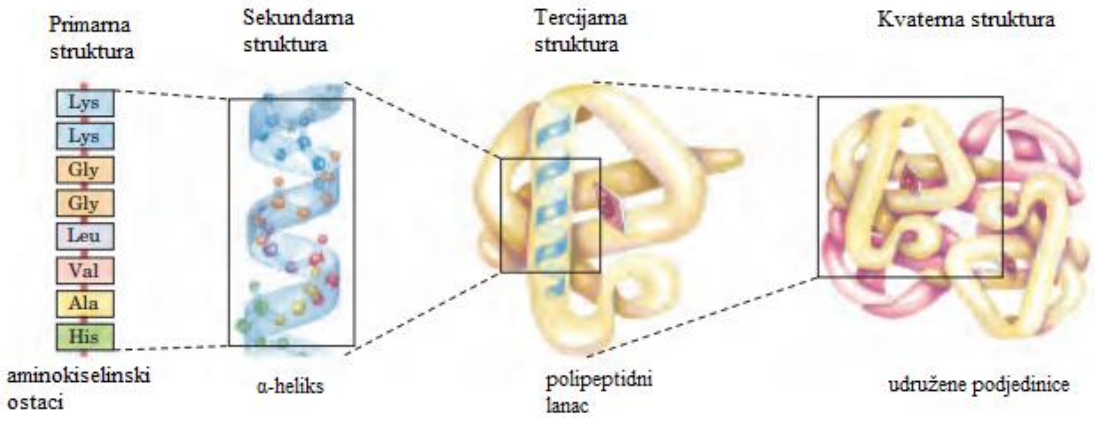
Slika 2.8. Rezonancijske strukture peptidne veze;

preuzeto i prilagođeno iz [1, str. 37]

Šest atoma peptidne grupe (C_α, C, O, N, H i C_α) nalazi se u istoj ravnini, a atom kisika iz karbonilne skupine i atom vodika vezan na amidni dušik nalaze se su *trans* položaju. Iz ovoga otkrića, Pauling i Corey su zaključili da peptidna veza ne može rotirati zbog svojih svojstava dvostruke veze [3]. Za razliku od peptidne veze, susjedne veze između amino-skupina i α-ugljikova atoma, te između karbonilne skupine i α-ugljikova atoma jednostruke su veze oko kojih je moguća rotacija. Rotacija oko veza opisuje se torzijskim kutovima, koji mogu imati vrijednost od -180º do +180º. Kut rotacije oko veze između dušikova atoma i α-ugljikova atoma označuje se slovom φ (fi), a kut rotacije oko veze između α-ugljika i karbonilnog ugljikova atoma naziva se ψ (psi) [1]. Dopuštene vrijednosti ovih kutova grafički se prikazu Ramachandranovim dijagramima, nazvanim prema Gopalasamudramu Ramachandran. Ograničen broj kombinacija torzijskih kutova i rigidnost peptidne veze ograničavaju broj struktura koje proteini mogu zauzeti u prostoru.

2.2. STRUKTURA PROTEINA

Za ovako velike molekule kao što su proteini, izazovu objašnjavanja i razumijevanja strukture pristupa se na nekoliko različitih razina, koje se međusobno razlikuju po kompleksnosti. Za očekivati je da postoje razne konformacije u kojima se javljaju ove kompleksne makromolekule. Definirane su četiri razine strukture proteina: primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura (slika 2.9.).



Slika 2.9. Razine strukture proteina;

preuzeto i prilagođeno iz [3, str. 89]

2.2.1. Primarna struktura

Primarna struktura je redoslijed kojim su aminokiseline kovalentno povezane u proteinu. Kod pisanja primarne strukture važno je pridržavati se pravila koje nalaže da se amino-kraj smatra početkom lanca. Frederick Sanger je 1953. godine odredio primarnu strukturu proteinskog hormona inzulina te je to otkriće bilo prekretnica u biokemiji. Svaki protein ima jedinstvenu primarnu strukturu, koju određuje redoslijed nukleotida u genima. Primarna struktura određuje trodimenzionalnu strukturu proteina, a time i njegova svojstva i djelovanje. Naime, za točno funkcioniranje proteina potrebna je određena trodimenzionalna struktura, promjene slijeda mogu izazvati razne bolesti i abnormalne funkcije proteina.

2.2.2. Sekundarna struktura

Sekundarna struktura ukazuje na naročito stabilna uređenja aminokiselinskih ostataka koja dovode do ponavljajućih strukturalnih obrazaca. Priroda veza u proteinskoj okosnici ima bitnu ulogu. Ramachandranovi kutovi φ (fi) i ψ (psi) koriste se za prikazivanje rotacije oko C-N i C-C veza.

Pauling i Corey 1951. godine predložili su dvije periodične strukture nazvane alfa-uzvojnica (α-heliks) i beta-nabrani list (β-ploča). Ove strukture nastaju zbog vodikovih veza između skupina N-H i C=O aminokiselina koje se nalaze blizu jedna drugoj u linearnoj strukturi [1].

1. *Alfa-uzvojnica* je najjednostavniji raspored koji polipeptidni lanac može imati s obzirom na rigidnost peptidne veze i mogućnosti rotacija ostalih veza. To je spiralna struktura u kojoj je proteinska okosnica čvrsto namotana, a bočni ogranci aminokiselinskih ostataka strše prema van. Ponavljajuća jedinica je jedan navoj uzvojnice, koji ima visinu od 0,54 nm i sadrži 3,6 aminokiselinska ostatka. Ova struktura stabilizirana je pomoću vodikovih veza, koje nastaju između vodikova atoma vezana na atom dušika i elektronegativnog atoma kisika iz karbonilne skupine četvrtog po redu aminokiselinskog ostatka [3]. Spiralna konformacija dopušta linearni raspored atoma uključenih u stvaranje vodikovih mostova, što daje jakost vezi čineći ovu konformaciju jako stabilnom.

Smjer uzvojnice može biti lijevi i desni, a prema Ramachandranovu dijagramu obje uzvojnice su dopuštene konformacije. Međutim, sve pronađene α-uzvojnice u proteinima su desne, zbog toga što je ona energetski povoljnija jer su manje steričke smetnje između bočnih ogranaka i proteinske okosnice. Proteini imaju različit udio α-uzvojnice, od nekoliko posto do gotovo 100%.

2. *Beta-nabrani list ili β-ploča*; sastoji se od dvaju ili više polipeptidnih lanaca čiji dijelovi se nazivaju β-nitima, koje su gotovo potpuno izdužene i povezuju se vodikovim vezama. Ako peptidni lanci, tj. niti, teku u istom smjeru (ako su svi poredani od *N*-terminalnog prema *C*-terminalnom kraju), nastaje paralelni β-list. Ako peptidni lanci teku u suprotnim smjerovima, nastaje antiparalelna β-ploča [5]. U shematskom prikazu β-niti se prikazuju

strjelicama okrenutim u smjeru *C*-kraja. Vodikove veze imaju bitnu ulogu i u ovoj strukturi; nastaju između NH i CO-skupine aminokiselina u susjednim nitima.

Osim ovih dviju periodičnih struktura, u proteinima su nađene i neperiodične strukture, kao što su β-okret i ω-omča. Ove strukture omogućavaju i stabiliziraju promjene smjera polipeptidnih lanaca.

2.2.3. Tercijarna struktura

Tercijarna struktura opisuje cjelokupni trodimenzionalni izgled proteina [1], to jest, trodimenzionalni raspored svih atoma u molekuli, za razliku od sekundarne strukture koja se odnosi na prostorni raspored aminokiselinskih ostataka koji su u neposrednoj blizini. U tercijarnu strukturu spadaju konformacija bočnih lanaca i položaj prostetičkih skupina, kao i raspored α-uzvojnica i β-listova. Razne vrste sila i interakcija imaju bitnu ulogu u održavanju proteina u točnoj, nativnoj konformaciji, kao što su kovalentne interakcije, vodikove veze, hidrofobne interakcije, elektrostatska privlačenja između suprotno nabijenih skupina itd.

Za određivanje tercijarne strukture proteina koriste se rendgenska kristalografija i nuklearna magnetska rezonancija. Rendgenska kristalografija bila je prva metoda koja se koristila za određivanje strukture proteina do atomskih pojedinosti, a još je i danas najjasniji način vizualizacije strukture proteina [1]. Za ovu metodu potrebno je dobiti kristale proteina, što je moguće u kontroliranim uvjetima, uz uvjet da su proteini jako visoke čistoće i da se mogu kristalizirati. No, neki se proteini ne mogu kristalizirati, pa se u takvim slučajevima za otkrivanje strukture proteina koristi nuklearna magnetska rezonancija, koja omogućuje određivanje trodimenzionalne strukture proteina u koncentriranim otopinama.

2.2.4. Kvaterna struktura

Kvaterna struktura odnosi se na proteine koji se sastoje od više polipeptidnih lanaca, koji se još nazivaju podjedinicama [1]. Broj lanaca kreće se od dva do dvanaest, a lanci mogu biti potpuno isti ili različiti. Najčešći primjeri kvaternih struktura su dimer (sastoji se od dviju podjedinica), trimer (tri podjedinice) te tetramer (četiri podjedinice). Podjedinice

stvaraju različite vrste nekovalentnih interakcija, kao što su elektrostatsko privlačenje, vodikove veze ili hidrofobne interakcije [6].

Proteini se mogu podijeliti u dvije velike skupine s obzirom na više razine strukture [3]:

a) globularni, koji imaju polipeptidne lance smotane u kuglasti ili globularni oblik i često sadrže razne vrste sekundarnih struktura

b) vlaknasti, koji imaju lance raspoređene u niti ili listove, te većinom posjeduju jednu vrstu sekundarne strukture.

2.3. PROČIŠĆAVANJE PROTEINA

Dosadašnja saznanja o strukturi i funkcijama proteina otkrivena su zahvaljujući mnogobrojnim istraživanjima provedenim na raznim proteinima. Kako bi proveo istraživanje proteina, istraživač mora imati određena znanja i vještine potrebne za separaciju proteina, a nakon toga i metode kojima će odrediti njihova svojstva.

2.3.1. Ekstrakcija proteina iz stanica

Stanica sadrži na tisuće proteina. Izolacija, pročišćavanje i odvajanje proteina prvi su koraci u njihovom istraživanju. Na početku rada proteine je potrebno osloboditi iz stanice. U ovisnosti o porijeklu izvora (biljni, humani, animalni), uzorak je potrebno pripremiti.

Taj korak se naziva homogenizacija i uključuje razaranje stanične membrane [6]. Postoje razni načini kojima se može provesti homogenizacija, a izbor ovisi o vrsti stanice. Najjednostavniji način je usitnjavanje tkiva u blenderu ili mikseru uz pogodan pufer, čime se topljivi proteini oslobađaju iz stanica, ali i iz staničnih organela. Izbor pufera je bitan kako bi se održao željeni pH i dobili reproducibilni rezultati istraživanja. U većini slučajeva koriste se 0,1-0,2 M puferi s pH vrijednošću od 7,0 do 8,0 [7]. Najčešće se koriste Tris ili fosfatni puferi, u koje se mogu dodati reducirajući agensi, detergenti, kelatori ili druge tvari, ovisno o prirodi i izvoru proteina [7]. Najčešće pufer sadrži etilendiaminotetraoctenu kiselinu (1-5 mM), β-merkaptoetanol (5-20 mM), te inhibitore proteaza. Inhibitori proteaza bitna su komponenta pufera, jer zaustavljaju neželjeni učinak enzima koji se oslobađaju tijekom razaranja stanice i počinju razgrađivati proteine. Postoje brojni proteolitički enzimi, za koje

su danas razvijeni brojni inhibitori proteaza koji djeluju na pojedini enzim, a tijekom ekstrakcije proteina najbolje je koristiti smjesu inhibitora koja djeluje na razne proteaze [9].

Ekstrakcija proteina iz bioloških uzoraka treba biti provedena brzo kako bi se izbjegla degradacija, odnosno neželjena proteoliza. Uzorci se moraju držati na ledu te se cijeli postupak izvodi pri niskim temperatura kako bi se smanjila aktivnost enzima.

Nakon homogenizacije, dobivena smjesa podvrgava se razlikovnom centrifugiranju [1]. Prvo centrifugiranje provodi se na 500-600 g, pri čemu nastaje talog jezgrinih frakcija i supernatant. Ako se traženi protein nalazi u supernatantu, supernatant se ponovno centrifugira na većoj brzini od oko 10 000 g, a time se talože mitohondriji. Daljnjim centrifugiranjem na 100 000 g istaložit će se ribosomi i fragmenti membrana, a u supernatantu će ostati topljivi protein.

2.3.2. Tehnike pročišćavanja proteina

Frakcioniranje je proces kojim se iz smjese ukupno izoliranih proteina, proteini razdvajaju na različite frakcije ovisno o veličini, topljivosti, naboju, specifičnom afinitetu vezanja ili nekom drugom svojstvu.

Poznate su razne tehnike pročišćavanja proteina, neke od njih su:

a) *Isoljavanje,* temelji se na svojstvu topljivosti proteina. Sol koja se najčešće koristi za isoljavanje je amonijev sulfat, zbog svoje visoke topljivosti u vodi. Proteini su topljivi u vodi, ali topljivost opada kada se amonijev sulfat doda u otopinu proteina. Sol stvara ion-dipol interakcije s molekulama vode, a time se smanjuje broj molekula vode koje mogu hidratirati proteine, zbog čega proteini međusobno stvaraju hidrofobne interakcije [6]. Dodatkom određene količine soli može se selektivno istaložiti određeni protein, odnosno, koncentracija soli pri kojoj se protein taloži razlikuje se od proteina do proteina [1].

b) *Dijaliza,* metoda kojom se otopina proteina može odijeliti od malih molekula pomoću polupropusne membrane kroz koju prolaze male molekule, npr. molekule otapala, a proteini ne mogu proći.

c) *Kolonska kromatografija,* najmoćnija metoda frakcioniranja proteina, a može se temeljiti na razlikama u veličini, naboju ili afinitetu proteina, pa tako postoji

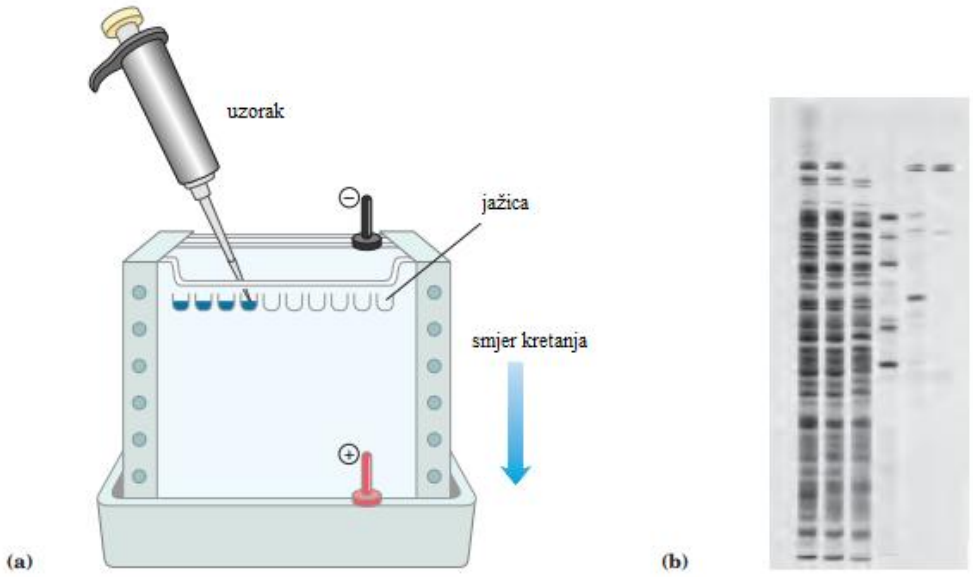
gel-filtracijska, ionsko-izmjenjivačka i afinitetna kromatografija. Moderni oblik kromatografije je visokotlačna tekućinska kromatografija ili HPLC (eng. *high-pressure liquid chromatography*).

2.3.3. Elektroforeza

Elektroforeza je metoda koja se može koristiti za odvajanje i pročišćavanje proteina, ali se rijetko koristi u tu svrhu, jer postoje jednostavnije metode, te za karakterizaciju proteina. Temelji se na kretanju nabijenih čestica u električnom polju prema elektrodi sa suprotnim nabojem [6]. Elektroforetske metode predstavljaju jedan od najjednostavnijih, najjeftinijih i najosjetljivijih načina određivanja broja proteina u uzorku [8]

Elektroforeza se provodi u gelovima, koji mogu biti agarozni ili poliakrilamidni. Gelovi služe kao molekularna sita u kojim se proteini odvajaju ovisno o omjeru naboja i mase; najmanje molekule najlakše prolaze kroz gel. U radu s proteinima, najčešće se koriste poliakrilamidni gelovi. Nakon odvajanja, gel se oboji srebrom ili bojama poput Coomasie Brilliant Blue čime se vizualiziraju proteini (slika 2.10.). Pomoću ove metode moguće je relativno brzo procijeniti broj proteina u smjesi, provjeriti pročišćenost, te odrediti molekularnu masu.

SDS-PAGE ili SDS-poliakrilamid gel elektroforeza je najraširenija elektroforetska tehnika, u kojoj se uzorak proteina tretira s detergentom natrijevim dodecilsulfatom (*sodium dodecyl sulfate*- SDS) prije nanošenja na gel. Anioni SDS-a vežu se na proteine; što je protein veći, to se više aniona veže, a time nastaju kompleksi negativnog električnog naboja. Prema [10] broj iona detergenta koji se vežu na peptidni lanac jednak je polovici broja preostalih aminokiselina na lancu. Približno 1,4 g SDS veže se na 1 g proteina. SDS denaturira proteine kidajući sve nekovalentne interakcije koje određuju tercijarnu i kvaternu strukturu, uz dodatak reagensa, kao što su ditiotreitol i merkaptoetanol koji reduciraju disulfidne veze. Oblik i gustoća negativnog naboj proteina postaju gotovo jednaki za sve proteine u uzorku, tako da se elektroforezom odvajaju proteini gotovo isključivo ne temelju različite mase, a manji polipeptidni lanci kreću se brže nego veći. SDS-PAGE može se koristiti za određivanje molekularne mase nepoznatog proteina uspoređujući ga sa standardom. Logaritam molekularne mase većine proteina linearno je razmjerna njihovoj pokretljivosti pod ovim uvjetima.



Slika 2.10. Elektroforeza a) Nanošenje različitih uzoraka u jažice; b) Vizualizacija proteina nakon elektroforeze bojenjem gela, svaka vrpca odgovara određenom proteinu; preuzeto i prilagođeno iz [3, str.93]

2.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA

Mjerenje koncentracije proteina bitan je korak u analizi proteina. Razvijene su različite metode za određivanje koncentracije proteina i one se rutinski upotrebljavaju u laboratorijima, a mogu se podijeliti na gravimetrijske metode, određivanje dušika po Kjeldalu, aminoanalizu, spektrofotometrijske metode i kolorimetrijske metode. Izbor metode ovisi o prirodi materijala, količini uzorka i koncentraciji proteina u uzorku.

Kolorimetrijske metode najčešće su korištene, temelje se na reakciji proteina s određenim reagensom pri čemu nastaje obojeni kompleks, a intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji proteina [7]. Za ove metode potrebno je napraviti baždarni dijagram, koji pokazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji ili količini proteina u uzorku, a najčešće se

radi mjerenjem apsorbancija niza otopina goveđeg serumskog albumina (*bovine serum albumin*, BSA) poznatih koncentracija. Svaka metoda ima određene nedostatke, a na točnost mjerenja mogu utjecati druge molekule koje su prisutne u otopini proteina (puferi, soli, detergenti itd.) te vrsta proteina.

Metoda po Bradford-u, Biuret metoda i Lowryjeva metoda vrste su kolorimetrijskih metoda, a još se nazivaju i indirektnim metodama određivanja koncentracije proteina, jer se spektrofotometrijskim izmjerena apsorbancija otopine proteina preračunava u količinu proteina u uzorku [11].

Kada kroz kivetu u kojoj se nalazi otopina proteina prolazi elektromagnetsko zračenje određene valne duljine, uzorak apsorbira dio toga zračenja, a količina apsorbiranog zračenja proporcionalna je koncentraciji uzorka. Ostatak neapsorbiranog zračenja, koji se naziva apsorbancija, prolazi kroz uzorak i mjeri se u detektoru. Apsorbancija (A) može se izraziti kao logaritam omjera intenziteta upadnog (I_0) i propuštenog zračenja (I) kroz uzorak [12]:

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Zakonom apsorpcije, koji se naziva Lambert-Beerovim zakonom, definirana je ovisnost količine apsorbiranog zračenja i koncentracije proteina u uzorku:

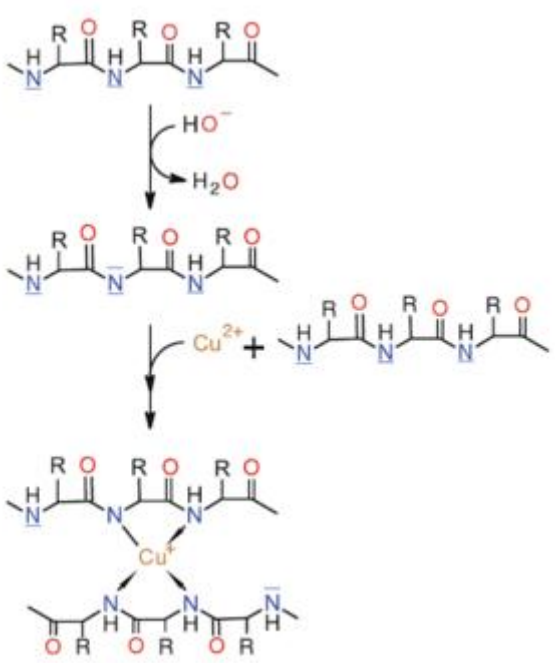
$$A = \varepsilon \times c \times l$$

gdje ε predstavlja molarni apsorpcijski koeficijent (L/mol cm), c koncentraciju proteina u uzorku (mol/L), a l duljinu puta koju elektromagnetsko zračenje prođe kroz kivetu (cm).

Prema Lambert-Beerovom zakonu, apsorbancija je izravno proporcionalna koncentraciji apsorbirajućih tvari, u ovom slučaju proteina, te duljini puta kroz kivetu [12]. Na temelju ovog zakona moguće je mjerenjem apsorbancije odrediti koncentraciju ispitivanog uzorka, uz uvjet da je duljina puta kroz kivetu konstantna i da je apsorpcijski koeficijent poznat.

2.4.1. Biuret metoda

Biuret metoda jedna je od najčešće korištenih metoda za određivanje koncentracije proteina [13], a temelji se na principu biuret reakcije, po kojoj je dobila naziv. Zagrijavanjem 2 mola uree nastaje biurea, koja u reakciji s otopinom bakrova sulfata u lužnatim uvjetima daje ljubičasto obojeni kompleks (slika 2.11.).



Slika 2.11. Biuret reakcija, preuzeto iz [14]

Ovu reakciju pokazuju i peptidne veze u proteinima, te se pomoću nje proteini mogu kvalitativno i kvantitativno određivati. Naime, u alkalnoj sredini ioni bakra reagiraju s peptidnim vezama stvarajući ljubičasto obojeni kompleks između iona bakra i kisika karbonilne skupine te dušika amidne skupine peptidne veze. Nastali kompleks ima apsorpcijski maksimum na 540 nm, a intenzitet razvijene boje proporcionalan je količini proteina u uzorku [13].

Pozitivnu reakciju pokazuju spojevi koji sadrže barem dvije peptidne veze, dakle, aminokiseline i dipeptidi ne reagiraju s ovim reagensom. Reagens koji se koristi za ovu metodu sastoji se od otopine bakrova sulfata i otopine natrijeva hidroksida, kojima se dodaje otopina kalijevog, natrijevog-tartarata i otopina kalijeva jodida [15]. Reagensi koji sadrže lužinu i ione bakra jako su problematični, zbog toga K, Na-tartarat služi kao stabilizator i sprječava taloženje bakrova hidroksida, $Cu(OH)_2$, a kalijev jodid sprječava nastajanje bakrova(I) oksida, Cu_2O.

Metoda je jednostavna i dovoljno precizna te je prikladna za analizu proteina i našla je široku primjenu u laboratorijima diljem svijeta, ali nedostatak je što pozitivnu reakciju mogu dati neke tvari koje ne sadrže peptidnu vezu. Nedostatak ove metode su relativno niska osjetljivost (0-0,1 mg), zbog čega je potrebna velika količina proteina. Kako bi se

riješio taj nedostatak, razvijena je osjetljivija varijanta metode, mikro-biuret metoda, u kojoj se koriste manji volumeni standarda, uzorka i reagensa i izvodi se u mikrotitarskim pločicama [16].

2.4.2. Lowryjeva metoda

Metoda po Lowryju zasniva se na dvjema različitim reakcijama:

1. Formiranje kompleksa iona bakra s peptidnim vezama: u lužnatim uvjetima ion bakra Cu^{2+} tvori kompleks s peptidnim vezama, reducirajući se u Cu^{+}
2. Redukcija Folin-Ciocalteau reagensa: aminokiselinski ostaci tirozina, triptofana i cisteina reagiraju s reagensom, pri čemu nastaje nestabilni produkt, a on se zatim reducira do molibden/volfram plavog [17]

Folin-Ciocalteau reagens smjesa je natrijeva volframata, molibdata i fosforne kiseline, te je komercijalno dostupan [8]. Osim Folinova reagensa, potreban je i Lowryjev reagens koji se sastoji od otopine natrijevog karbonata u natrijevu hidroksidu, otopine Na, K-tartarat u destiliranoj vodi i otopine bakrova(II) sulfata u destiliranoj vodi. Reagensi koji sadrže lužinu i bakar vrlo su problematični jer stajanjem dolazi do stvaranja karbonata koji se talože i djeluju na optičku aktivnost pa rezultati mjerenja više nisu vjerodostojni. Zato je važno da su takvi reagensi pripremljeni svježi [17].

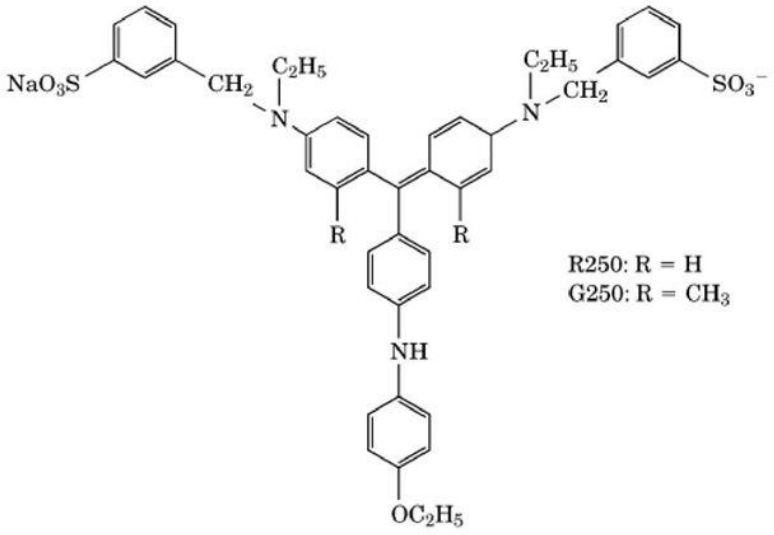
Miješanjem otopine proteina s Folinova i Lowryjevim reagensom nastaje plavo obojeni produkt, koji se može kvantitativno odrediti mjerenjem njegove apsorbancije na 660 nm [7].

Koristeći Folinov reagens osjetljivost Lowryjeve metode 100 puta je veća od osjetljivosti Biuret metode. Međutim, ova metoda ima slabu specifičnost i nastaju brojne interferencije s detergentima, glicerolom, EDTA, ugljikohidratima i mnogim drugim tvarima koje se nalaze u puferima ili se koriste pri ekstrakciji i pročišćavanju proteina, pa su zbog toga razvijene razne modifikacije Lowryjeve metode, na primjer, metoda s bicinkoninskom kiselinom ili BCA (*bicinchoninic acid assay*) i metoda po Hartree-u [17].

2.4.3. Bradford metoda

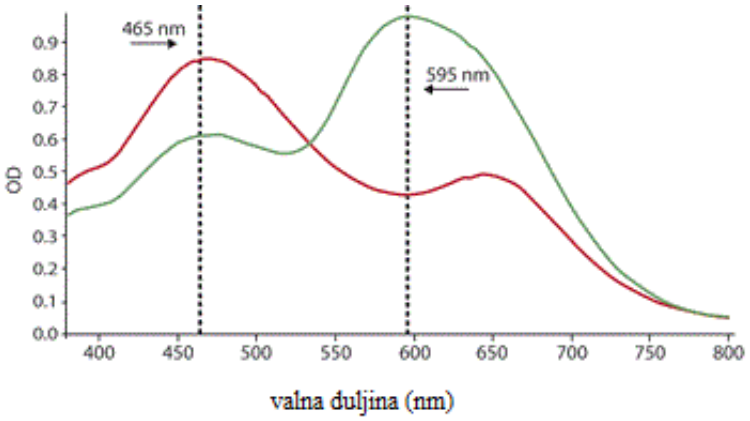
Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradford-u temelji se na izravnom vezanju boje Coomassie brilliant blue G-250 na proteine na bočnim skupinama arginina, triptofana, tirozina, histidina i fenilalanina. Vezanjem anionske boje dolazi do brzog pomaka maksimuma apsorbancije boje, od 465 nm do 595 nm [5]. Hidrofobne interakcije i elektrostatske sile nastaju između sulfonatnih skupina boje i proteina, što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Prednost ove metode je ta što je priprema reagensa jednostavna, a boja je stabilna i brzo se razvija [5]. Vezanje boje i proteina odvija se brzo (oko 2 min), a kompleks protein-boja stabilan je oko sat vremena [18]. Bradford reagens priređuje se otapanjem boje Commassie brilliant blue G-250 u otopini etanola, u koju se dodaje fosforna kiselina; a pripremljena otopina je smeđe boje.

Coomassie Brilliant Blue je zajednički naziv za skupinu kemijski sličnih trifenilmetanskih boja, među kojima su i Coomassie Brilliant Blue G-250 i Coomassie Brilliant Blue R-250, koje se međusobno razlikuju po broju metilnih skupina (slika 2.12.) i po boji pri određenim pH vrijednostima [19]. Oznaka "250" ukazuje na čistoću boje, nastavak "G" dodan je kako bi se opisala neznatno zelenkasta boja Coomassie Brilliant Blue G-250 boje, nastavak "R" odnosi se na crvenkastu notu Coomassie Brilliant Blue R-250 [20]. Coomassie Brilliant Blue R-250 najčešće se koristi za vizualizaciju proteina, dok se Coomassie Brilliant Blue G-250 koristi u Bradford metodi za određivanje koncentracije proteina.



Slika 2.12. Strukturna formula boja Coomassie Brilliant Blue R-250 i G-250, koje se međusobno razliku samo po R-skupini, preuzeto s [21]

Istraživanja su pokazala da slobodna boja ima četiri različita ionska oblika, čije pK_a vrijednosti iznose: 1,15, 1,82 i 12,4 [16]. Kationske crvene i zelene forme dominantne su pri kiselom pH kakav je u otopini reagensa, te imaju apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 470 i 650 nm. Anionski plavi oblik boje nastaje vezanjem proteina, te ima apsorpcijski maksimum na 590 nm. Dakle, određivanje koncentracije proteina provodi se određivanjem količine boje u plavom ionskom obliku, najčešće mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 595 nm [22].



Slika 2.13. Apsorpcijski spektar boje CBB G-250, crvena linija prikazuje spektar nevezane boje, a zelena linija prikazuje spektar boje vezane na protein. Vezanjem proteina apsorpcijski maksimum pomaknuo se s 465 nm na 595 nm, preuzeto s [23]

Metoda je jednostavna, brza, jeftina i osjetljiva, ali izbor standarda ponekad je težak, a primijećeno je da goveđi serumski albumin nije uvijek pogodan standard [24]. Za mjerenja najbolje je koristiti staklene ili plastične kivete, jer se boja veže na kvarcne kivete.

Tablica 2.1. Usporedba Biuret, Lowry i Bradford metode [25]

METODA	OSJETLJIVOST	TOČNOST	INTERFERENCIJE
Biuret	0-1 mg	Visoka, ne ovisi o sastavu aminokiselina	Amino skupine $(NH_4)_2SO_4$
Lowry	0-0,1 mg	Djelomično ovisna o sastavu aminokiselina	Kiseline, EDTA, DTT, fenol, $(NH_4)_2SO_4$
Bradford	0-0,01 mg	Ovisi o sastavu aminokiselina	Detergenti (SDS, Triton X-100)

2.5. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati osjetljivost najčešće primjenjivanih metoda za određivanje koncentracije proteina s obzirom na vrstu i količinu analiziranog uzorka.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom radu provedeno je određivanje koncentracije proteina najčešće korištenim kolorimetrijskim metodama: Biuret, Lowry i Bradford metoda. Proteini su određeni pomoću UV/VIS spektrometrije.

3.1. UZORCI

Za određivanje koncentracije proteina korišteni su humani uzorci, tj. HeLa stanice u dvije različite koncentracije: 1,5 x10^6 st/mL i 2x10^6 st/mL.

HeLa stanice predstavljaju prvu ljudsku liniju besmrtnih stanica, koja je uzgojena 1951. godine. Naziv su dobile prema inicijalima Henriette Lacks, žene oboljele od karcinoma vrata maternice, a iz uzorka njezina tkiva uzgojene su ove stanice. Stanice su brzo rasle i bile su otporne te kao takve doprinijele su razvoju znanosti i medicine [26].

HeLa stanice uzgojene su na Medicinskom fakultetu u Osijeku i nisu tretirane nikakvim kemikalijama.

3.2. KEMIKALIJE

Tijekom izolacije proteina iz stanice korišten je gotovi pufer za lizu stanica koji sadrži:

- otopina 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonske kiseline, HEPES, 50 mM
- otopina natrijeva klorida, 150 mM
- otopina etilendiamintetraoctene kiseline, EDTA, 1 mM
- otopina etilen glikol-bis(β-aminoetil eter)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetraoctene kiseline, EGTA, 0,2 mM
- glicerol, 10%
- Triton X-100, 1%
- Koktel inhibitora proteaza

Pri određivanju koncentracija proteina korištene su sljedeće kemikalije i otopine:

- bakrov(II) sulfat, T.T.T. d.o.o.

- Bradford reagens (BioRad)
- Coomasie Brilliant Blue R-250, J. T. Baker
- etanol, 95%, Sladorana Županja
- etanol, 70%
- Folin-Ciocalteuov reagens (Reagecon Shannon Free Zone
- fosforna kiselina, 85%, Carlo Erba Dasit Group
- goveđi serumski albumin (eng. *bovine serum albumin*, BSA), VWR
- otopina BSA, 1 mg/ml i 100 mg/mL
- kalijev jodid, BDH Prolabo
- natrijev azid, VWR
- otopina natrijeva azida, 1,5 mM
- natrijev hidroksid, T.T.T. d.o.o.
- otopina natrijeva hidroksida, 6 M
- otopina natrijeva hidroksida, 0,1 M
- natrijev, kalijev-tartarat, Gram-mol d.o.o.
- natrijev karbonat, Kemika

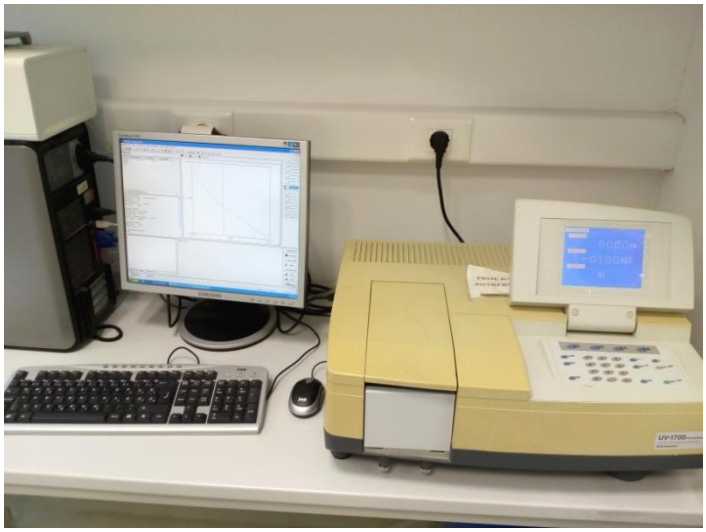
3. 3. UREĐAJI I PRIBOR

- centrifuga- Tehtnica Centric 200R
- vortex mješalica- Minishaker MS2 IKA
- spektrofotometar- Shimadzu UV-1700 PharmaSpec (slika 3.14.)
- mikropipete- 0,5-10 µL (Eppendorf)
    - 10-100 µL (Hirschmann)
    - 0,5-5,0 mL (LLG Micropipette)
- analitička vaga- Kern EW 420-3NM
- vodena kupelj- Memmert

Ostali pribor:

- Eppendorf epruvete
- odmjerne tikvice

- laboratorijske čaše
- trbušaste pipete
- graduirane pipete



Slika 3.14. Korišteni spektrofotometar Shimadzu UV-1700 PharmaSpec

3.4. PRIPREMA UZORAKA I IZOLACIJA PROTEINA

Za dezinfekciju radne površine i pribora korišten je 70 % etanol.

Uzgojene HeLa stanice prenesene su u epruvete i centrifugirane pri 1100 okretaja/min na temperaturi od 4 ºC tijekom 6 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant se uklanja, a talog se ispere sterilnom vodom i ponovno centrifugira pri istim uvjetima. Supernatant se uklanja, a talogu se dodaje 1 ml pufera za lizu, sve se promiješa na vortex miješalici i ostavi stajati na ledu 5 min. Uzorak se potom centrifugira 15 min na 14 000 okr/min i 4 ºC. Supernatant se alikvotira u Eppendorf epruvete i pohrani u ledenicu na -20°C.

3.5. METODE ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE PROTEINA

3.5.1. Biuret metoda

Priprema Biuret reagensa I

1,5 g bakrova(II) sulfata otopi se u 250 mL destilirane vode. U nastalu otopinu doda se 4,5 g kalij, natrij-tartarata i 2,5 g kalijeva jodida. Kada se sve otopi, dodaje se 50 mL 6M otopine natrijeva hidroksida i razrijedi se do ukupnog volumena od 500 mL. Nastala otopina je intenzivno plave boje (slika 3.15.). Reagens je stabilan do 6 mjeseci uz čuvanje u polietilenskoj boci na sobnoj temperaturi.

Priprema Biuret reagensa II (blank)

Otopina se priređuje na gotovo isti način kao prethodni reagens, ali bez dodavanja bakrova(II) sulfata. Reagens je bezbojan (slika 3.15.).

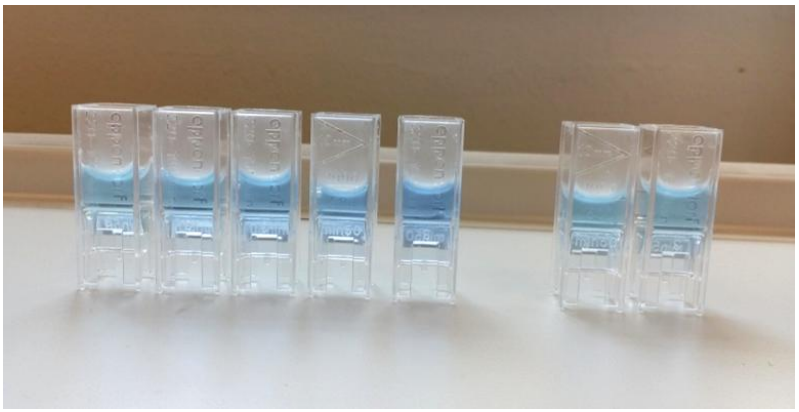


Slika 3.15. Biuret reagens I (lijeva odmjerna tikvica) i Biuret reagens II (desna odmjerna tikvica)

Priprema otopina proteinskog standarda

Kao standard koristi se goveđi serumski albumin, BSA. Otopina BSA koncentracije 100 mg/mL razrijedi se odgovarajućom količinom vode tako da se dobije serija otopina različitih koncentracija u rasponu od 20-100 mg/mL.

U osam epruvete ulije se 5 mL otopine Biuret reagensa I, a zatim se redom dodaje po 100 µL otopina proteinskog standarda. U jednu epruvetu ulije se 100 µL destilirane vode i to služi kao slijepa proba. U posljednje dvije epruvete ulije se po 100 µL uzoraka (slika 3.16.). Otopine se promiješaju. Na isti način napravi se serija otopina s Biuret reagensom II (blank) (slika 3.17.). Otopine se ostave na sobnoj temperaturi 30 minuta, a nakon toga se pomoću spektrofotometra mjeri apsorbancija na 540 nm u plastičnim kivetama.



Slika 3.16. Serija otopina s Biuret reagensom I

(slijeva: otopine standarda 20, 40, 60, 80 i 100 mg/mL, otopine uzoraka iz stanica)



Slika 3.17. Serija otopina s Biuret reagensom II

(slijeva: otopine standarda 20, 40, 60, 80 i 100 mg/mL, otopine uzoraka iz stanica)

3.5.2. Lowryjeva metoda

Priprema Lowryjeva ili alkalnog bakrenog reagensa

Alkalni bakreni reagens sastoji se od triju otopina:

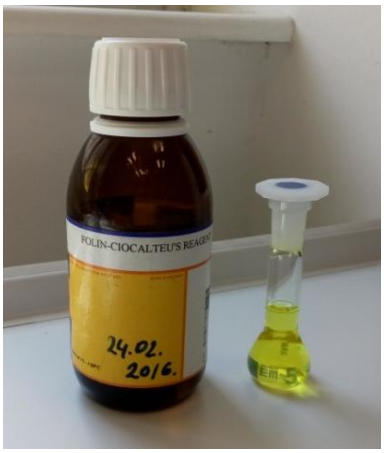
A) 2% otopina natrijeva karbonata u 0,1 M natrijevom hidroksidu (priprema se otapanjem 1 g soli u 0,1 M natrijevom hidroksidu)

B) 1% otopina bakrova sulfata (priprema se otapanjem 0,1 g soli u 10 mL destilirane vode)

C) 2% otopina natrij, kalij-tartarata (priprema se otapanjem 0,2 g soli u 10 mL destilirane vode).

U 50 mL otopine A dodaje se 0,5 mL otopine B i 0,5 mL otopine C. Reagens mora biti svježe pripremljen neposredno prije mjerenja.

Komercijalni Folin-Ciocalteuov reagens razrijedi se destiliranom vodom u omjeru 1:1 neposredno prije uporabe (slika 3.18.).



Slika 3.18. Korišteni Folin-Ciocalteuov reagens
i Folin-Ciocalteuov reagens razrijeđeni vodom u omjeru 1:1 (odmjerna tikvica)

Kao standard korištena je otopina BSA (γ= 1 mg/mL), iz koje se priredi serija otopina proteina poznate koncentracije tako da ukupni volumen otopine proteina i destilirane vode

bude 100 µL. Otpipetira se po 100 µL uzorka proteina iz HeLa stanica (ne razrjeđuje se vodom), a kao slijepa proba koristi se destilirana voda. U epruvete se ulije po 1 mL alkalnog bakrenog reagensa i smjesa se promiješa na vortex mješalici, a zatim ostavi stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta, u epruvete se ulije po 100 µL razrijeđenog Folin-Ciocalteau reagensa i ponovno se dobro promiješa na vortex mješalici. Epruvete se stave u vodenu kupelj 15 minuta pri temperaturi od 37 ºC, nakon čega se pomoću spektrofotometra mjeri apsorbancija otopina pri valnoj duljini od 595 nm u plastičnim kivetama.

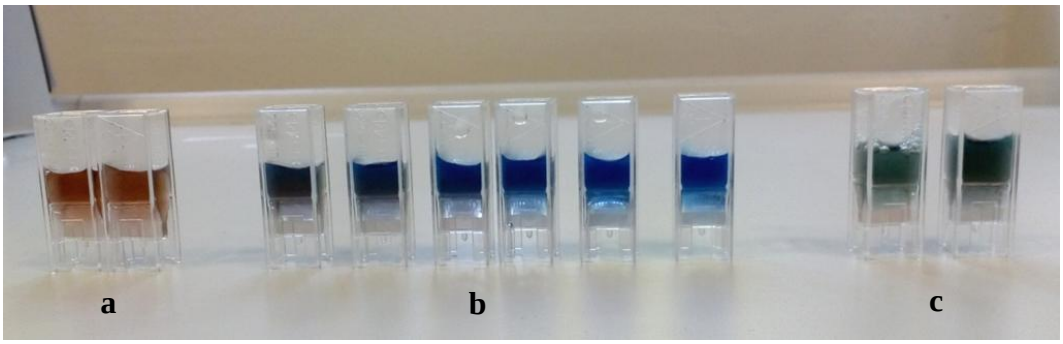
Količina proteina izoliranih iz HeLa stanica izračunava se pomoću dobivenog baždarnog dijagrama.

3.5.3. Bradford metoda

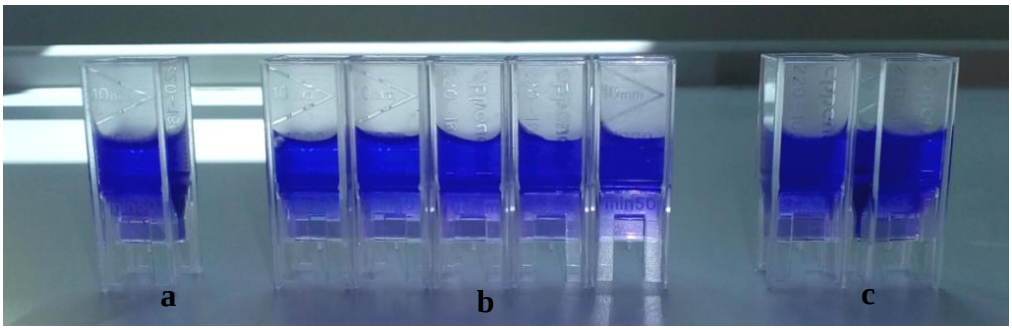
Priprema Bradford reagensa

Bradford reagens komercijalno je dostupan, ali moguće ga je jednostavno pripraviti. Reagens se priprema otapanjem 50 mg boje CBB G-250 u 25 mL etanola (95%). Kad se boja potpuno otopi, dodaje se 50 mL fosforne kiseline (85%). Nastala smjesa razrijedi se destiliranom vodom do ukupnog volumena od 500 mL i filtrira se. Reagens je crveno-smeđe boje.

Mjerenja su provedena uz korištenje komercijalnog Bradford reagensa i uz korištenje pripremljenog Bradford reagensa, ali umjesto boje Coomassie Brilliant Blue G-250, korištena je Coomassie Brilliant Blue R-250. Dodatkom komercijalnog Bradford reagensa, koji je smeđe boje, u otopinu proteina, dolazi do promjene boje u plavu (slika 3.19.); dok se korištenjem osobno pripremljenog reagensa takva promjena ne događa jer je sam reagens intenzivno plave boje (slika 3.20.).



Slika 3.19. Serija otopina s komercijalnim Bradford reagensom. Slijeva na desno:
a) dvije kivete sa slijepom probom,
b) šest kiveta sa standardima od najniže koncentracije proteina prema višoj,
c) dvije kivete s uzorcima proteina iz HeLa stanica.



Slika 3.20. Standardni niz za Bradford metodu uz korištenje Bradford reagensa koji sadrži boju Coomassie Brilliant Blue R-250. Slijeva na desno:
a) kiveta sa slijepom probom,
b) pet kiveta sa standardima od najniže koncentracije proteina prema višoj,
c) dvije kivete s uzorcima proteina iz HeLa stanica.

Kao standard korištena je otopina BSA (γ= 1 mg/mL) pomoću koje se priredi serija otopina koje sadrže različite količine proteina, otopinama je dodana određena količina destilirane vode do ukupnog volumena 100 µL. Pri mjerenju s komercijalnim Bradford reagensom, korišteno je 50 µL otopine proteina iz HeLa stanica, u koju je dodano 50 µL destilirane vode; dok se pri mjerenju s izmijenjenim Bradford reagensom koristilo 100 µL uzorka proteina i nije dodavana voda. Zatim se u pripremljeni niz otopina i u uzorke proteina izoliranih iz HeLa stanica dodaje po 1 mL Bradford reagensa. Kao slijepa proba koristi se destilirana voda u koju se također dodaje Bradford reagens. Nakon inkubacije u trajanju od 20-30 min na sobnoj temperaturi mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm u plastičnim kivetama.

Količina izoliranih proteina izračunava se pomoću dobivenog baždarnog dijagrama.

3.6. STATISTIČKA ANALIZA

Podatci dobiveni u ovom radu obrađeni su u statističkom programu STATISTICA 13.1. (Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA).

4. REZULTATI

4.1. BIURET METODA

Mjerenje apsorbancija provedeno je uz Biuret reagens I (BR I) i Biuret reagens II (BR II). Vrijednosti izmjerenih apsorbancija otopina proteinskog standarda u koju je dodan Biuret reagens II oduzimaju se od apsorbancija otopina standarda s Biuret reagensom I, prema izrazu:

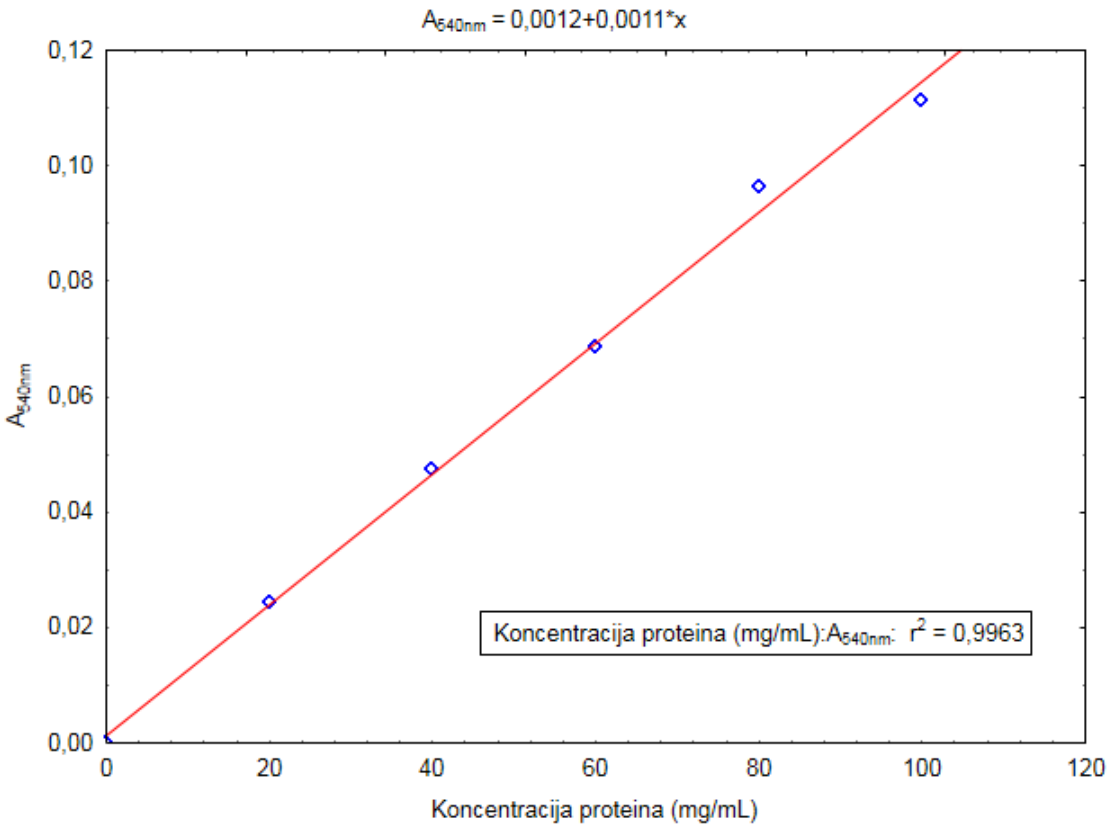
ΔA_{540nm} Standard = A_{540nm} (Std+BR I) - A_{540nm} (Std +BR II)

Na isti način izračunava se razlika apsorbancija uzoraka proteina iz HeLa stanica:

ΔA_{540nm} Uzorak =A_{540nm} (Uzorak+BR I) - A_{540nm} (Uzorak+ BR II)

Iz izračunatih apsorbancija standarda crta se baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji proteina u uzorku. Na temelju jednadžbe nacrtanog dijagrama računa se nepoznata koncentracija proteina u uzorcima.

Jednadžba pravca glasi: A_{540nm}= 0,0012 + 0,0011*x, u kojoj x predstavlja koncentraciju proteina u otopini izraženu u mg/mL.



Slika 4.21. Baždarni dijagram za Biuret metodu

Korištene su otopine standarda sljedećih koncentracija: 20, 40, 60, 80 i 100 mg/mL.

Mjerenja su provedena dva puta, a izmjerene apsorbancije prikazane su u tablicama 4.2. i 4.3.. Izračunate su srednje vrijednosti apsorbancija otopina uzorka s Biuret reagensom I, a zatim i srednje vrijednosti apsorbancija s Biuret reagensom II. Razlika apsorbancija otopina uzoraka izračunata je oduzimanjem srednjih vrijednosti apsorbancija uzorka s BR II od srednjih vrijednosti apsorbancija uzorka s BR I, a iz dobivene razlike apsorbancija izračunate su koncentracije proteina u stanicama.

Tablica 4.2. Apsorbancije otopina proteina s Biuret reagensom I

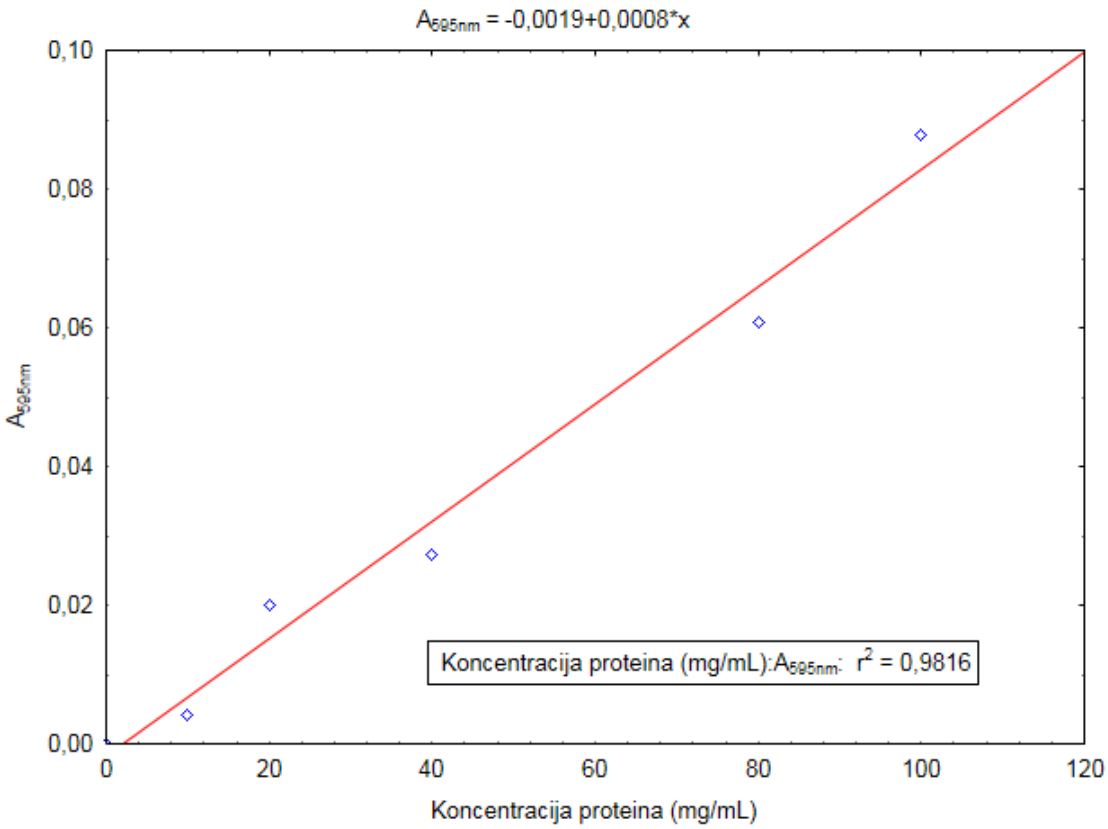
UZORAK	$A_{540\ nm}$ (1.mjerenje)	$A_{540\ nm}$ (2.mjerenje)	$\bar{A}_{540\ nm}$
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $1,5x10^6$ st/mL	0,0334	0,0393	0,03635
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $2,0x10^6$ st/mL	0,0234	0,0369	0,03015

Tablica 4.3. Apsorbancije otopina proteina s Biuret reagensom II

UZORAK	$A_{540\ nm}$ (1.mjerenje)	$A_{540\ nm}$ (2.mjerenje)	$\bar{A}_{540\ nm}$
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $1,5x10^6$ st/mL	-0,027	0,0074	-0,0098
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $2,0x10^6$ st/mL	-0,0125	-0,0106	-0,01155

4.2. LOWRYJEVA METODA

Baždarni dijagram nacrtan je pomoću izmjerenih apsorbancija serija standarda BSA, a jednadžba pravca glasi: A_{595nm}= -0,0019 + 0,0008*x, gdje x predstavlja koncentraciju proteina u otopini izraženu u mg/mL.



Slika 4.22. Baždarni dijagram za Lowryjevu metodu

Korištene su otopine standarda sljedećih koncentracija: 10, 20, 40, 80 i 100 mg/mL.

Izmjerene apsorbancije, pomoću kojih je izračunata koncentracija proteina iz stanica, prikazane su u sljedećoj tablici.

Tablica 4.4. Izmjerene apsorbancije otopina proteina iz HeLa stanica

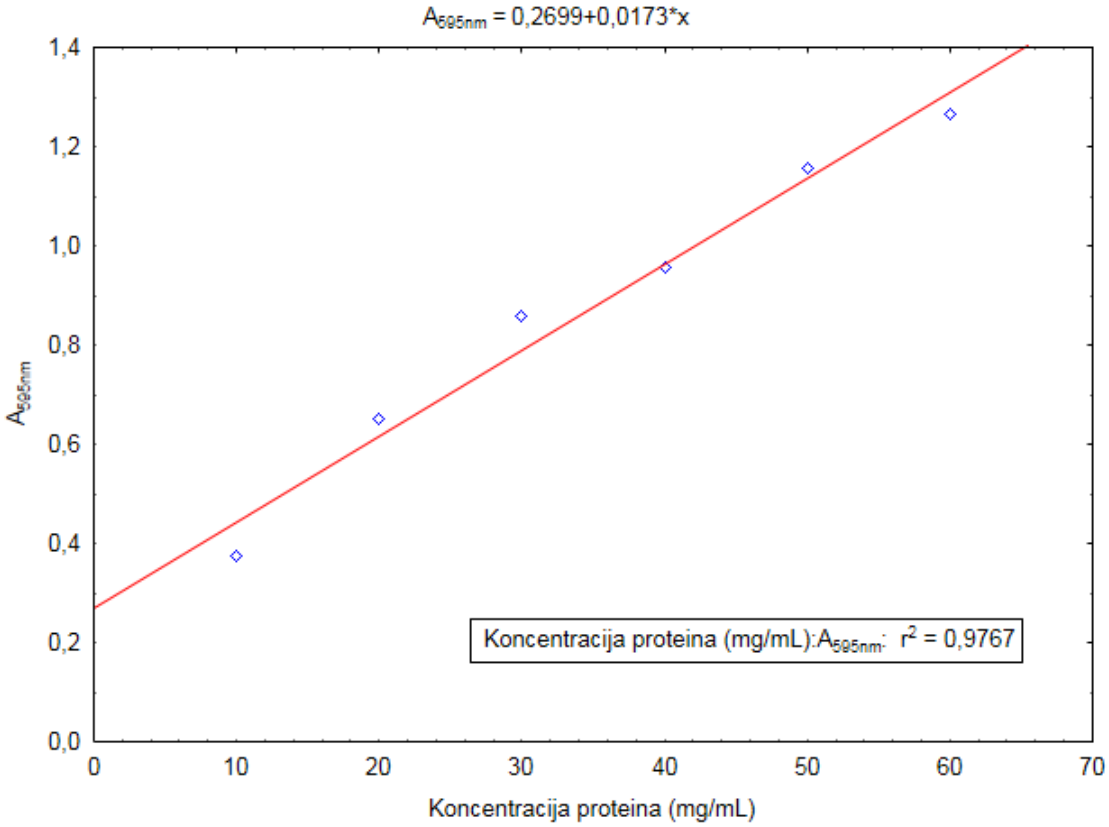
UZORAK	$A_{595\ nm}$
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $1,5x10^6$ st/mL	0,0393
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $2,0x10^6$ st/mL	0,0658

4.3. BRADFORD METODA

Mjerenja su provedena s gotovim, komercijalnim reagensom, te s verzijom Bradford reagensa koji umjesto boje CBB G-250, sadrži CBB R-250.

Mjerenja provedena uz korištenje komercijalnog Bradford reagensa

Baždarni dijagram za mjerenja provedena uz komercijalni Bradford reagens prikazan je na slici 4.20., a jednadžba pravca glasi: A_{595nm}= 0,2699 + 0,0173*x, gdje x predstavlja koncentraciju proteina u otopini izraženu u mg/mL.



Slika 4.23. Baždarni dijagram za Bradford metodu s komercijalnim reagensom.

Korištene su otopine standarda sljedećih koncentracija: 10, 20, 30, 40, 50 i 60 mg/mL.

Uzorci proteina razrijeđeni su, tako da se u kivetu ulije 50 µL otopine proteina i 50 µL destilirane vode. U sljedećoj tablici prokazane su vrijednosti izmjerenih apsorbancija, iz kojih su izračunate koncentracije proteina izoliranih iz HeLa stanica, uz faktor razrjeđenja 2.

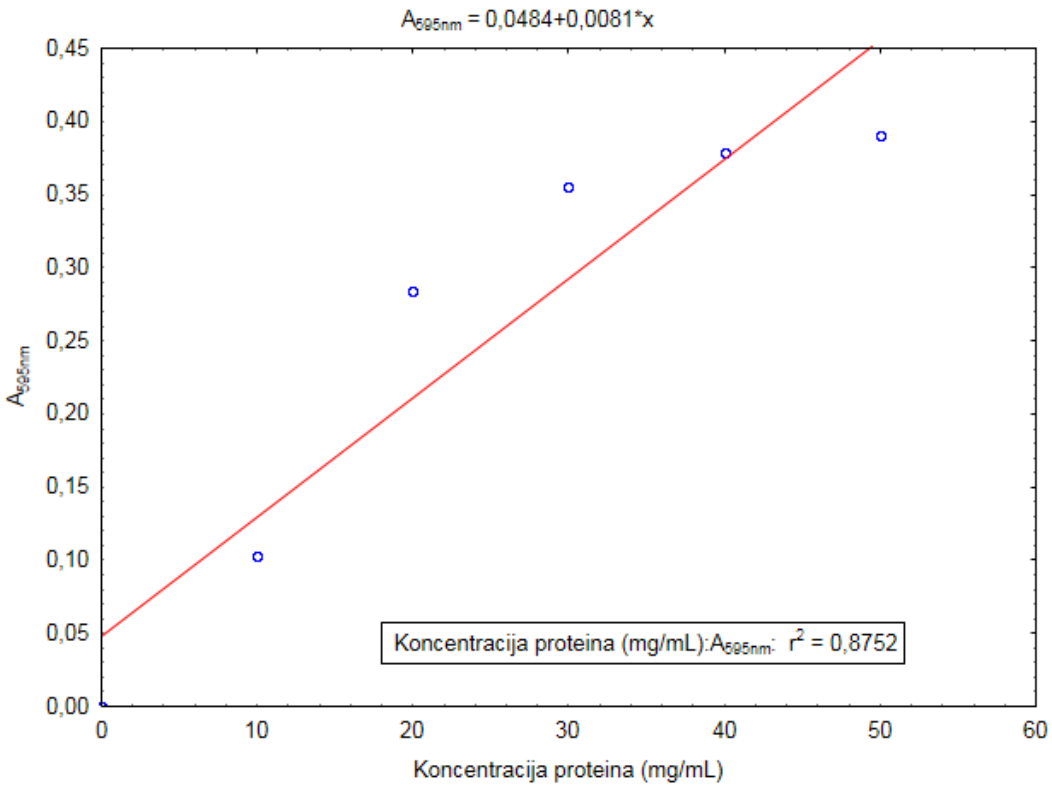
Tablica 4.5. Izmjerene apsorbancije otopina proteina iz HeLa stanica uz korištenje komercijalnog Bradford reagensa

UZORAK	$A_{595\ nm}$
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $1,5x10^6$ st/mL	0,3130
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $2,0x10^6$ st/mL	0,5289

Mjerenja provedena uz korištenje Bradford reagensa koji sadrži boju Coomassie Brilliant Blue R-250

Bradford reagens pripremljen s bojom Coomassie Brilliant Blue R-250 intenzivno je plave boje. Niz otopina standarda prikazan je na slici 3.20. Sve otopine plave su boje i teško je uočiti razliku u nijansama, za razliku od standardnog niza napravljenog uz komercijalni reagens.

Uzorci proteina nisu razrijeđeni tijekom mjerenja s drugom verzijom Bradford reagensa, a mjerenja su provedena dva puta, te se kod izračuna koncentracije proteina u uzorcima koristila srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija. Jednadžba pravca glasi: A_{595nm}= 0,0484 +0,0081*x, gdje x predstavlja koncentraciju proteina izraženu u mg/mL.



Slika 4.24. Baždarni dijagram za Bradford metodu s reagensom koji sadrži CBB R-250.

Korištene su otopine standarda sljedećih koncentracija: 10, 20, 30, 40 i 50 mg/mL.

Vrijednosti izmjerenih apsorbancija prikazane se u Tablici 4.6., a koncentracije proteina izračunate su korištenjem srednje vrijednosti apsorbancija izmjerenih u prvom i drugom mjerenju.

Tablica 4.6. Izmjerene apsorbancije otopina proteina uz korištenja reagensom koji sadrži CBB R-250

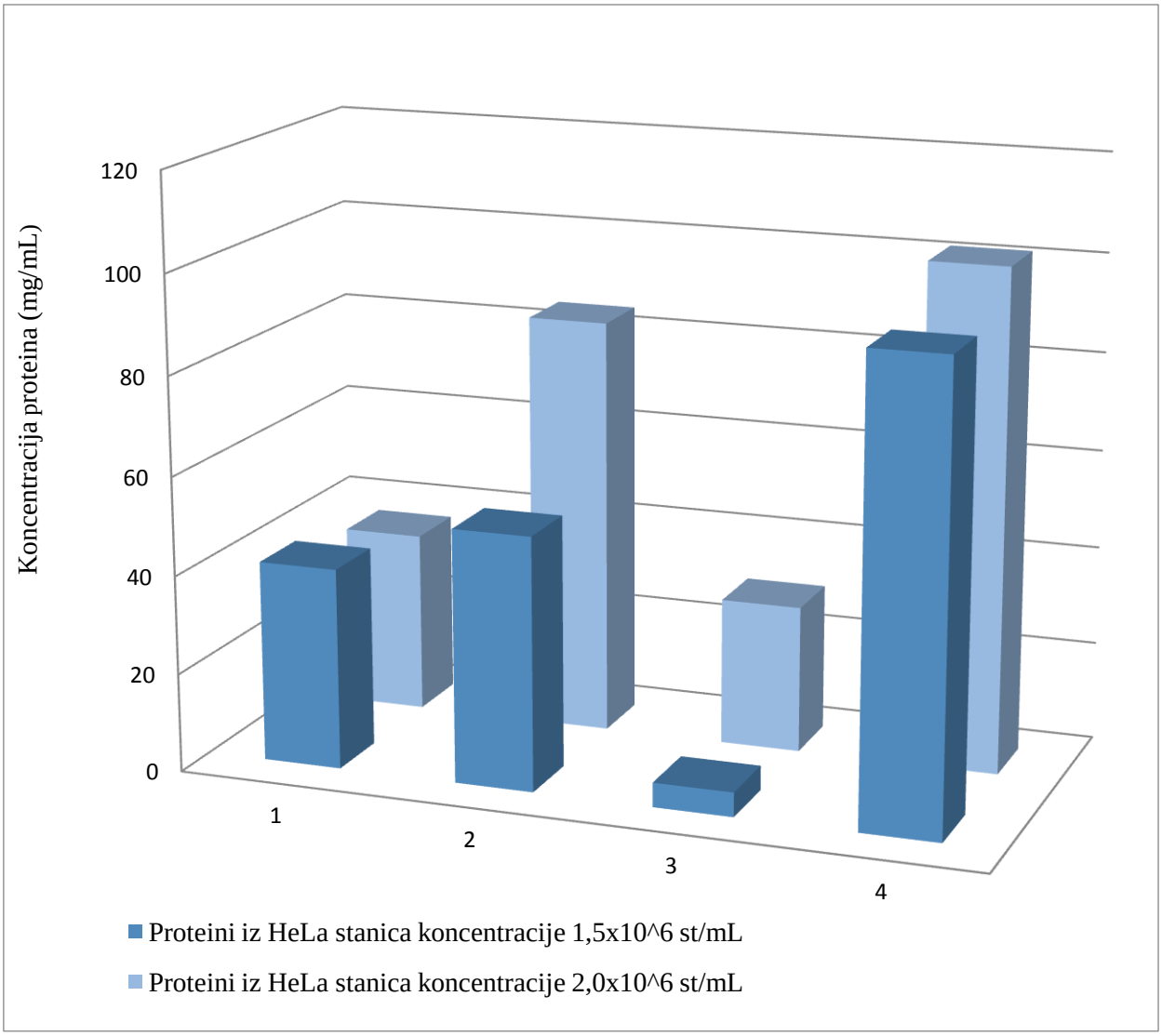
UZORAK	**$A_{595\ nm}$ (1. mjerenje)**	**$A_{595\ nm}$ (2. mjerenje)**	**$\bar{A}_{595\ nm}$**
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $1,5x10^6$ st/mL	0,7987	0,8115	0,8051
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $2,0x10^6$ st/mL	0,8610	0,8842	0,8726

4.4. USPOREDBA METODA

Koncentracije proteina izoliranih iz HeLa stanica izračunate su pomoću prethodno prikazanih izmjerenih apsorbancija i odgovarajućih jednadžba pravaca određenih za svaku metodu, a rezultati su prikazani u tablici 4.8.

Tablica 4.8. Usporedba izračunatih koncentracije proteina iz HeLa stanica. Rezultati su grafički prikazani na slici 4.25.

	KONCENTRACIJE PROTEINA(mg/mL)			
	Biuret metoda	**Lowryjeva metoda**	**Bradford metoda**	
			Uz komercijalni Bradford reagens	Uz pripremljeni Bradford reagens
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $1,5x10^6$ st/mL	40,86	51,50	4,98	93,42
Proteini iz HeLa stanica koncentracije $2,0x10^6$ st/mL	36,82	84,63	29,94	101,75



Slika 4.25. Koncentracija proteina izmjerena u HeLa stanicama ovisno o korištenoj metodi za određivanje koncentracije proteina.

1) Biuret metoda;
2) Lowry metoda;
3) Bradford metoda;
4) Bradford metoda uz primjenu CBB R-250 boje

5. RASPRAVA

Izbor metode za određivanje koncentracija proteina ovisi o količini i prirodi analiziranih proteina, prisutnosti interferirajućih tvari te potrebnoj osjetljivosti. Kvantifikacija ukupnih proteina uobičajena je i rutinska tehnika u znanstvenim istraživanjima i medicinskoj praksi, gdje je ključan izbor odgovarajuće metode.

U ovom radu korištene su tri najčešće kolorimetrijske metode za određivanje koncentracije proteina: Biuret, Lowry i Bradford metoda. Zajednička karakteristika ovih metoda je korištenje UV/VIS spektroskopije kojom se može brzo i jednostavno odrediti količina proteina. Uzorci korišteni za određivanje ukupnih proteina su HeLa stanice, tj. stanice humanog karcinoma grlića maternice. Stanice su uzgojene u dvije koncentracije, $1{,}5x10^6$ i $2{,}0x10^6$ st/mL.

Nedostatak kolorimetrijskih metoda je to što različiti proteini imaju različite apsorbancije, pa tako dok se kao standard ne koristi isti protein kao onaj koji se analizira, točnost rezultata bit će relativna. Najčešće se kao standard koristi goveđi serumski albumin, koji se godinama koristi u tu svrhu, pa je tako lakše uspoređivati nova i starija istraživanja. BSA je najčešće korišteni standard jer je jeftin i dostupan u čistom obliku. Međutim, on može dovesti do jakog vezanja boje u Bradford metodi i time uzrokovati nedovoljno točno određivanje koncentracije proteina u uzorku. Umjesto BSA, kao standard moguće je koristiti goveđi imunoglobulin G. Iako je njegova primjena znatno rjeđa, daje višu srednju vrijednost apsorbancije i pojačava vezivanje bakrenih iona za protein u Biuret i Lowry metodi [27].

Prema prikazanim rezultatima, Biuret metoda ukazuje na najniže koncentracije proteina u HeLa stanicama (prema srednjoj vrijednosti mjerenja 40,86 mg/mL i 36,82 mg/mL). Ovakav rezultat može se objasniti niskom osjetljivošću ove metode, što je ujedno i najveći nedostatak ove metode. Osim toga, koncentracija proteina u HeLa stanicama koncentracije $1{,}5x10^6$ st/ml veća je od koncentracije proteina u stanicama koncentracije $2x10^6$ st/ml. Ljudski faktor prilikom pipetiranja uzorka mogući je uzrok ove anomalije u rezultatima Biuret metode. Prednost ove metode je jednostavna priprema reagensa, koji nije toliko podložan interferencijama kao Bradford ili Lowryjev reagens [28].

Lowryjevom metodom određene su koncentracije proteina 51,50 mg/mL i 84,63 mg/mL, koje su gotovo dvostruko veće od koncentracija određenih Biuret metodom. Korištenje Folin-Ciocalteu reagensa zaslužno je za puno veću osjetljivost Lowryjeve metode u usporedbi s Biuret metodom. Osim toga, izvedba Lowryjeve metode je

jednostavnija nego kod Biuret metode. No, i Lowryjeva metoda ima nedostatke, a to je mogućnost reagiranja s raznim drugim tvarima, kao što su glukoza, urea, nezasićeni alifatski spojevi, sulfidi, vodikov peroksid, aromatski amini itd. [29].

Bradford metoda uz korištenje reagensa, koji sadrži CBB R-250, ukazuje na najveće koncentracije proteina u uzorcima (93,42 mg/mL i 101,75 mg/mL), dok su korištenjem komercijalnog Bradford reagensa izmjerene koncentracije proteina 4,98 mg/mL i 29,94 mg/mL, koje su niže od koncentracija izmjerenih Lowryjevom i Biuret metodom, što je suprotno očekivanjima i činjenici da je Bradford metoda najosjetljivija od ovih triju metoda.

Baždarni dijagram kod Bradford metode uz korištenje boje CBB R-250 pokazuje odstupanje od linearnosti, što je česta pojava kod ove metode ako se kao standard koristi goveđi serumski albumin [30]. Rezultate je ponekad moguće linearizirati grafičkim prikazom ovisnosti logaritma apsorbancije i logaritma količine proteina [27]. Boja CBB R-250 ima širu upotrebu i veću osjetljivost od CBB G-250 [31], što je mogući razlog različitih rezultata. Prema [32] osjetljivost CBB R-250 je 50-100 ng/lancu, a CBB G-250 8-10 ng/lancu, što je razlog češće upotrebe CBB R-250 za bojanje proteina tijekom elektroforeze.

Razlog različite boje reagensa pripremljenog s bojom CBB R-250 i komercijalnog reagensa je u maksimumu apsorpcije. U kiseloj otopini stabilan je kationski oblik CBB G-250 koji ima maksimum apsorpcije pri valnoj duljini od 460 nm što odgovara smeđoj boji, a za CBB R-250 maksimum je na 555 nm pa je zbog toga reagens plave boje. Vezanjem pozitivno nabijenih proteina dolazi do primjene pK_a [33] i pomaka apsorpcijskog maksimuma, kod komercijalnog reagensa pomak na 595 nm, a za reagens s bojom CBB R-250 na 549 nm [34]. Zbog tako male razlike u maksimumu apsorpcije kod boje CBB R-250, nije moguće uočiti promjenu boje kao kod korištenja komercijalnog reagensa.

Osjetljivost Bradford metode na razne interferente, među kojima je i korišteni detergent Triton X-100 koji se nalazi u puferu za lizu stanica [18], te nestabilnost reagensa koji se mora čuvati na hladnom mogući su uzroci ovakvih rezultata. Također, Bradford metoda ovisi o redoslijedu aminokiselina u proteinu, te ako protein ne sadrži dovoljan broj argininski i aromatskih aminokiselinskih ostataka, boja se neće efikasno vezati na proteine, što će rezultirati određivanjem nižih koncentracija proteina od stvarne koncentracije. Boja se najviše veže na aminokiselinske ostatke lizina i arginina, a ne veže se na slobodne aminokiseline. Ova karakteristika Bradford metode glavni je njezin nedostatak te može

uzrokovati različit rezultat mjerenja za različite proteine. Originalna Bradford metoda pokazuje velike varijacije u odgovoru između različitih proteina [19].

Interferirajuće tvari moguće je ukloniti neutralizacijom, taloženjem ili dijalizom, na primjer, reakcija EDTA s ionima bakra može se suzbiti dodavanjem kalcijeva klorida, a problem s puferima, lipidima, detergentima i reducirajućim tvarima može se riješiti taloženjem proteina s protokatehuičnom kiselinom, acetonom ili trikloroctenom kiselinom, i zatim otapanjem proteina u pogodnom otapalu [27].

Uzorke proteina najbolje je čuvati smrznute na jako niskim temperaturama, ispod -40ºC, te izbjegavati odmrzavanje i ponovno zamrzavanje. Mjerenje Bradford metodom s komercijalnim reagensom zadnje je izvedeno, a uzorci su već jednom bili odmrznuti, pa bi uzrok niže koncentracije mogla biti degradacija proteina. Slobodne aminokiseline, peptidi i proteini male molekulske mase ne vežu se s bojom CBB. Masa peptida ili proteina treba biti veća od 3000 Da kako bi se oni mogli izmjeriti ovom metodom [35].

6. ZAKLJUČAK

Na temelji rezultata dobivenih određivanjem koncentracija proteina u HeLa stanicama trima metodama može se zaključiti sljedeće:

- modifikacija Bradford reagensa u kojem je umjesto CBB G-250 korištena boja CBB R-250 pokazala se učinkovitom i osjetljivom na proteine, a koncentracije izmjerene ovom metodom najveće su, ali uzrok toga može biti jako vezanje boje na proteine
- Lowryjeva metoda ima nešto manju osjetljivost od Bradford metode, dok Biuret metoda ima najmanju osjetljivost
- Bradford metoda uz korištenje komercijalnog reagensa ukazala je na najniže koncentracije proteina, razlog tomu može biti degradacija proteina ili su koncentracije određene drugim metodama previsoke zbog niske osjetljivosti kod Biuret metode i mogućih interferencija kod Lowryjeve metode

Iako je Bradford metoda najosjetljivija i najjednostavnija za izvedbu, prema dobivenim rezultatima Lowryjeva metoda pokazala se kao najpogodnijom metodom za određivanje koncentracije proteina izoliranih iz HeLa stanica.

U metodičkom dijelu obrađena je nastavna jedinica "Aminokiseline i proteini" prilagođena četvrtom razredu srednjoškolskog obrazovanja, kroz koju su učenicima približeni najvažniji pojmovi vezani za aminokiseline i proteine. Pokusi "Denaturiranje bjelanjka proteina" i "Biuret reakcija" izvedeni su u grupama, čime se potiče uključivanje učenika u izvedbu sata i zanimanje za nastavno gradivo, te se razvija sposobnost samostalnog zaključivanja i timskog rada.

7. METODIČKI DIO

7.1. UVOD

Cilj metodičkog dijela ovog diplomskog rada je upoznavanje učenika s pojmom aminokiseline i proteini, upoznavanje sa svojstvima aminokiselina, pojmom peptidne veze te strukturama i ulogama koje imaju proteini. Ova nastavna jedinica prikazana je na srednjoškolskoj razini.

Timski rad pokazao se kao djelotvorna metoda učenja, kako nastavnog gradiva tako i socijalnog ponašanja. U današnje vrijeme razvijena je svijest koliko je bitno kod djece poticati razvoj suradnje, dobre komunikacije, prijateljskog pristupa i miroljubivog načina rješavanja nesuglasica, a ne pusto "bombardiranje" informacijama kroz frontalnu nastavu. No, kako bi se gradivo uspješno obradilo, najbolja je kombinacija timskog rada i frontalne nastave, kako bi učenici ostali fokusirani.

Nastavnu jedinicu "Aminokiseline i proteini" lako je povezati sa svakodnevnim životom, te bi kao takva učenicima trebala biti prezentirana na zanimljiv način, a kroz timski rad i samostalne zaključke gradivo će biti lakše usvojeno. Takav način rada dovest će do veće uključenosti učenika u nastavu i boljeg razumijevanja gradiva, a time i do boljih rezultata.

Za izvođenje nastave potrebna je prostrana učionica opremljena osnovnim laboratorijskim priborom i kemikalijama. Nastavna jedinica može se povezati s gradivom biologije (enzimi).

7.2. PRIPREMA ZA NASTAVNI SAT

Srednja škola:	
Nastavnica:	Vedrana Sesar
Predmet:	Kemija
Razred:	
Redni broj sata:	
Nastavna cjelina:	Biomolekule
Nastavna jedinica:	Aminokiseline i proteini
Ključni pojmovi:	Aminokiseline, peptidna veza, peptidi, proteini, enzimi
Korelacija:	Biologija (enzimi)

Obrazovna postignuća:	
• razlikovati pojmove aminokiselina, peptid i protein • definirati pojam peptidna veza • navesti stupnjeve strukture proteina (primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna)	
Ishodi:	
Učenici će moći: • prikazati strukturu α-aminokiseline pomoću Fischerove projekcijske formule • objasniti važnu ulogu aminokiselina i proteina u organizmu • prikazati nastajanje dipeptida • objasniti nativnu konformaciju proteina • na temelju pokusa s bjelanjkom, objasniti pojmove koagulacije i denaturiranja proteina	
Pitanja za provjeru usvojenosti obrazovnih ishoda:	
• Što su esencijalne, a što neesencijalne aminokiseline? • Što je zwitterion i izoelektrična točka? • Što su i kako nastaju peptidi? • Koji su stupnjevi strukture proteina? • Što je nativna konformacija proteina? • Kako može doći do denaturiranja proteina? • Kojom test-reakcijom se mogu dokazati proteini?	
Tip sata:	Obrada novog gradiva
Cilj sata:	Usvojiti pojmove aminokiselina, peptid, protein, upoznati njihova svojstva i djelovanje

Tijek nastavnog sata

Aktivnosti nastavnika/nastavnice	Aktivnosti učenika/učenica	Nastavna sredstva i pomagala	Metode i oblici rada
1. **UVODNI DIO SATA** (5 minuta) • prije početka samog sata pripremiti sve za izvođenje pokusa • pozdravljanje razreda • nabrajanje asocijacija vezanih za pojam proteina i aminokiselina	Učenici se javljaju i odgovaraju na pitanja nakon što su prozvani.	ploča PPT prezentacija	razgovor, frontalni rad, individualni rad
2. OBRADA NOVOG GRADIVA (35 minuta) • objasniti pojam aminokiselina, te njihovu podjelu i svojstva • objasniti nastajanje peptidne veze, te razliku između peptida i proteina • objasniti stupnjeve	Zapisuju plan ploče u bilježnice.	Ploča Udžbenik PPT prezentacija	individualni rad, razgovor frontalni rad

strukture proteina • učenike podijeliti u 4 skupine i dati im radne listiće prema kojima će izvesti pokuse "Denaturiranje bjelanjka jajeta" i "Biuret reakcija"	Objašnjavaju promjene nastale u pokusima. Zapisuju opažanja u radni listić.	Radni listić	rad u skupinama, razgovor
3. ZAVRŠNI DIO SATA (5 minuta) • ponavljanje naučenog gradiva	Pismeno odgovaraju na pitanja. Čitaju rješenja zadataka.	Radni listić	individualni rad

Zadaci za učenike:	Domaća zadaća Radna bilježnica
Materijali za pripremu nastavnika:	Udžbenici propisani od strane MZOS-a, priručnik za nastavnike

Bilješke o nastavnom satu:

PLAN PLOČE:

Aminokiseline i proteini

AMINOKISELINE

- neesencijalne i esencijalne

- amfoternost, visoka tališta, topljivost u vodi

- dipolni ion-zwitterion

- izoelektrična točka

Peptidna veza

Peptidi: dipeptidi

polipeptidi (do 50 aminokiselina)

proteini

Struktura proteina:

1. **primarna** (slijed aminokiselina u proteinu)

2. **sekundarna** (prostorna građa polipeptidnog lanca nastala zbog vodikovih veza između bliskih peptidnih jedinica)

3. **tercijarna** (prostorni raspored udaljenih aminokiselina u proteinu, globularni proteini)

4. **kvaterna** (strukture proteina koji se sastoje od više polipeptidnih lanaca)

7.3. POKUS

7.3.1. POKUS 1: Denaturiranje bjelanjka jajeta

Pribor i kemikalije:

- 5 epruveta i stalak
- bjelanjak jajeta
- destilirana voda
- klorovodična kiselina
- natrijeva lužina
- otopina olovnog(II) nitrata
- aceton

Postupak:

Bjelanjak jajeta razrijedite jednakim volumenom destilirane vode i razdijelite u 5 epruveta. Sadržaj prve epruvete zagrijte, a u ostale redom ulijte po 2 mL klorovodične kiseline, natrijeve lužine, otopina olovnog(II) nitrata i acetona.

Opažanja:

Obrazloženje:

7.3.2. POKUS 1: Denaturiranje bjelanjka jajeta- rješenja

Pribor i kemikalije:

- 5 epruveta i stalak
- bjelanjak jajeta
- destilirana voda
- klorovodična kiselina
- natrijeva lužina
- otopina olovnog(II) nitrata
- aceton

Postupak:

Bjelanjak jajeta razrijedite jednakim volumenom destilirane vode i razdijelite u 5 epruveta. Sadržaj prve epruvete zagrijte, a u ostale redom ulijte po 2 mL klorovodične kiseline, natrijeve lužine, otopina olovnog(II) nitrata i acetona.

Opažanja:

U prvoj epruveti zagrijavanjem bjelanjka dolazi do njegova zgrušavanja. U ostalim epruvetama dodavanjem jake kiseline (klorovodična kiselina), jake baze (natrijeva lužina), soli teških metala (olovni(II) nitrat) i organskih otapala (aceton) došlo je do zgrušavanja bjelanjka. Od tekućih prozirnih proteina nastala je bijela čvrsta tvar.

Obrazloženje:

Zagrijavanjem proteina dolazi do koagulacije ili zgrušavanja. Dodatkom kiselina, lužina, organskih otapala i soli teških metala dolazi do promjene svojstava proteina, što se naziva denaturacijom. Denaturiranje izaziva promjenu strukture proteina i kidanje vodikove veze koje stabiliziraju proteinsku molekulu u prirodnoj konformaciji, a time se mijenjaju i svojstva proteina.

7.3.3. POKUS 2: Biuret reakcija

Pribor i kemikalije:

- epruveta
- otopina bjelanjka
- natrijeva lužina
- razrijeđena otopina bakrova(II) sulfata

Postupak:

U epruvetu ulijte malo otopine bjelanjka. Otopini dodajte 1 do 2 mL natrijeve lužine i 1 do 2 kapi razrijeđena otopina bakrova(II) sulfata. Sadržaj epruveta promućkajte. Promatrajte i zabilježite nastale promjene.

Opažanja:

Obrazloženje:

7.3.4. POKUS 2: Biuret reakcija- rješenja

Pribor i kemikalije:

- epruveta
- otopina bjelanjka
- natrijeva lužina
- razrijeđena otopina bakrova(II) sulfata

Postupak:

U epruvetu ulijte malo otopine bjelanjka. Otopini dodajte 1 do 2 mL natrijeve lužine i 1 do 2 kapi razrijeđena otopina bakrova(II) sulfata. Sadržaj epruveta promućkajte. Promatrajte i zabilježite nastale promjene.

Opažanja:

Dodatkom natrijeve lužine i razrijeđene otopine bakrova(II) sulfata u otopinu bjelanjka nastalo je crvenoljubičasto obojenje.

Obrazloženje:

Proteini s ionima dvovalentnog bakra u lužnatoj sredini daju crvenoljubičasto obojenje, a ta reakcija se koristi kao dokaz za prisustvo proteina i karakteristična je za sve spojeve s peptidnom vezom.

7.4. PRIMJER RADNOG LISTIĆA- Aminokiseline i proteini

1. Dopunite:

U vodenim otopinama aminokiseline su električki neutralne molekule, i to u obliku _____.

U proteinima se nalazi _____ aminokiselina, i sve su α-aminokiseline, osim _____.

Dva oblika sekundarne strukture proteina su: _____ i _____.

2. Nabrojite neke funkcije koje proteini obavljaju u živim organizmima.

3. Što je primarna struktura proteina i što o njoj ovisi?

4. Što je prostetička skupina i kako nazivamo proteine koji je sadrže? Navedite primjer.

5. Što je hemoglobin? Objasnite njegovu kvaternu strukturu.

7.5. PRIMJER RADNOG LISTIĆA- Aminokiseline i proteini- rješenja

1. Dopunite:

U vodenim otopinama aminokiseline su električki neutralne molekule, i to u obliku zwitteriona.

U proteinima se nalazi 20 aminokiselina, i sve su α-aminokiseline, osim prolina.

Dva oblika sekundarne strukture proteina su: α-uzvojnica i β-nabrana ploča.

2. Nabrojite neke funkcije koje proteini obavljaju u živim organizmima.

Proteini su građevni materijal organizma, sudjeluju u regulaciji metabolizma, prijenosu kisika, imunološkoj zaštiti, prijenosu genetičkih informacija, hormonskoj kontroli itd. Enzimi koji određuju tijek kemijskih reakcija u stanicama su također proteini.

3. **Što je primarna struktura proteina i što o njoj ovisi?**

Primarna struktura proteina je slijed aminokiselina u proteinskom lancu, a o njoj ovisi biološka funkcija proteina.

4. Što je prostetička skupina i kako nazivamo proteine koji je sadrže? Navedite primjer.

Prostetička skupina je neproteinski dio strukture proteina koja je povezana s jednom ili više aminokiselina proteina, a proteini koji je sadrže nazivaju se složenim ili konjugiranim proteinima. Primjer je protein mioglobin koji sadrži prostetički skupinu hem koja prima kisik iz krvi.

5. Što je hemoglobin? Objasnite njegovu kvaternu strukturu.

Hemoglobin je globularni protein koji se sastoji od 4 polipeptidna lanca ili podjedinice koji čine proteinski dio (globin), te 4 hema kao prostetičke skupine. Podjedinice su međusobno povezane nekovalentnim vezama. Hem sadrži dvovalentni ion željeza. Osnovna uloga hemoglobina je reverzibilno vezanje molekule kisika na željezo u hemu i njegovo prenošenje iz pluća u svaku stanicu.

KRATICE

A- apsorbancija

BCA (engl. *bicinchoninic acid assay*)- bicinkoninična kiselina

BSA (engl. *bovine serum albumin)*- goveđi serumski albumin

CBB G-250 - Coomassie brilliant blue G-250

CBB R-250- Coomasie Brilliant Blue R-250

DTT- ditiotreitol

EDTA - etilendiamintetraoctene kiseline,

EGTA- etilen glikol-bis(β-aminoetil eter)-*N,N,N',N'*-tetraoctena kiselina

HEPES- 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonska kiselina

HPLC (engl. *high-pressure liquid chromatography)* - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

SDS-PAGE (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) -natrijev dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza

SDS (engl. sodium dodecyl sulfate) - natrijev dodecilsulfat

LITERATURA

[1] J.M. Berg, J.T. Tymoczko, L. Stryer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013.

[2] https://www.google.hr/search?q=aminokiselina&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwifhd75xLbVAhWMIJoKHULBA50Q_AUICigB&biw=1440&bih=813#imgrc=z_K22bejTkWBzM: (20. 4. 2017.)

[3] D. L. Nelson, M. M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 4th edition

[4] J. G. Smith, Organic Chemistry, McGraw-Hill, New York, 2008.

[5] R. H. Garrett, C. M. Grisham, Biochemistry, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, 2013.

[6] M. K. Campbell, S. O. Farrell, Biochemistry, Cengage Learning, Stamford, 2015.

[7] K. Wilson, J. Walker, Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, Cambridge University Press, Cambridge, 2010.

[8] R. Katoch, Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Springer, New York, 2011.

[9] I.M. Rosenberg, Protein Analysis and Purification: benchtop techniques, Springer Science+Business Media, New York, 1996.

[10] I. Piljac, Elektroforeza, Media Print, Zagreb, 2006.

[11] I. Strelec, T. Kovač, Praktikum iz biokemije, PTF Osijek, Osijek, 2013.

[12] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, Fundamentals of Analytical Chemistry, Brooks/Cole, Cengage Learning,Belmont, 2014.

[13] K. D. McClatchey, Clinical Laboratory medicine, Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002.

[14] E. Buxbaum, Fundamentals of Protein Structure and Function, Springer, 2007.

[15] http://studylib.net/doc/8788015/spectrophotometric-determination-of-total-protein (27.7.2017.)

[16] C. Dennison, A Guide to Protein Isolation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2003.

[17] Grupa autora, Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2007

[18] M. M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry 72, 1976., str. 248-254

[19] https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/20279 (25.7.2017.)

[20] file:///C:/Users/Acer/Downloads/Coomassie_blue_info.pdf (29.7.2017.)

[21]http://what-when-how.com/molecular-biology/coomassie-brilliant-blue-molecular-biology (29.7.2017.)

[22] J. M. Walker, The Protein Protocols Handbook, Humana Press, New Jersey, 1996

[23]http://www.bmglabtech.com/en/applications/application-notes/by-detection-mode/169-old-assays-new-instrument-elisa-nadh-and-nadph-conversion-dna-and-protein-quantitation-obj-92-829.html (29.7.2017.)

[24] http://patofyziologie.lf1.cuni.cz/file/917/protein-determination-methods.pdf (10.7.2017.)

[25] M. Vrsanska, V. Kumbar, A comparison of Biuret, Lowry and Bradford methods for measuring the egg's proteins, dostupno na:

https://mnet.mendelu.cz/mendelnet2015/articles/62_vrsanska_1167.pdf (12.7.2017.)

[26] A. J. Tobin, J. Dusheck, Asking about Life, Thomson, Brooks/Cole, 2005.

[27] M. P. Deutscher, Guide to Protein Purification, Academic Press, London, 1990.

[28] G. Walsh, Proteins: Biochemistry and Biotechnology, John Wiley & Sons ltd, West Sussex, 2002.

[29] J. R. Norris, D. W. Ribbons, Methods in Microbiology, Academic Press Inc., London, 1971

[30] P. S. Bisen, Laboratory Procotols in Applied Life Sciences, CRC Press, 2014.

[31] http://www.berthold-jp.com/pdf/coomassie_blue.pdf (31.7.2017.)

[32] W. V. Bienvenut, Acceleration and Improvement of Protein Identification by Mass Spectrometry, Springer, Dordrecht, 2005.

[33] R. K. Scopes, Protein Purification, Principles and Practice, Springer, 1994.

[34]https://www.applichem.com/en/shop/product-detail/as/coomassiereg-brillantblau-r-250-ci-42660/ (31.7.2017.)

[35] http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm (31.7.2017.)

[36] https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-1505-7_3 (10.7.2017.)

ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Ime i prezime: Vedrana Sesar

Adresa: Z. Frankopana 10 b, Otok, Hrvatska

e-mail: vedrana.sesar@hotmail.com

Datum rođenja: 28. 7. 1993.

RADNO ISKUSTVO

29. 5. 2017.-	studentski posao u trgovini Pepco, Vinkovci
1.3. 2017.- 25. 5. 2017.	individualne poduke iz kemije u Centru znanja, Vinkovci
10. 11. 2015.- 1. 3. 2016.	održavanje individualnih poduka učenicima s teškoćama u učenju u sklopu programa "Dokkica-moja podrška", Osijek

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2015.-	Diplomski studij kemije na Odjelu za kemiju, Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
2012.-2015.	Preddiplomski studij kemije na Odjelu za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
2008.-2012.	Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci, opći smjer

OSOBNE VJEŠTINE

Strani jezici: engleski (dobro poznavanje) i njemački jezik (osnovno)
Digitalna kompetencija: odlično poznavanje rada u MS Office-u
Vozačka dozvola: B kategorija

DODATNE INFORMACIJE

2015. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera u Zagrebu

- posterska prezentacija pod naslovom “Ispitivanje oksidacijskih svojstava kompleksa bakra sa Schiffovom bazom uporabom diferencijalne pulsne voltametrije” pod vodstvom doc. dr. sc. Martina Medvidović- Kosanović i neposredne voditeljice Anamarije Šter

2014. Sajam inovacija, Osijek