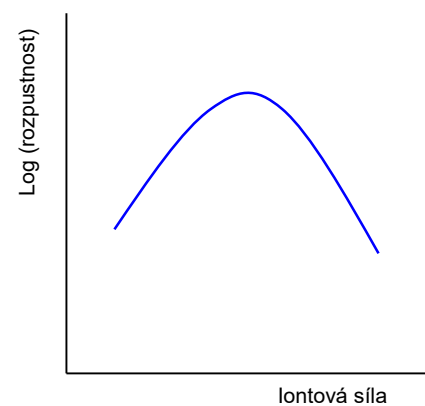


VLASTNOSTI PROTEINŮ

Roztoky proteinů ve vodě mají vlastnosti molekulárních koloidních disperzí. Rozpustnost proteinů je dána přítomností aminokyselin, které obsahují v postranním řetězci polární skupinu. Rozpustnost proteinů závisí na jejich náboji a na stabilitě jejich hydratačního obalu. S rostoucí velikostí výsledného náboje (rozdílu mezi počtem kladných a záporných nábojů) proteinu se zvyšuje jeho rozpustnost. Poněvadž proteiny obsahují kyselé a bazické aminokyseliny, které obsahují v postranním řetězci ionizovatelné skupiny, lze velikost výsledného náboje proteinu ovlivnit změnou pH roztoku. V tzv. izoelektrickém bodě (pI) je počet jeho kladných a záporných nábojů shodný a částice se chová navenek jako elektroneutrální. V izoelektrickém bodě se protein nepohybuje v elektrickém poli, roztok má nejmenší elektrickou vodivost, osmotický tlak, viskozitu a nejnáze se protein sráží dehydratačními činidly (ztráta hydratačního obalu).

Rozpustnost proteinů velmi výrazně ovlivňuje přítomnost iontů v roztoku. Ve vodě lze jejich rozpustnost zvýšit přidáním malého množství soli (**vsolování**), jejíž ionty se podílí na stabilizaci hydratačního obalu proteinu, snížení interakcí mezi nabitými skupinami proteinů a zvýšení interakcí proteinu s molekulami rozpouštědla. Se zvyšující se hodnotou iontové síly roztoku se rozpustnost proteinu po dosažení určité maximální rozpustnosti postupně snižuje, až dojde k úplnému vysrážení daného proteinu z roztoku (**vysolování**). Příčinou tohoto vysolení je snížení aktivity molekul vody (ionty soli soutěží s proteiny o molekuly rozpouštědla), čímž se mimo jiné snižuje elektrostatické odpuzování shodně nabitých skupin proteinů. Různé soli se ve vysolovacím účinku velmi liší. Nejsilnější vysolovací účinek mají fosfáty a sírany, nejmenší jodidy a chloristany. Kationty v porovnání s anionty mají na rozpustnost proteinů mnohem menší vliv.



Koncentrace soli, při které dochází k vysolování proteinů, je dána jednak typem proteinu, ale rovněž typem soli a hodnotou pH (nejnižší rozpustnost je v izoelektrickém bodě). Odstraněním přídavku soli (např. zředěním, dialýzou) se proteiny opět rozpustí a obnoví se jejich nativní funkce (renaturace).

Vysolování se používá v prvních krocích při izolaci proteinů ze směsí za účelem zakoncentrování nebo částečného oddělení od ostatních látek z roztoku (tzv. frakcionace).

Pro vysolování proteinů se nejčastěji používá síran amonný (je velmi dobře rozpustný a vykazuje malý denaturační účinek na proteiny). Při jeho použití se však musí sledovat hodnota pH roztoku, poněvadž v důsledku hydrolyzy dochází k okyselování roztoku. Do roztoku s proteiny se přidává buď pevný (rozetřený v třecí míse) v malých dávkách nebo ve formě nasyceného roztoku. Během přídavků soli je nutno s roztokem neustále míchat, aby se zabránilo lokálnímu nasycení. Většina proteinů se sráží z roztoku mezi 30–75 % nasycení, tzn. po přídavku takového množství soli do roztoku, které odpovídá 30–75 % množství soli potřebného ke vzniku nasyceného roztoku této soli. Po přidání potřebného množství soli se roztok proteinů míchá asi 30 minut, aby se ustálila rovnováha, a sraženina se poté oddělí od roztoku centrifugací.

Aktivitu molekul vody (stabilizaci hydratačního obalu proteinů) a tím i rozpustnost proteinů lze snížit přidávkem organických rozpouštědel, např. ethanolu nebo acetonu, které v důsledku snížení dielektrické konstanty prostředí zvyšují elektrostatické interakce mezi opačně nabitými skupinami proteinu. V porovnání se solemi vykazují však větší denaturační účinek, proto se provádí srážení za nízké teploty (pod 0 °C) a udržování pH na požadované hodnotě. Po snížení koncentrace organického rozpouštědla se získá zpět nativní protein. Za vyšší teploty dochází ve větší míře k ireverzibilní denaturaci.

Nativní konformace proteinů jsou v roztoku poměrně málo odolné vůči různým fyzikálním a chemickým vlivům, které rozrušují částečně nebo i úplně nevazebné interakce, které stabilizují terciární a sekundární strukturu. Pokud se poruší kovalentní struktura proteinu (tzn. peptidové vazby v primární struktuře), protein ztratí své biologické vlastnosti. Tento děj nazýváme **denaturace**. Při denuraci proteinu přechází jeho vysoce uspořádaná nativní konformace do stavu částečně nebo zcela neuspořádaného (tzv. náhodného klubka). Z fyzikálních činitelů způsobuje denuraci např. teplo (u většiny proteinů již teplota nad 40–50 °C), třepání, vysoký tlak, UV záření, ultrazvuk. Z chemických vlivů jsou to např. silné kyseliny a hydroxidy, kationty těžkých kovů, tenzidy, některé organické kyseliny. Citlivost různých proteinů vůči uvedeným vlivům není stejná a závisí rozdílnou měrou na hodnotě pH roztoku, jeho iontové síle, druhu přítomných iontů atd. Denaturace je často nevratná (ireverzibilní), u některých proteinů za vhodných podmínek může být vratná (renaturace). Denurací proteinu se zpravidla značně snižuje jeho rozpustnost. Denaturovaný protein se sráží spontánně z koncentrovaných roztoků, jinak jen při porušení podmínek stability koloidní disperze (tj. porušení hydratačního obalu a/nebo „vynulování“ výsledného náboje proteinů).

Ireverzibilní denaturace se používá např. při detekci proteinů v moči nebo při odstraňování proteinů (tzv. deproteinaci) z krevního séra či plazmy před stanovením některých metabolitů.

PRAKTICKÁ ČÁST

Úkol 13.1 Stanovení izoelektrického bodu kaseinu

Kasein je hlavním proteinem kravského mléka (50–80 % celkového obsahu proteinů). Izoelektrický bod kaseinu lze přibližně stanovit tak, že se mléko postupně smíchá s pufrů o různé hodnotě pH a vyhledá se takový, v němž se protein nejnáze sráží.

Materiál: Citrát-fosfátové pufrů pH 2,5–6,0 (řada osmi roztoků s diferencí pH 0,5, připravených z citronové kyseliny 0,05 mol/l a Na_2HPO_4 0,1 mol/l), mléko zředěné vodou v poměru 1:1. Plastové pipetky, zkumavky, popisovač.

Provedení:

- Do 8 zkumavek odměřte cca 2 ml pufru. Každá zkumavka bude obsahovat pufr s jinou hodnotou pH v rozmezí 2,5–6,0.
 - Poté do každé zkumavky přidejte po cca 1 ml zředěného mléka a dobře promíchejte.
 - Po několika minutách hodnotě stupeň vysrážení (přítomnost sraženiny, její objem, vzhled supernatantu) v jednotlivých zkumavkách.
 - Dle stupně vysrážení odhadněte hodnotu izoelektrického bodu kaseinu.
- ✍ 1. Odhadněte hodnotu izoelektrického bodu kaseinu.
- ✍ 2. Vzhledem ke zjištěné hodnotě izoelektrického bodu určete, jaký náboj bude převládat na molekule kaseinu v prostředí o pH 5,5?

Úkol 13.2 Rozpustnost proteinů, srážení proteinů z roztoků

Mezi významné faktory, které ovlivňují rozpustnost proteinů v roztoku, patří přítomnost solí, organických rozpouštědel, pH a teplota.

Materiál: Roztok proteinů (10 g/l), jemně rozetřený chlorid sodný kryst., ethanol denaturovaný methanolem, roztok trichloroctové kyseliny (1 mol/l), konc. HNO_3 , zředěná CH_3COOH (2 mol/l). Lopatička. Plastové pipetky, zkumavky, popisovač.

a) Vysolování proteinů

- K přibližně 1 ml roztoku proteinů přidávejte postupně po malých částech jemně rozetřený chlorid sodný. Po každém přidavku soli obsah zkumavky promíchejte. Pokračujte v přidavcích soli tak dlouho, dokud se bude sůl rozpouštět.
- Poté obsah zkumavky zřeďte dvojnásobným objemem vody. Pozorujte, zda dojde ke změně rozpustnosti vysrážených proteinů.

b) Srážení proteinů ethanolem

- K asi 0,5 ml roztoku proteinů přidávejte po částech 4–6násobné množství ethanolu, po každém přidavku ethanolu, roztok dobře promíchejte.
 - Poté obsah zkumavky zřed'te stejným objemem demi-vody a pozorujte změny ve zkumavce.
- ✎ 3. Vysvětlete vliv soli a ethanolu na chování proteinů v roztoku.
- ✎ 4. Uveďte, za jakých podmínek je srážení reverzibilní.

c) Srážení proteinů po jejich tepelné denaturaci

- Roztok proteinů (cca 1 ml) ve zkumavce umístěte do vroucí lázně na 2 min.
 - Po ochlazení obsahu zkumavky, přidejte několik kapek zředěné octové kyseliny.
 - Vyhodno'te změnu rozpustnosti proteinů bezprostředně po tepelné denaturaci a poté po okyselení roztoku.
- ✎ 5. Jak vysvětlíte změnu rozpustnosti denaturovaných proteinů v mírně kyselém prostředí (při pH 5)?

d) Srážení proteinů koncentrovanou kyselinou dusičnou

- Do zkumavky odměřte přibližně 1 ml koncentrované kyseliny dusičné.
 - Poté, po nakloněné stěně zkumavky opatrně navrstvěte nad roztok kyseliny roztok proteinů, obsah zkumavky **nepromíchejte**.
 - Pozorujte bílý prstenec vysrážených proteinů, který se vytvoří na rozhraní roztoků.
- ✎ 6. Popište, k jakým změnám došlo ve zkumavce. Reakce se pod názvem Hellerova zkouška používala k důkazu proteinů v moči.

e) Srážení proteinů kyselými deproteinačními činidly

- K přibližně 1 ml roztoku proteinů ve zkumavce přidejte několik kapek roztoku trichloroctové kyseliny, obsah zkumavky promíchejte.
 - Pozorujte vysrážení proteinů z roztoku, které je kompletní po několika minutách.
 - Obsah zkumavky zřed'te dvojnásobným objemem demi-vody a pozorujte chování sraženiny.
- ✎ 7. Popište výsledek.

Úkol 13.3 Stanovení koncentrace celkových proteinů

Stanovení množství celkových proteinů v roztoku je založeno na zjištění:

a) **množství dusíku**, který se obvykle stanoví Kjeldahlovou metodou. Množství proteinů lze pak zjistit např. výpočtem ze vztahu **koncentrace proteinů** = $6,25 \cdot N_{\text{prot}}$ (většina proteinů obsahuje průměrně 16 hmotn. % dusíku, tj. $1/0,16 = 6,25$), N_{prot} je množství bílkovinného dusíku.

b) **množství peptidových vazeb** (biuretová reakce, metoda Bradfordové, částečně metody viz odst. c)

Stanovení proteinů metodou Bradfordové

V prostředí kyseliny fosforečné barvivo Coomassie brilliant blue G-250 se váže s peptidovou vazbou za vzniku komplexu, který vyvolá posun absorpčního maxima z 465 nm na 595 nm.

c) **množství některé aminokyseliny** (Lowryho metoda, pomocí bicinchoniniové kyseliny)

Stanovení proteinů Lowryho metodou

Folinovo-Ciocalteuovo činidlo (fenolové činidlo) poskytuje v alkalickém prostředí i s velmi slabě redukujícími látkami modré zbarvení, vzniklé redukcí fosfowolframanů a fosfomolybdenanů. Proteiny reagují **především** v důsledku přítomnosti **fenolických řetězců tyrosinu**. Barevná reakce je mnohem intenzivnější, provádí-li se po přidavku Cu^{2+} iontů, tzn. po biuretové reakci. Měďnaté ionty v komplexu s peptidovými vazbami jsou redukovány na ionty Cu^+ zbytky Tyr, Trp nebo Ser. Vzniklé Cu^+ ionty a radikály postranních řetězců výše zmíněných aminokyselin redukují Folinovo-Ciocalteuovo činidlo na modrý produkt.

Stanovení proteinů pomocí bicinchoniniové kyseliny

Princip je obdobný jako u Lowryho metody. Za alkalických podmínek ionty Cu^{2+} vytváří s peptidovou vazbou komplex, v kterém dochází k redukcí Cu^{2+} na Cu^+ za **přítomnosti zbytků cysteinu, cystinu, tryptofanu a tyrosinu**. Bicinchoniniová kyselina tvoří s Cu^+ ionty v alkalickém prostředí modrofialový komplex.

d) **absorbance roztoku v UV oblasti spektra**

Stanovení koncentrace bílkovin pomocí měření absorbance v UV oblasti spektra je v porovnání s ostatními metodami velmi rychlé, poněvadž nevyžaduje žádné činidla ani inkubace. Při této metodě nedochází k znehodnocení vzorku. Nevýhodou této metody je, že jakákoliv látka absorbující v UV oblasti spektra interferuje s proteiny. Proteiny absorbují UV záření s absorpčním maximem při 280 nm (především Tyr, Trp) a 200 nm (peptidová vazba).

Pro hrubý odhad stačí změřit absorbanci pouze při 280 nm: $\rho_{\text{prot}} \text{ (mg/ml)} = A_{280}/b$

kde b je tloušťka vrstvy roztoku, jímž prochází záření.

Eliminace nukleových kyselin. Pokud se v roztoku vyskytují nukleové kyseliny je nutno měření absorbance opakovat při vlnové délce 260 nm (absorpční maximum nukleových kyselin).

Koncentrace proteinů se vypočítá např. ze vztahu: $\rho_{\text{prot}} \text{ (mg/ml)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$

Stanovení proteinů biuretovou reakcí

Látky obsahující nejméně dvě peptidové vazby reagují s ionty Cu^{2+} v alkalickém prostředí za vzniku červenofialového komplexu. Metoda se používá na stanovení celkových proteinů v krevním séru nebo moči.

Materiál: *Biuretové činidlo* (100 ml roztoku CuSO_4 15 mmol/l a EDTA.Na_2 0,18 mmol/l, se zředí vodou na 600 ml, za vydatného míchání se postupně přidá 200 ml roztoku NaOH 5 mol/l a doplní vodou na 1 litr). *Kalibrátor-proteiny* (koncentrace proteinů uvedena na štítku), vzorky. Mikropipetory 20 μl a 5 ml. Spektrofotometr.

Provedení

☞ Do čistých, označených zkumavek odměřujte podle schématu:

Roztok (μl)	Slepý pokus	Vzorek	Standard
Biuretové činidlo	1 000	1 000	1 000
Demi-voda	200	-	-
Vzorek	-	200	-
Kalibrátor-proteiny	-	-	200
Promíchejte a inkubujte 10 minut při pokojové teplotě.			
Změřte absorbance vzorků A_x a standardu A_{STD} při 545 nm proti slepému pokusu během hodiny.			

Výpočet hmotnostní koncentrace proteinů:

$$\rho_x = \frac{A_x}{A_{\text{STD}}} \times \rho_{\text{STD}}$$

kde ρ_{STD} je hmotnostní koncentrace proteinů v kalibračním roztoku (uvedena na štítku)