

UPUTSTVA ZA VEŽBE IZ BIOHEMIJE PROTEINA I NUKLEINSKIH KISELINA

(ZA STUDENTE II GODINE BIOHEMIJE)

ŠKOLSKE 2008/2009 GODINE

Pripremili:

Profesor Vesna Niketić

Asistent Mr Milan Nikolić

Predgovor

Ovaj Praktikum je nastao na osnovu višegodišnjeg iskustva autora u izvođenju nastave (predavanja i vežbi) iz uvodnih kurseva o proteinima i nukleinskim kiselinama za studente biohemijske grupe na Hemijskom fakultetu. S obzirom da ovaj kurs od ove školske godine studenti slušaju ranije nego do sada (već u III, a ne kao do sada u IV semestru) napravljen je napor da se vežbe modifikuju/prilagode studentima koji će imati manje predznanja i manje iskustva u radu u laboratoriji nego što je to bilo ranije. Međutim, naš cilj je da stepen poznavanja ove oblasti, kao i eksperimentalne veštine koje će studenti bude na istom (ako ne i boljem) nivou nego do sada. Vežbe iz ovog predmeta treba omogućiti studentima da steknu *osnovne* veštine u radu sa proteinima na nivou primene, kao i da se upoznaju sa svojstvima nukleinskih kiselina, te da steknu osnovne predstave o radu i ponašanju u biohemijskoj laboratoriji. U odnosu na vežbe na prethodnim godinama, a u skladu sa savremenim trendovima u nastavi i nauci povećano je prisustvo računara. Eksperimentalne vežbe koje su uvrštene u ovaj (osnovni) kurs o proteinima i nukleinskim kiselinama slične su po izboru, obimu i nivou vežbama koji studenti u svetu rade na sličnim kursevima. Način rada je prikagođen našim studentima i u skladu je sa najboljom tradicijom Hemijskog fakulteta

Profesor Vesna Niketić

Oktobar 2008. g.
u Beogradu

Sadržaj

Pravila ponašanja u laboratoriji
Pravila za rad sa biološkim materijalom humanog porekla
Uputstvo za pisanje laboratorijskog dnevnika (bele sveske)

Uvodni biohemijski praktikum: Koncentracija rastvora
Dodatak: Spektrofotometrija

Aminokiseline i proteini

Vežba 1 Aminokiseline

1.1 Aminokiseline kao slabe polibazne kiseline

Zadatak: Titracija nepoznate aminokiseline

1.2 Dokazivanje aminokiselina: dokazne reakcije i planarna hromatografija

Zadatak: Identifikacija nepoznate aminokiseline

Dodatak: Puferi

Vežba 2 Upoznavanje sa proteinima

2.1. Elektrolitičke osobine peptida i proteina

2.2. Principi izolovanja proteina: ekstrakcija i taloženje

Zadatak: Upoznavanje sa fizičkim i hemijskim svojstvima proteina mleka i belanceta jajeta

Vežba 3 Određivanje koncentracije proteina

Zadatak: određivanje koncentracije proteina u datom uzorku

Vežba 4 Gel filtracija i jonoizmenjivačka hromatografija proteina; SDS elektroforeza

UVOD: gel filtracija i jonoizmenjivačka hromatografija

4.1 Aparatura za hromatografiju proteina

4.2 Gel-filtracija

Zadatak: Određivanje molekulske mase humanog hemoglobina primenom gel filtracije

4.3 Jonoizmenjivačka hromatografija

Zadatak: Određivanje frakcije glikozilovanog hemoglobina primenom jonoizmenjivačke hromatografije

SDS elektroforeza

UVOD

4.4 Elektroforeza

4.5 Gel elektroforeza (PAGE)

4.6 SDS gel elektroforeza

Zadatak: *Identifikovati proteine plazme i membrane eritrocita primenom SDS elektroforeze.*

Zadatak: *upoznati se sa dolaženjem do literaturnih (bibliografskih) i strukturnih podataka o proteinima putem Interneta.*

Vežba 5 Ponašanje proteina: Denaturacija/renaturacija proteina; Protein-ligand interakcije

UVOD

5.1 Podsetnik iz termodinamike

5.2 Spontano uvijanje i konformaciona stabilnost proteina

5.3 Denaturacija proteina

Zadaci I problemi

Zadatak 1: *Ispitati interakcije hemoglobina sa ligandima i termalnu stabilnost hemoglobina*

Zadatak 1a (opciono): *koncipirati eksperimente i detaljnije ispitati stabilnost hemoglobina i globina.*

Zadatak 2: *Izolovati fikobilinske proteine iz Spiruline I ispitati denaturaciju dobijenog preparata ureom*

Zadatak 2a (opciono): *Koncipirati eksperimente I detaljnije ispitati denaturaciju/renaturaciju fikobilinskih proteina*

Vežba 6 Uvod u bioinformatiku

Nukleinske kiseline

Vežba 7 Izolovanje i spektralna karakterizacija DNK

UVOD: Principi izolovanja DNK

Zadatak: *Izolovati preparat DNK iz odabranog biološkog materijala primenom regularnog I uprošćenog (kuhinjska hemija!) postupka; odrediti koncentraciju DNK, proteina i RNK u vašem preparatu; ispitati ponašanje dobijenih preparata DNK pri zagrevanju. Na osnovu dobijenih rezultata uporedite postupke koje ste koristili, istaknite njihove prednosti I nedostatke.*

Dodatak: Izolovanje DNK

Pravila ponašanja u laboratoriji

Laboratorija može da bude opasno mesto ako niste pažljivi! Opasnost može da dođe od hemikalija i opreme koju koristite. Staklo koje koristite treba uvek smatrati opasnim, jer se lako razbija ako padne ili se sa njim ne rukuje pravilno. Jedini način da se zaštitite je da ste propisno odeveni i da (po potrebi) nosite zaštitne naočare.

Većina nezgoda nastaje zbog nepažnje. Studenti koji su se dobro pripremili za vežbe mnogo je manje verovatno da će napraviti neku nezgodu koja može nekoga da povredi.

U laboratoriji se treba pridržavati sledećih pravila:

Obratite pažnju koje hemikalije koristite. Uvek koristite rukavice kada radite sa toksičnim hemikalijama.

U laboratoriji nosite odgovarajuću odeću, obuću i beli mantil.

Uvek očistite radni sto, opremu i posuđe koje ste koristili. Posao nije završen dok laboratorija nije sređena!

Nikada ne pipetirajte ustima. Uvek koristite propipetu!

Nikada ne stavljajte svoju pipetu u zajedničku bocu sa reagensima. Ovo govori o vašoj odgovornosti i ponašanju. Ako vam treba 10 ml rastvora prespite u svoju čašu malo više od 10 ml i pipetirajte!

Nikada ne nosite zajedničke boce na svoje mesto. Jedna od najviše frustrirajućih stvari u laboratoriji je da na možete naći ono što vam je potrebno!

Nikada ne uzimajte više neke hemikalije nego što vam je stvarno potrebno!

Pravila za rad sa biološkim materijalom humanog porekla

Svi uzorci krvi za vežbe biće dobijeni ili od testiranih donora (negativna serološka/virološka reakcija na sifilis, Hepatitis B i C, kao i HIV), ili će se raditi sa životinjskom krvlju.

Životinjska krv, po pravilu, ne sadrži napred navedene patogene što ne znači da ne mogu postojati neki drugi elementi opasnosti u uzorku krvi. Zbog toga je neophodno poznavati i pridržavati se pravilne procedure rada sa biološkim materijalom.

NB: SVI HUMANI BIOLOŠKI UZORCI TREBA DA BUDU UVEK TRETIRANI KAO DA SU INFEKTIVNI!!!

Univerzalne mere opreza kojih se treba pridržavati pri radu sa uzorcima krvi i drugim telesnim tečnostima formulisane su od strane Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (Centers for Disease Control and Prevention, USA), a kod nas su objavljene u Službenom Glasniku Republike Srbije (br. 42/91, 53/93, 48/94, 42/98, 66/91, 83/92, 53/93, 67/93, 48/94, 44/95 i 53/95). Ove mere služe da se spreči kontakt sa inficiranom krvlju i drugim potencijalnim infektivnim materijalima.

1. Uzorci krvi moraju biti obeleženi i čuvani na odgovarajući način. Frižider/zamrzivač u kojem se čuvaju uzorci krvi/seruma/plazme ne treba koristiti za druge potrebe.
2. Obavezno koristiti zaštitne (hiruške) rukavice. Zaštita očiju zaštitnim naočarima kao i zaštita lica su preporučljive, jer se time sprečava izlaganje sluzokože usana, nosa i očiju od potencijalnih faktora rizika. Ove zaštitne mere su neophodne u situacijama u kojima može doći do prskanja uzoraka tokom rada.
3. *Ako koža ili sluzokoža dođu u kontakt sa uzorkom krvi, ili nekim drugim materijalom, moraju odmah biti isprani **HLADNOM** vodom (topla voda dovodi do širenja pora na koži, a može i da olakša rastvorljivost nekih opasnih materija). Sa ruku se prvo skidaju rukavice, zatim se ruke ispiraju vodom, a potom i 76% etanolom.*
4. Radne površine na koje se prosuo biološki materijal brišu se **ODMAH** jakim rastvorom natrijum-hipohlorita („varikine“ koji sadrži oko 0,5% dostupnog hlora), a potom sledi ispiranje 76% etanolom. Materijal korišćen za čišćenje se dekontaminira, hemijskom sterilizacijom ili autoklaviranjem. Mantili kontaminirani biološkim tečnostima moraju biti dekontaminirani (na primer potapanjem u rastvor „varikine“) pre pranja u mašini.
5. Nakon ispitivanja, uzorci krvi, kao i otpadni materijal, tretiraju se 3% rastvorom natrijum-hipohlorita, tokom najmanje 1 sata, i potom sipaju u kanalizaciju (na određenom mestu!!!).
 - a) Igle i špricevi za vadenje krvi koriste se samo jednokratno, i nakon upotrebe pakuju se u namensku posudu za bezbedno odlaganje.
 - b) Plastični nastavci za pipete koriste se samo jednokratno, a nakon upotrebe se odlažu u posudu sa sredstvom za dezinfekciju i bacaju.

- c) Stakleno posudje (epruvete i ostalo) koje je bilo u kontaktu sa infektivnim materijalom mora se pre pranja potopiti u rastvor dezinfekcionog sredstva, zatim se autoklavira i nakon toga pere.
- 6. Posebnu pažnju treba obratiti pri radu sa oštrim predmetima kao što su igle, skalpeli i makaze da ne bi došlo do povređivanja i oštećivanja zaštitnih rukavica čime bi se povećao rizik od infekcije. **Intaktna koža prva je linija odbrane organizma od patogena.**
- 7. Osobe sa lezijama na koži kao i osobe sa izraženim dermatitisom treba da izbegavaju kontakt sa biološkim materijalima. Osobe alergične na lateks treba da se jave asistentu.
- 8. Trudnice se posebno upozoravaju da se pridržavaju gore pomenutih pravila.

Ostale mere opreza pri radu podrazumevaju sledeće:

- 1. Uzorci krvi i drugih potencijalno infektivnih materijala moraju biti transportovani u nepropusnim sudovima. Posebna briga se vodi da bi se sprečila kontaminacija spoljašnosti suda.
- 2. Laboratorijski postupci koji mogu dovesti do prskanja (snažno mućkanje, sonifikacija, usitnjavanje...) se izvode uz prisustvo asistenta i uz gore opisane mere opreza.
- 3. Pipetiranje ustima je zabranjeno - mehanički uređaji se koriste za pipetiranje svih tečnosti.
- 4. Unošenje hrane i pića, pušenje, upotreba kozmetike i balzama za usne, kao i nameštanje sočiva u toku rada sa biološkim materijalom su najstrožije zabranjeni.
- 5. Jedino je studentima dozvoljeno da rade u laboratoriji. Posete u radnoj prostoriji nisu dozvoljene.
- 6. Laboratorijski instrumenti koji se koriste u radu treba da budu isprani nakon rada sa biološkim materijalima na način na koji to propisuje proizvođač.
- 7. Pažnja pri pranju ruku je esencijalni deo dobre prakse. Po završetku rada ruke se peru vodom i tečnim sapunom. Kod čestog pranja ruku, kao i kod upotrebe zaštitnih rukavica preporučuje se upotreba hidratantnih krema. Duga kosa treba da je vezana ili na neki drugi način imobilisana.

Asistent zadržava pravo da sa vežbi ukloni svakog studenta koji se ne pridržava navedenih pravila.

Uputstvo za pisanje laboratorijskog dnevnika („bele sveske“)

„Bele sveske“ predstavljaju laboratorijski dnevnik. Laboratorijski dnevnik je primarni dokument o tome šta ste uradili u laboratoriji. *Zbog toga posebnu pažnju treba obratiti na popunjavanje/korišćenje „bele sveske“.* Laboratorijski dnevnik mora da bude dobro organizovan, čitak i da sadrži **tačne podatke o vašem radu. Pišite direktno u belu svesku hemijskom olovkom (po mogućstvu crnom - jer najduže traje), ništa ne pišite na „papirićima“ i slično.** Tačno opišite šta ste radili i tačno unesite dobijene podatke (koristite donje Uputstvo). U svesku unesite sva izračunavanja i (pomoćna) merenja (za to služi leva strana u svesci!).

Opis vežbe treba da sadrži **što konciznije** napisane sledeće delove:

Uvod

Plan eksperimenta (Materijal i metode!)

Rezultati (zapažanja i eksperimentalni podaci)

(Diskusija rezultata/Zaključci)

Studenti treba da dodju na vežbe sa belim sveskama u kojima je unet **Uvod**. Na samim vežbama se unose **Plan eksperimenta** (u zavisnosti od vežbe može se uneti u svesku i zajedno sa Uvodom) i **Rezultati**. **Diskusija/Zaključci** se unose tokom razgovora na kraju vežbi, a studenti mogu ovaj deo i da dopune do narednog termina kod kuće.

Uvod sadrži naslov vežbe, datum rada, 1-3 rečenice o cilju i predmetu (značaju) vežbi koje će se na datom terminu raditi, referencu(e) po kojoj(im) će se vežba(e) raditi. Informacije za ovo se nalaze u Praktikum, Predavanjima, Literaturi predloženoj za pripremu vežbe.

Plan eksperimenta: Ukratko opisati svojim rečima vežbu koju ćete raditi, materijal i opremu koju ćete koristiti (ne treba prepisivati sve što piše u Praktikum – dovoljno je pozvati se na isti!)

Rezultati (zapažanja i eksperimentalni podaci): Unesite sve sirove podatke i sva vaša zapažanja. **Važno je da pišete dok radite.** Ako odmah ne upišete to što ste dobili ili zapazili lako ćete, u „trenutku“ zaboraviti. Nacrtajte aparature (ako se u vežbi koriste), zalepite slike spektara, elektroforegrama, hromatograma, dijagrame....

Diskusija/Zaključci: Ovo je prilika da razmišljate. Interpretirajte i komentarišite podatke do kojih ste došli. Na kraju sumirajte šta ste uradili i šta ste dobili. Unesite i pitanja (probleme), sugestije za dalji rad.

Uvodni biohemijski praktikuma: Koncentracija rastvora

Cilj ove vežbe je da steknete veštine u pripremi rastvora (što je deo svakodnevne prakse biohemičara!!)

Priprema vežbe: Obnovite (ukoliko je potrebno!) gradivo o koncentraciji i pravljenju rastvora; proučite odeljak o koncentraciji rastvora koji sledi; uradite (domaći rad) zadatke koje su dati na kraju ovog odeljka.

Biohemičar se u svakodnevnoj praksi sreće sa pravljenjem rastvora određenih koncentracija. Zato ćemo prvo obnoviti različite načine za izražavanje i preračunavanje koncentracija rastvora sa kojima ste se već srelili, a potom ćete u dogovoru sa asistentom pripremiti rastvore određenih supstanci koje ćete koristiti u daljem radu.

Izražavanje koncentracije rastvora

Molaritet (M) predstavlja broj molova rastvorene supstance u litru . Koncentracije razblaženih rastvora često se izražavaju u manjim jedinicama:

$$\begin{aligned}\text{mmol/L (milimol/L)} &= 10^{-3} \text{ M} \\ \mu\text{mol/L (mikromol/L)} &= 10^{-6} \text{ M} \\ \text{nmol/L (nanomol/L)} &= 10^{-9} \text{ M} \\ \text{pmol/L (pikomol/L)} &= 10^{-12} \text{ M}.\end{aligned}$$

Aktivitet (a) je stvarna (efektivna) koncentracija jona u rastvoru:

$$a = \gamma \cdot M$$

gde γ predstavlja *koeficijent aktiviteta* koji zavisi od naelektrisanja i koncentracije jona i ukupne jonske sile. Vrednosti za koeficijente aktiviteta nekih jona dati su u prilogu I.

Jonska sila ($\frac{1}{2}\Gamma$) izražava se na sledeći način:

$$\frac{1}{2}\Gamma = \frac{1}{2}\sum M_i z_i^2$$

gde je M_i molaritet, a z_i naelektrisanje i -tog jona.

Molalitet (m) predstavlja broj molova rastvorene supstance u 1000 g rastvarača, i koristi se u nekim fizičko-hemijskim izračunavanjima (na primer, u krioskopiji i ebulioskopiji). U slučaju razblaženih rastvora molalitet i molaritet su praktično isti.

Osmolitet predstavlja zbirni molaritet svih čestica koje potiču od rastvorene supstance. Molaran rastvor soli je n osmolan (gde je n = broj jona na koje se disosuje). Na primer, 0,03 M NaCl je 0,06 osmolan. Krvna plazma je 0,308 osmolna što znači da eritrocite treba suspendovati u 0,308 osmolnom tj. 0,154 M rastvoru NaCl. Takav rastvor se naziva *izotoni* u odnosu na eritrocite.

Težinski procenat (w/w) je broj grama rastvorene supstance u 100 grama rastvora.

¹ Međunarodni sistem jedinica (SI) preporučuje izražavanje zapremine u m³. Prema tome, 1 litar = 10⁻³ m³ (po definiciji) = 1 dm³, a 1 mL = 10⁻⁶ m³ = 1 cm³.

Težinski/zapreminski procenat (w/v) je broj grama rastvorene supstance u 100 mL rastvora.

Miligram-% predstavlja broj miligrama rastvorene supstance u 100 mL rastvora. Ovaj način izražavanja koncentracije često se sreće u biohemijskoj i kliničkoj praksi.

PRILOG I. KOEFICIJENTI AKTIVITETA NEKIH JONA U VODENOJ SREDINI

J o n	Koncentracija		
	0,001M	0,01M	0,1M
H ⁺	0.975	0.933	0.86
OH ⁻	0.975	0.925	0.805
Acetat ⁻	0.975	0.928	0.82
H ₂ PO ₄ ⁻	0.975	0.928	0.744
HPO ₄ ²⁻	0.903	0.740	0.445
PO ₄ ³⁻	0.796	0.505	0.16
H ₃ citrat ⁻	0.975	0.926	0.81
Hcitrat ²⁻	0.903	0.741	0.45
Citrat ³⁻	0.796	0.51	0.18
HCO ₃ ⁻	0.975	0.928	0.82
CO ₃ ²⁻	0.903	0.742	0.445

Zadaci

- Koliko grama čvrstog NaOH je potrebno da bi se napravilo a) 500 mL 0.04M rastvora? b) Izrazite koncentraciju u obliku g/L, % w/v, mg % i osmolarnosti. (a) 0.8g; b) 1.6 g/L; 0.16%; 160 mg%; 0.08 osmolaran)
- Koliko je mL 0.5M H₂SO₄ potrebno za 1500 mL 0.002M rastvora H₂SO₄? (0.6 mL)
- Izračunati jonsku silu 0.02M rastvora Fe₂(SO₄)₃. (0.30)
- Kako biste napravili 2 litra 0.4M HCl polazeći od koncentrovane HCl (28% w/w, gustina 1.15 g/mL) (potrebno je 90.7 mL)
- Rastvor sadrži 15 g CaCl₂ u 190 mL. Izraziti koncentraciju rastvora u obliku a) g/L, b) % w/v, c) mg %, d) M I e) osmolarnosti, f) kolika je jonska sila ovog rastvora?
- Kolika je molarnost čistog etanola? (gustina etanola je 0.789 g/mL)

Vežba 1 Aminokiseline

Polazeći od toga da ste se sa aminokiselinama upoznali u okviru predavanja, te da ste sadržaje koje smo obrađivali usvojili, u okviru odeljaka koji slede dopunićete svoja znanja o aminokiselinama kao slabim polibaznim kiselinama, bliže ćete upoznati osobine pojedinih aminokiselina te reakcije i metode koje se koriste za njihovo dokazivanje i određivanje.

PRIPREMA VEŽBE: Naučiti formule, troslovne i jednoslovne skraćenice svih proteinskih aminokiselina. Uočiti koje se funkcionalne grupe javljaju u ovim aminokiselinama.

Proučite Odeljak 1.1 o aminokiselinama kao slabim polibaznim kiselinama. Uradite zadatke. Pripremite pitanja o ovoj temi za razmatranje na teorijskim vežbama. Upoznajte se sa dokaznim reakcijama za aminokiseline (Odeljak 2.2). Ukratko navedite o čemu se radi u svakoj od predviđenih eksperimentalnih vežbi: Titracija nepoznate aminokiseline; Identifikacija nepoznate aminokiseline (supstance) primenom dokaznih reakcija i planarne hromatografije i Određivanje polarnosti aminokiselina. Pripremite pitanja u vezi sa eksperimentalnim vežbama.

1.1 Aminokiseline kao slabe polibazne kiseline

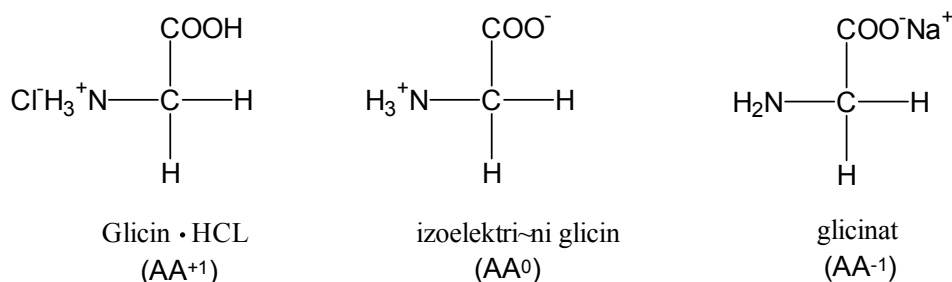
Aminokiseline ćemo, po analogiji sa napred opisanim slabim kiselinama, posmatrati kao slabe polibazne kiseline. Sve proteinske aminokiseline imaju α -amino ($-\text{NH}_2$; $-\text{NH}_3^+$) ili imino ($>\text{NH}$; $>\text{NH}_2^+$) i α -karboksilnu grupu ($-\text{COOH}$; $-\text{COO}^-$), a izvesne aminokiseline imaju i naelektrisane grupe u bočnom ostatku (Glu, Asp, His, Arg, Lys, Cys, Tyr). Svaka od ovih grupa ima svoju konstantu disocijacije kiseline odnosno konjugovane baze. Uobičajeno je da se koriste samo konstante kiselina (K_a i $\text{p}K_a$) koje se za svaku aminokiselinu navode redom od većih ka manjim vrednostima K_a , odnosno od manjih ka većim vrednostima $\text{p}K_a$ (tj. od jačih ka slabijim kiselinama). Na primer:

Gly:	$K_{a1} = 4,57 \cdot 10^{-3}$ ($\text{p}K_{a1} = 2,34$)	odnosi se na $\alpha\text{-COOH}$ grupu
	$K_{a2} = 2,51 \cdot 10^{-10}$ ($\text{p}K_{a2} = 9,60$)	odnosi se na $\alpha\text{-NH}_2$ grupu
Asp:	$K_{a1} = 8,13 \cdot 10^{-3}$ ($\text{p}K_{a1} = 2,09$)	odnosi se na $\alpha\text{-COOH}$ grupu
	$K_{a2} = 1,38 \cdot 10^{-4}$ ($\text{p}K_{a2} = 3,86$)	odnosi se na $\beta\text{-COOH}$ grupu
	$K_{a3} = 1,51 \cdot 10^{-10}$ ($\text{p}K_{a3} = 9,82$)	odnosi se na $\alpha\text{-NH}_2$ grupu
Lys:	$K_{a1} = 6,61 \cdot 10^{-3}$ ($\text{p}K_{a1} = 2,18$)	odnosi se na $\alpha\text{-COOH}$ grupu
	$K_{a2} = 1,12 \cdot 10^{-9}$ ($\text{p}K_{a2} = 8,95$)	odnosi se na $\beta\text{-NH}_2$ grupu
	$K_{a3} = 2,95 \cdot 10^{-11}$ ($\text{p}K_{a3} = 10,53$)	odnosi se na $\epsilon\text{-NH}_2$ grupu

Ukupno naelektrisanje (šarža) svake aminokiseline na određenom pH jednako je zbiru pozitivno i negativno naelektrisanih grupa ($-\text{COO}^-$ i $-\text{NH}_3^+$) na tom pH. Ukoliko ima drugih naelektrisanih grupa u bočnom nizu i one se, naravno, uzimaju u obzir.

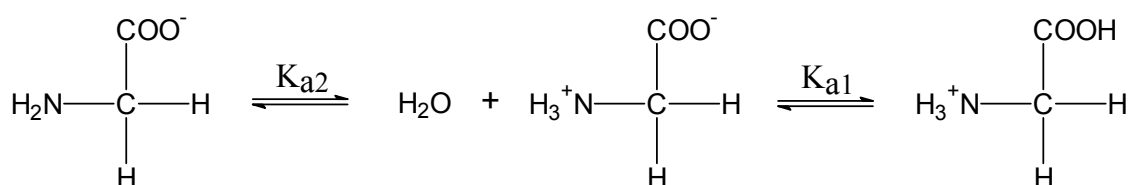
Primer:

Glicin se u vodenom rastvoru može naći u tri glavna oblika.



Izoelektrični glicin je neutralan (AA⁰), glicinat je negativno (AA⁻¹) a hidrohlorid pozitivno (AA⁺¹) naelektrisan. U kom obliku će se glicin naći zavisi od pH rastvora. Kolike su te pH vrednosti?

Izoelektrični glicin: Posmatraćemo ponašanje amino i karboksilne grupe.



Pošto je molekul neutralan, biće $[\text{AA}^-] = [\text{AA}^+]$ iz čega dalje sledi:

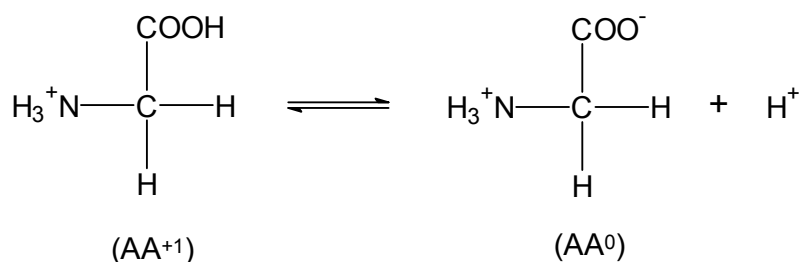
$$\begin{aligned} K_{a1} &= \frac{[\text{AA}^0][\text{H}^+]}{[\text{AA}^+]} & K_{a2} &= \frac{[\text{AA}^-][\text{H}^+]}{[\text{AA}^+]} \\ [\text{AA}^0] &= \frac{K_{a1}[\text{AA}^+]}{[\text{H}^+]} & [\text{H}^+] &= \frac{K_{a2}[\text{AA}^0]}{[\text{AA}^-]} \\ [\text{H}^+] &= \frac{K_{a2}K_{a1}[\text{AA}^+]}{[\text{AA}^-][\text{H}^+]} & [\text{H}^+]^2 &= \frac{K_{a2}K_{a1}[\text{AA}^+]}{[\text{AA}^-]} \end{aligned}$$

$$[H^+] = \sqrt{K_{a2}K_{a1}}$$

$$pH = \frac{pK_{a2} + pK_{a1}}{2}$$

Znači, ako je pH vrednost rastvora jednaka aritmetičkoj sredini pK_{a2} i pK_{a1} , glicin, kao i sve druge monoamino monokarbonske aminokiseline, biće neutralan. Ova vrednost pH naziva se **izoelektrično pH**, ili **izoelektrična tačka** i obeležava se sa ***pI*** ili IEP (od engl. "isoelectric point").

Glicin hidrohlorid: Kod Gly·HCl disosovaće karboksilna grupa. Disocijaciju NH_3^+ grupe možemo da zanemarimo (Zašto?)



$$K_{a1} = \frac{[A^0][H^+]}{[AA^{+1}]}$$

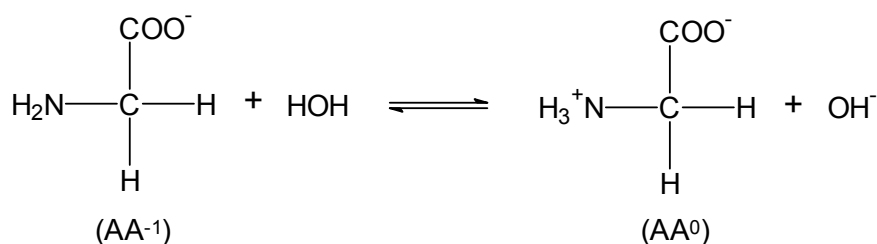
$$K_{a1} = \frac{(y)(y)}{(0,1-y)} = 4,57 \cdot 10^{-3} \rightarrow 4,57 \cdot 10^{-4} - 4,57 \cdot 10^{-3}y = y^2$$

$$y^2 + 4,57 \cdot 10^{-3}y - 4,57 \cdot 10^{-4} = 0$$

$$[H^+]^2 = 1,92 \cdot 10^{-2} M \rightarrow pH = 1,72$$

Znači, ako je pH rastvora 1,72 glicin će biti u obliku katjona i kao takav će iz ovog rastvora kristalisati. [ta će biti ako je pH rastvora manje od 1,72 ?

Glicinat: Kod glicinata možemo da zanemarimo disocijaciju COOH grupe (Zašto?) i da posmatramo samo disocijaciju amino grupe. Biće:



$$3,98 \cdot 10^{-5} = \frac{y^2}{0,1} y^2 = 3,98 \cdot 10^{-6}$$

$$y = \sqrt{3,98 \cdot 10^{-6}} = 1,995 \cdot 10^{-3}$$

$$[OH^-] = 1,995 \cdot 10^{-3} M \approx 2 \cdot 10^{-3}$$

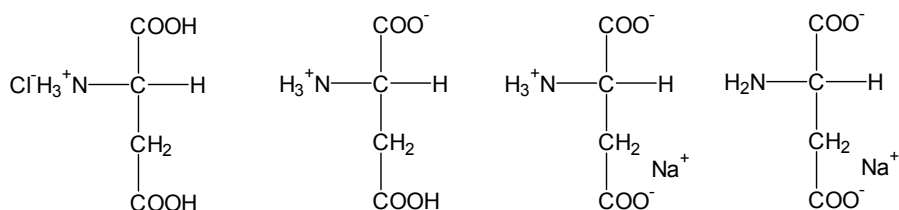
$$[H^+] = \frac{K_w}{[OH^-]} = \frac{1 \cdot 10^{-14}}{2 \cdot 10^{-3}} = 5 \cdot 10^{-12}$$

$$K_{b1} = \frac{[OH^-][AA^0]}{[AA^{-1}]} = \frac{(y)(y)}{(0,1 - y)} \quad pH = \log \frac{1}{[H^+]} = \log \frac{1}{5 \cdot 10^{-12}} = \log 2 \cdot 10^{11}$$

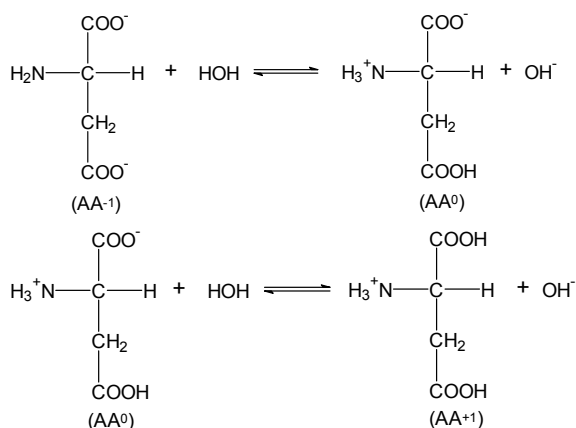
$$pH = 11,3$$

U 0,1 M rastvoru glicinata pH će biti 11,3.

Sada ćemo ukratko razmotriti primer kiselih i baznih aminokiselina (Asp i Lys). Asparaginska kiselina može da se u rastvoru nađe u četiri glavna oblika koji se nalaze u ravnoteži:

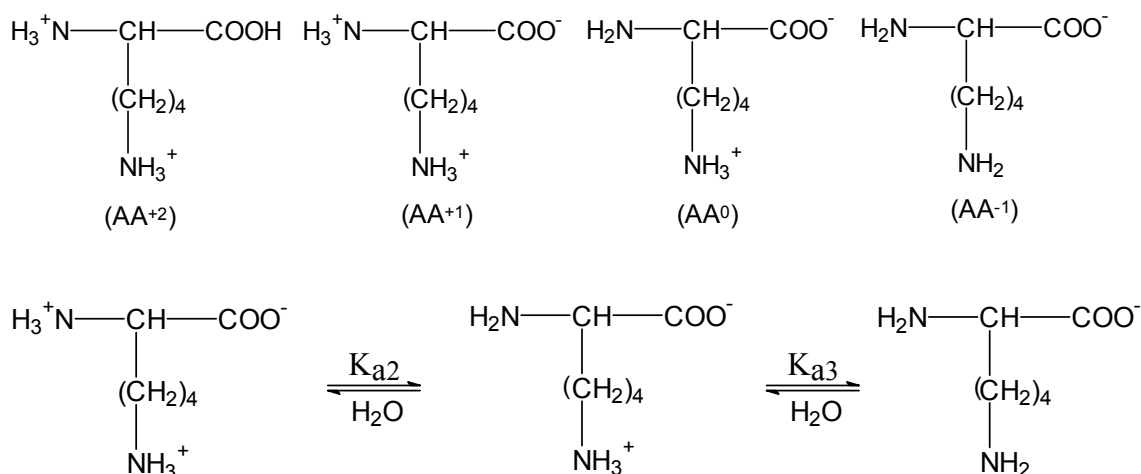


Po analogiji sa izvođenjem kod Gly, pI (AA^0) će biti:



$$pH = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} = \frac{2,1 + 3,86}{2} = \frac{5,96}{2} = 2,98$$

Lizin može da se javi u sledeća četiri glavna oblika koji su u ravnoteži:



Za izoelektrični lizin, biće:

$$pI = \frac{pK_{a2} + pK_{a3}}{2}$$

Izračunavanje šarže (naelektrisanja) aminokiselina u zavisnosti od pH

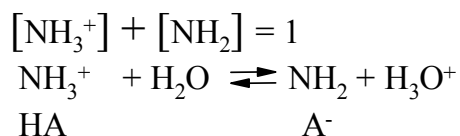
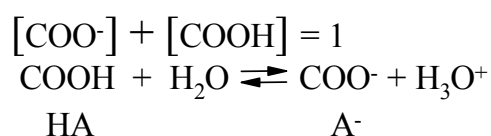
U ovom odeljku ćemo na karakterističnim primerima pokazati kako se izračunava šarža (naelektrisanje) aminokiselina, a u odeljcima koji slede pokazaćemo kako se dolazi do naelektrisanja peptida i proteina i kako se ovi podaci primenjuju u biohemijskih praksi.

Primer:

Koliko je naelektrisanje Gly, Asp i Lys na pH = 3?

Da li je potrebno znati koncentracije aminokiselina da bismo izračunali njihovo naelektrisanje?

Naelektrisanje svake od ovih aminokiselina na datom pH jednaka je zbiru $[\text{COO}^-]$ i $[\text{NH}_3^+]$ na tom pH.



$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Na pH = 3, biće:

$$3 = 2,34 + \log \frac{[COO^-]}{1 - [COO^-]} \quad 3 = 2,09 + \log \frac{[COO^-]}{1 - [COO^-]} \quad 3 = 2,18 + \log \frac{[COO^-]}{1 - [COO^-]}$$

$$\alpha - [COO^-] = -0,82$$

$$\alpha - [COO^-] = -0,89$$

$$\alpha - [COO^-] = -0,87$$

$$\alpha - [NH_3^+] = 1,00$$

$$\beta - [COO^-] = -0,12$$

$$\alpha - [COO^-] = 1,00$$

$$\alpha - [NH_3^+] = 1,00$$

$$\varepsilon - [NH_3^+] = 1,00$$

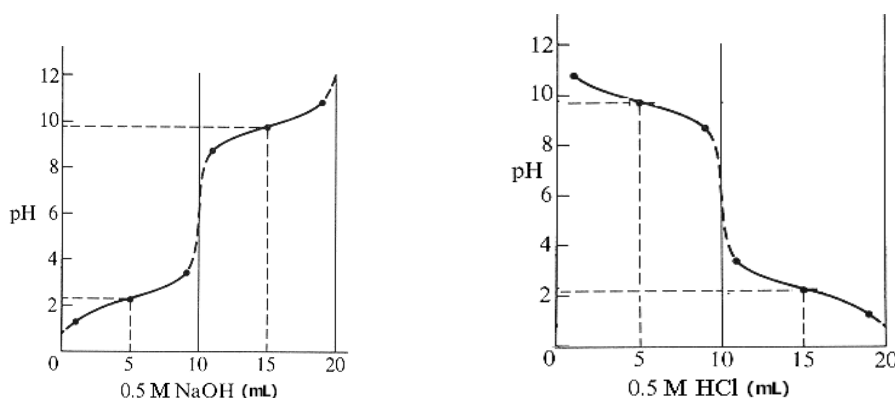
$$[\text{arža: Gly}] = +0,18$$

$$\text{Asp} = +0,01$$

$$\text{Lys} = +1,13$$

Titracija aminokiselina

Aminokiseline možemo da titrujemo kiselinama i bazama. Na slici 1-2 prikazana je kriva titracije Gly·HCl (0,01 M) sa 0,01 M NaOH, a na slici 4-3 titracija glicinata (0,01 M) sa 0,01 M HCl. Opisaćemo ukratko krivu titracije Gly·HCl sa NaOH (Slika 1-2). Titracija glicinata sa HCl (Slika 1-3) se zasniva na potpuno istim principima samo što se ide od viših ka nižim pH.



Slika 1-1 – Titracija Gly·HCl sa 0,5 M NaOH **Slika 1-2** – Titracija Gly sa 0,5 M NaOH

Pre početka titracije pH rastvora potiče od Gly·HCl. Dodatkom baze titruje se proton iz COOH, a pH rastvora postepeno raste (Zašto?). pH rastvora merimo pH-metrom, a možemo i da ga izračunamo iz Henderson-Hasselbachove jednačine kao što je napred opisano. Kada je polovina COOH istitrovana biće:

$$[COOH] = [COO^-] \quad pH = pK_a + \log \frac{[COO^-]}{[COOH]} \quad pH = pK_a = 2,30.$$

Kada je cela COOH istitrovana, biće:

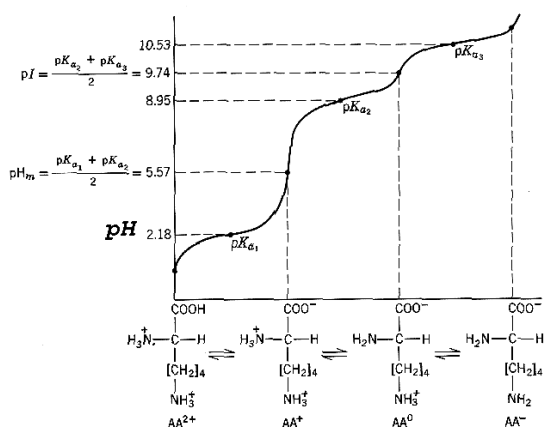
$$[\text{COO}^-] = [\text{NH}_3^+] \quad \text{pH} = \text{pI} = 5,97.$$

Daljim dodatkom baze titruje se proton iz amino grupe. Kada je polovina amino grupe istitrovana, pH će biti, po analogiji sa karboksilnom grupom:

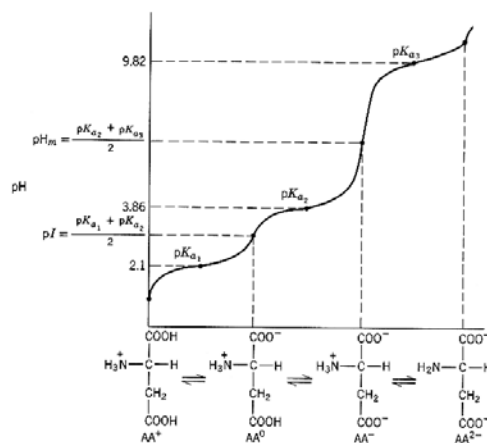
$$\text{pH} = \text{pK}_{a2} = 9,6$$

Kada je cela amino grupa istitrovana pH će biti kao kod glicinata.

Krive titracije Lys·2HCl i Asp·HCl koje su dobijene na analog način prikazane su na slikama 3-2 i 3-3.



Slika 1-3 – Titracija Lys·2HCl



Slika 1-4 – Titracija Asp·HCl

Iz svih navedenih titracionih krivih vidimo da aminokiseline mogu da se ponašaju kao puferi u oblastima svojih pK_a vrednosti.

Zadaci I problemi (Odgovori)

1. Odgovoriti na sledeća pitanja sa da ili ne. Ukratko obrazložiti odgovore:

- Nejonizovani oblik aminokiseline dominira samo na vrlo visokom ili vrlo niskom pH.
- Leu je manje polaran od Ala.
- Na $\text{pH} > \text{pK}_a$ više od polovine jonizujuće grupe je disosovano. (a) ne; b) ne; c) da

2. Konstruisati dijagrame zavisnosti šarže pojedinih funkcionalnih grupa aminokiselina od pH.

3. Koje su glavne jonske vrste prisutne u 0,15 M rastvoru (a) Leu, (b) Asp, (c) Lys na pH 7,5? Obrazložiti! (a) Leu^- b) Asp^{2-} c) Lys^+ ?

4. ϵ -amino grupa Lys ima pK_a 10,5.

(a) Koji deo ove grupe će biti protonovan (tj. u NH_3^+ obliku) u razblaženom rastvoru Lys na pH 9,5?

(b) na pH 11?

(c) Zašto je pK_a za ϵ -amino grupu Lys veće od pK_a za α -amino grupu?

5. γ -karboksilna grupa Glu ima pK_a 4,3.

(a) Koji deo ove grupe će u razblaženom rastvoru Glu na pH 5 biti protonovan (tj. u COOH , a ne u COO^- obliku)?

(b) na pH 3,8?

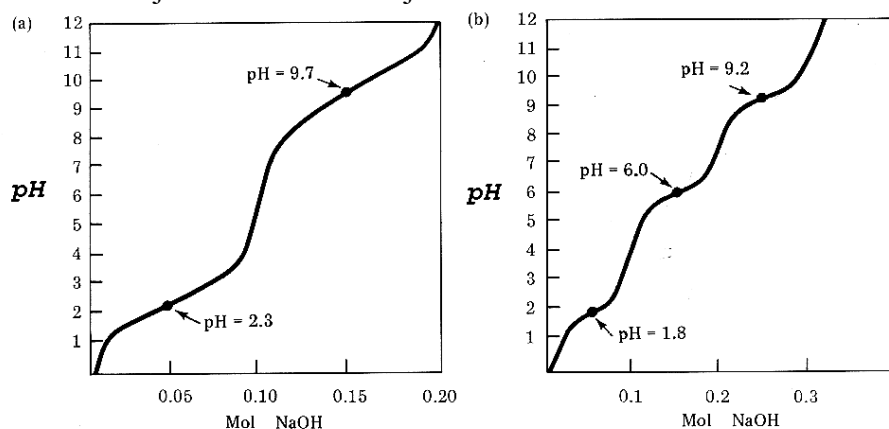
(c) Objasnite zašto je ova pK_a vrednost veća od pK_a za α -COOH grupu.

6. Koliko je mL 0,1 M KOH potrebno za potpunu neutralizaciju: (a) 450 mL 0,25 M Ala·HCl, (b) 200 mL 0,10 M izoelektričnog Ser, (c) 400 mL 0,15 M mononatrijum-glutamata, i (d) 400 mL 0,15 M izoelektrične Glu? (a) 2250 mL; b) 200 mL; c) 600 mL; d) 1200 mL)

7. Izračunati zapreminu 0,2 M HCl potrebnu za potpunu neutralizaciju: (a) 200 mL 0,25 M izoelektričnog Leu, (b) 375 mL 0,25 M izoelektrične Glu, (c) 490 mL 0,25 M izoelektričnog Lys, i (d) 125 mL 0,25M Na-lizinata. (a) 250 mL; b) 468,8 mL; c) 1225 mL; d) 468,8 mL)

8. Izračunati i nacrtati titracionu krivu za aminokiselinu sa $\text{pK}_{a1} = 2,5$ i $\text{pK}_{a2} = 9,5$.

9. Identifikujte aminokiseline čije su titracione krive date na sledećim slikama:



10. U kojoj oblasti pH sledeće aminokiseline mogu da služe kao puferi: Gly, His, Asp, i Lys?

11. Koje biste aminokiseline izabrali za pufere sledećih pH: 4, 6, 9, i 12?

12. Kako biste pripremili 1 L 0,1 M Gly pufera pH 9,4 polazeći od Gly·HCl, čvrstog NaOH i vode? (pK_{a2} za Gly = 9,6) (11,2 g Gly·HCl; 5,18 g NaOH i H₂O do 1L)

13. Kako biste pripremili 1 L 0,1 M pufera pH 10 od glutaminske kiseline polazeći od Glu·HCl, 0,5 M NaOH i vode? (pK_{a3} za Glu = 9,67). (18,36 g Glu·HCl; 532 mL 0,1 M NaOH i H₂O do 1L)

Zadatak: Titracija nepoznate aminokiseline

ZADATAK: Uraditi titracionu krivu nepoznate aminokiseline. Naći na osnovu titracione krive pK_a vrednosti nepoznate aminokiseline i na osnovu toga je identifikovati.

Materijal:

40 mL 0,1 M rastvora nepoznate aminokiseline,
Standardni rastvori: 0,1 M HCl i 0,1 M NaOH,
Bireta od 25 mL, pH-metar, magnetna mešalica.

Postupak:

Standardizovati pH-metar pomoću pufera poznatog pH. Izmeriti pH rastvora date aminokiseline i na osnovu toga zaključiti da li će se titracija vršiti rastvorom NaOH ili HCl. Ukoliko je potrebno titrovati i kiselinom i bazom uzeti još jednu probu aminokiseline za titraciju. *Pažljivo staviti magnet u čašu i uključite magnetnu mešalicu, pazite da se pri tome ne slomi elektroda pH metra.* Iz birete dodavati rastvor kiseline ili baze, beležeći svaki put zapreminu dodatog rastvora i promenu pH (koristiti tabelu koja je data u prilogu). Titrovati dok pH rastvora ne prestane da se menja. Ponoviti postupak titracije sa slepom probom (voda koja je korišćena za rastvaranje aminokiseline) i zabeležiti dobijene vrednosti u tabelu.

Tabela 1: Titracija rastvora nepoznate aminokiseline

Zapremina (mL) 0,1 M NaOH ili 0,1 M HCl			
pH	Uzorak	Slepa proba	Razlika

...

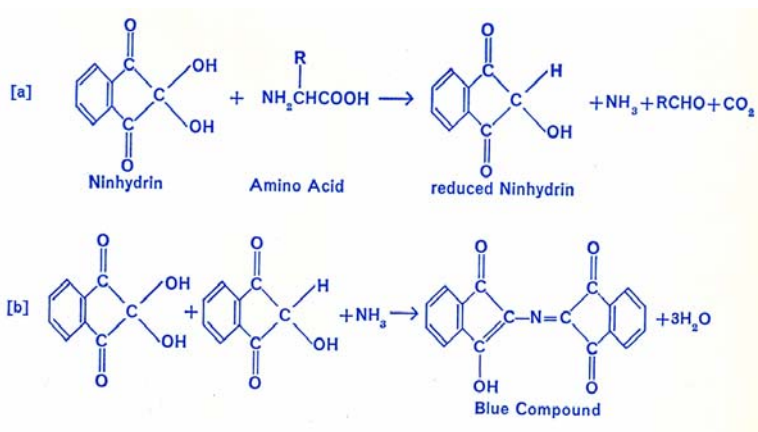
Nacrtati nekorigovane titracione krive uzorka i slepe probe, a potom i korigovanu titracionu krivu na osnovu koje odrediti pK_a vrednosti titrovane aminokiseline.

1.2 Dokazivanje aminokiselina: dokazne reakcije i planarna hromatografija

U ovom odeljku ćete se prvo upoznati sa ninhidrinskom reakcijom, koja se koristi za detektovanje (dokazivanje prisustva) aminokiselina i za njihovo određivanje. Ninhidrinska reakcija je jedna od najspecifičnijih reakcija koja postoji, vrlo je osetljiva i svaki biohemičar treba dobro da je poznaje. Potom ćete izvesti neke od dobro poznatih reakcija bočnih ostataka aminokiselina. Poznavanje ovih reakcija će Vam pomoći da bolje razumete reaktivnost bočnih ostataka aminokiselina, što će Vam biti od koristi u razumevanju modifikacija proteina. Pojedine od navedenih reakcija se primenjuju u praksi za detektovanje i određivanje odgovarajućih aminokiselina u smeši aminokiselina, ili u proteinima.

1. Reakcija sa ninhidrinom za sve aminokiseline

Ninhidrin (triketohindranton) reaguje sa svim α -aminokiselinama na pH između 4 i 8, dajući ljubičasto obojeno jedinjenje, osim prolina i hidroksiprolina koji daju sa ninhidrinom žutu boju. Reakcija je vrlo osetljiva. Ovu reakciju daju i primarni amini i amonijak, ali je reakcija mnogo manje osetljiva. Ninhidrinska reakcija se koristi za dokazivanje i određivanje aminokiselina u rastvoru, kao i za izazivanje hromatograma aminokiselina.

Materijal:

Rastvor aminokiselina u vodi (1 %), **10 mL**

Sveže pripremljen rastvor ninhidrina (0,2 %) u 95 % acetonu, **100 mL**

U epruvetu se sipa 1 mL ispitivanog rastvora (ili aminokiseline), proveri se pH rastvora pomoću inikatorske hartije i ukoliko je potrebno podesi dodatkom razblaženog rastvora NaOH na oko 7. U ovako pripremljeni rastvor se zatim doda oko pet kapi (0,2 mL) rastvora ninhidrina u acetonu i reakciona smesa zagreva na ključalom vodenom kupatilu, do pojave karakteristične ljubičaste boje, koja na svetlosti postepeno bleđi. Ukoliko se u ninhidrinski reagens dodaju soli bakra ili kadmijuma dobija se mnogo stabilniji, crveno obojeni, proizvod.

2. Ksantoproteinska reakcija za aromatične aminokiseline

Aminokiseline koje sadrže aromatično jezgro daju žuto obojene nitro derivate kada se zagrevaju sa koncentrovanom azotnom kiselinom. Soli ovih derivata su narandžaste boje.

Materijal:

Rastvor aromatičnih aminokiselina u vodi (1 %), **10 mL**

Rastvor fenola u vodi (1 %), **10 mL**

Koncentrovana azotna kiselina, **50 mL**

40 % rastvor natrijum hidroksida, **100 mL**

U 1 mL ispitivanog rastvora doda se 0,5 mL koncentrovane azotne kiseline, dobijeni rastvor ohladi i prati promena boje. Dodavanjem 40 % NaOH, do jako alkalne sredine, žuto obojen kiseli rastvor prelazi u narandžastu boju. Fenol i tirozin daju jako pozitivnu reakciju, dok fenilalanin daje slabo pozitivnu (ili negativnu) reakciju.

3. Milonova reakcija za tirozin

Jedinjenja koja sadrže fenolni ostatak reaguju sa Milonovim reagensom (rastvor merkurinitrita u 50 % azotnoj kiselini), dajući crveno obojene proizvode. Jedina takva aminokiselina je tirozin, kao i njegovi derivati, i zato samo ova aminokiselina daje pozitivnu reakciju. U ovom eksperimentu koristićete modifikovani Milonov reagens, koji je manje osetljiv na prisustvo neorganskih soli.

Materijal:

Rastvor fenola ili tirozina u vodi (1 %), **10 mL**
 Milonov reagens (15 % rastvor merkurisulfata u 15 % sumpornoj kiselini), **50 mL**
 0,1 % rastvor natrijumnitrita, **20 mL**

Doda se 5 kapi Milonovog reagensa u 1 mL rastvora koji se ispituje i zagreva se na ključalom vodenom kupatilu 10 minuta. Zatim se rastvor ohladi na sobnu temperaturu i doda 5 kapi rastvora natrijumnitrita. Crvena boja cigle je pozitivan rezultat.

4. Paulijeva (Pauly) reakcija za histidin

Diazotovana sulfanilna kiselina reaguje sa aminima, fenolima i imidazolima, dajući jako obojena azo jedinjenja. Diazonijumova jedinjenja stvaraju se na niskim temperaturama, te se zato svi rastvori hlade u ledu pre diazotovanja.

Materijal:

Aminokiseline (1 % rastvor), **10 mL**
 1 % rastvor sulfanilne kiseline u 10 % hlorovodoničnoj kiselini, **50 mL**
 5 % natrijum nitrit, **25 mL**
 10 % natrijumkarbonat, **25 mL**

Pomeša se 1 mL sulfanilne kiseline sa 2 mL u ledu ohlađenog ispitivanog rastvora, doda se 1 mL rastvora NaNO_2 i ostavi na hladnom 3 minuta. Dodavanjem 2 mL Na_2CO_3 podesi se da reakcija rastvora bude alkalna i posmatra nastajanje karakteristične boje (narandžasto-crvene za tirozin, trešnja-crvene za histidin).

5. Reakcija sa Erlihovim (Erllich) reagensom za triptofan

Erlihov reagens reaguje sa indolom iz triptofana, dajući crveno obojeni proizvod. Pored indola sa ovim reagensom reaguju i aromatični amini, urea i supstituisane uree.

Materijal:

Aminokiseline (1 % rastvor), **10 mL**
 Erlihov reagens (10 % rastvor p-dimetilbenzaldehida u konc. HCl), **50 mL**
 0,1 % uree, **20 mL**

Doda se 2 mL Erlihovog reagensa u 0,5 mL ispitivanog rastvora i posmatraju boje koje se javljaju.

6. Proba sa olovosulfidom za cistein i cistin

Kada se cistin i cistein zagravaju sa jakim alkalijama, jedan deo sumpora se pretvori u natrijumsulfid, koji može da se dokaže kao olovosulfid precipitacijom pomoću rastvora natrijumplumbata. Sumpor koji se nalazi u metioninu ne daje ovu reakciju.

Materijal:

Rastvor cisteina i cistina (1 %), **10 mL**
 Rastvor natrijumhidroksida (0,1 M), **200 mL**
 Rastvor olovoacetata (0,1 M), **50 mL**

Natrijumplumbat (priprema se neposredno pre eksperimenta, dodavanjem 5 mL 0,1 M NaOH u 2 mL olovoacetata i kuvanjem ove smeše na vodenom kupatilu, dok se nastali beli talog ne rastvori),
40 % natrijumhidroksid, **50 mL**

Ispitivani rastvor se zagreje do ključanja sa 0,5 mL 40 % NaOH i kuva 2 minuta. U ohlađeni rastvor se doda 0,5 mL rastvora natrijumplumbata, pri čemu nastaje crni talog. Ukoliko ne nastane talog proverite da li je rastvor alkalnog pH!

7. Sakagučijeva (Sakaguchi) proba za arginin

Jedina aminokiselina koja u svom molekulu sadrži guanidino grupu jeste arginin. Guanidino grupa reaguje sa α -naftolom, pri čemu u prisustvu oksidacionog sredstva, kao što je bromna voda, nastaje crveno obojeni proizvod.

Materijal:

Rastvor arginina u vodi (1%), **10 mL**

Rastvor natrijumhidroksid (40%), **50 mL**

Rastvor α -naftola u etanolu (1%), **20 mL**

Bromna voda (doda se nekoliko kapi broma u 100 mL destilovane vode i promeša). Ovo se radi u sobi za otrove.

Pomeša se 1 mL 40 % NaOH sa 3 mL ispitivanog rastvora (ili rastvora arginina) i doda 2 kapi rastvora α -naftola. Zatim se smeša dobro promućka i doda se 4 - 5 kapi bromne vode. Nastaje proizvod intenzivno crvene boje, koja vremenom bleđi.

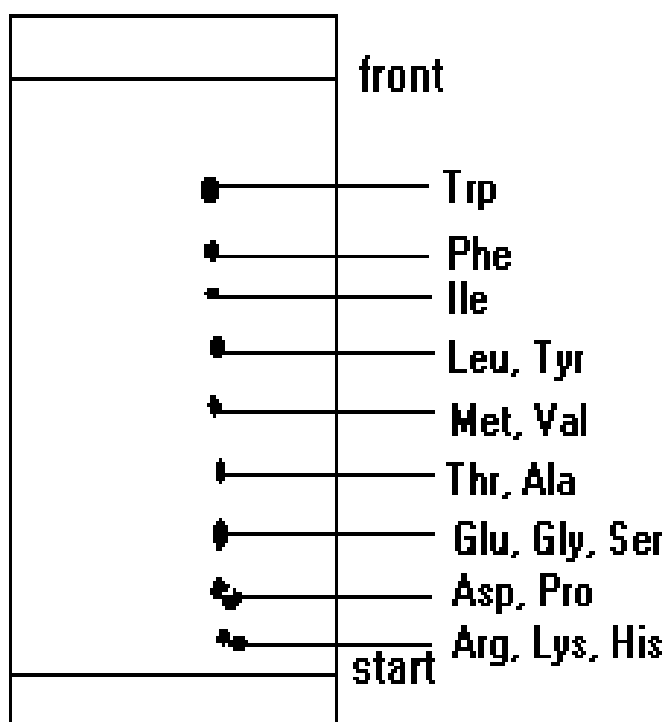
1.3 Hromatografija aminokiselina na tankom sloju silika-gela

U ovom eksperimentu koristite, za razdvajanje smeše aminokiselina i identifikaciju nepoznate aminokiseline, metodu hromatografije na tankom sloju, koja vam je poznata od ranije. Da se podsetimo, tankoslojna (planarna) hromatografija je metoda za razdvajanja supstanci na tankom sloju poroznog nosača, koji je nanosen na staklenu ili sintetičku ploču. Kao nosač (adsorbent) u tankoslojnoj hromatografiji najčešće se upotrebljava silika-gel ili prah celuloze, ali i aluminijum oksid, škrob i drugo. U adsorbente za tankoslojnu hromatografiju može da se doda i neka fluorescentna boja, što omogućuje detekciju supstanci koje apsorbuju u UV-oblasti spektra. Za razvijanje hromatograma koriste se smeše organskih rastvarača različite polarnosti. Razvijanje hromatograma vrši se u zatvorenim staklenim kadama, koje su prethodno zasićene parama rastvarača, uzlaznim postupkom na sobnoj temperaturi, jednodimenzionalno ili dvodimenzionalno. Za razdvajanje kompleksnih smeša (sa puno sastojaka koje želimo da razdvojimo) koristi se dvodimenzionalna hromatografija. U ovoj metodi se na ploču nanosi samo jedan uzorak u ugao ploče. Nakon razvijanja u prvoj dimenziji hromatogram se osuši i ploča stavi u drugi sistem rastvarača (*kako?*).

Za hromatografiju aminokiselina koristite silika-gel G i rastvarač koji je smeša n-butanola, glacijalne sirćetne kiseline i vode. Metoda je veoma osetljiva. Aminokiseline se nanose na ploču u količini 1 - 5 µg.

Rastvor aminokiselina(e) se nanosi mikropipetom ili kapilarom na ploču, približno 2 cm od njene ivice. Kada rastvarač ispari, ploča se stavlja u kadu koja je zasićena parama rastvarača za razvijanje hromatograma (n-butanol : glacijalna sirćetna kiselina : voda, u zapreminskom odnosu 60:20:20). Kada rastvarač stigne do 2/3 ploče, ona se vadi, osuši i postupak razdvajanja može da se ponovi. Kada rastvarač pri drugom razvijanju stigne do samog vrha ploče, ona se vadi iz kade, suši na vazduhu i potom u sušnici na temperaturi do 80° C (dok prestane da se oseća miris sirćetne kiseline). Hromatogram se potom izaziva kao što je to dole opisano.

Posle izazivanja ninhidrinskim reagensom dobija se hromatogram sličan ovome:



Izazivanje hromatograma

Posle razvijanja i sušenja, hromatogram treba pogledati pod UV lampom da bi se detektovale supstance koje fluoresciraju. Potom se hromatogram izaziva prskanjem ninhidrinskim reagensom. Detekcija određenih aminokiselina može se postići i prskanjem razvijenog hromatograma odgovarajućim reagensima (videti dole).

* Detekcija aminokiselina (peptida) ninhidrinskim reagenskom

Ninhidrinski reagens: 0,2 % rastvor ninhidrina u 95 % acetonu i nekoliko kapi kolidina (2,4,6, trimetilpiridin), ili nekoliko kapi glacijalne sirćetne kiseline. Ako je hromatografija vršena u kiselom rastvaraču, u ninhidrinski reagens se dodaje baza i obrnuto, ako je hromatografija vršena u baznom rastvaraču dodaje se kiselina. Posle prskanja reagensom, osušeni hromatogram se zagreva na 60° C tokom 20 minuta, ili na 100° C, 5 - 10 minuta, do pojave ljubičasto-plavih mrlja. Tokom zagrevanja hromatogram se često posmatra da ne bi došlo do pregrevanja, što će izazvati da i pozadina hromatograma postane obojena. Hromatogram se može razvijati i bez zagrevanja: ostaviti osušeni hromatogram u mraku (na primer u kaseti) preko noći.

Ninhidrin-kadmijumacetat: U normalni sud od 500 mL, koji sadrži 50 mL destilovane vode i 10 mL glacijalne sirćetne kiseline, doda se 0,5 g kadmijumacetata. Nakon rastvaranja soli dobijeni rastvor se dopuni do 500 mL acetonom. Ninhidrin u koncentraciji 0,2 % se rastvara u ovom rastvoru neposredno pre upotrebe. Postupak razvijanja hromatograma je isti kao napred opisani postupak sa ninhidrinskim reagensom. *Napomena: Boje dobijene izazivanjem hromatograma aminokiselina ninhidrinskim reagensom vremenom blede. Izazivanjem hromatograma sa ninhidrinskim reagensom koji sadrži jone kadmijuma dobijaju se trajno obojene crvene mrlje (za sve aminokiseline, osim prolina koji daje žutu boju).*

Erlihov reagens za triptofan: Osušeni hromatogram se prska sveže pripremljenim rastvorom p-dimetilaminobenzaldehida (1 g u 90 mL acetona i 10 mL konc. HCl). Triptofan daje purpurnu boju. Urea daje sa ovim reagensom žutu boju.

Sakagučijev reagens za arginin: Osušeni hromatogram se prvo isprska etanolnim rastvorom koji sadrži 0,01 % α -naftola, 5 % ureu i 5 % KOH (KOH se dodaje neposredno pre upotrebe). Hromatogram se malo prosuši na vazduhu, a zatim se isprska rastvorom koji sadrži 0,7 mL broma u 100 mL 5 % KOH. Arginin se pojavljuje kao crvena mrlja.

Paulijev reagens za histidin: Osušeni hromatogram se prvo isprska sveže pripremljenim rastvorom sulfanilne kiseline, koji se priprema na sledeći način: u dve zapremine rastvora sulfanilne kiseline (9 g kiseline rastvori se u rastvoru koji sadrži 90 mL konc. HCl u 1 L vode) doda se jedna zapremina 5 % NaNO_2 i jedna zapremina 20 % NaOH. Hromatogram se isprska ovim rastvorom i kada se osuši isprska se 10 % Na_2CO_3 . Histidin se pojavljuje kao svetlo žuta mrlja sa crvenim obodom. Sa ovim reagensom reaguje i tirozin (*ali ove dve aminokiseline lako mogu da se razlikuju, kako?*).

Nitroprusid za cistein i cistin: Osušeni hromatogram se prska rastvorom nitroprusida koji se priprema na sledeći način: 1,5 g natrijum nitroprusida se rastvori u 5 mL 1 M H_2SO_4 uz dodavanje 95 mL metanola i 10 mL 28 % amonijaka. Ovaj rastvor se procedi i do upotrebe čuva u frižideru. Cistein daje ružičastu boju.

Cistin se detektuje pomoću istog reagensa, samo što se hromatogram prethodno provuče kroz rastvor NaCN (2 g NaCN rastvori se u 5 mL vode i razblaži do 100 mL metanolom), malo prosuši, a zatim provuče kroz gornji rastvor nitroprusida. PAŽNJA! NaCN je jak otrov! Obavezno radite u kapeli, uz prisustvo asistenta ili tehničkog saradnika.

Zadatak: Identifikacija nepoznate aminokiseline

Zadatak: Identifikovati nepoznatu aminokiselinu (supstancu) primenom dokaznih reakcija i planarne (TLC) hromatografije. Obrazložiti odgovor sa najmanje dva dokaza (osobine).

Pre početka rešavanja ovog zadatka predlažemo vam da napravite plan i šemu rada. Sugestije:

1. Dobro razgledajte dobijenu supstancu, da li vam izgleda poznata?
 2. Ispitajte rastvorljivost vaše supstance u pogodnim (*kojim?*) rastvaračima. Ispitajte uticaj nekih faktora (*kojih?*) na rastvorljivost. Na osnovu zapažanja o rastvorljivosti, pokušajte da zaključite o prirodi vaše aminokiseline, odnosno supstance.
 3. Kada ste supstancu rastvorili (*obratite pažnju u kojoj zapremini, zašto?*), počnite sa izvođenjem karakterističnih reakcija, imajući u vidu zaključke do kojih ste već došli. Reakcije možete da izvodite u epruveti (pre i/ili posle hromatografije) koristeći uputstva koja su data u daljem tekstu. Paralelno, ili pre izvođenja reakcija sa vašim uzorkom, uradite reakcije sa poznatim aminokiselinama koje se nalaze u laboratoriji.
- Napomena:* Ukoliko sumnjate da imate neku drugu supstancu, a ne aminokiselinu, razmišljajte i o drugim dokaznim reakcijama sa kojima ste se upoznali na Neorganskoj ili Organskoj hemiji.
4. UV spektar (*U kojem slučaju biste ga primenili?*)
 5. Hromatografija na tankom sloju silika gela (planarna hromatografija). Na osnovu prethodnih ispitivanja treba već da imate neke predstave o kojoj(im) aminokiselini(ama), odn. supstanci, bi moglo da se radi i da prema tome izaberete odgovarajući rastvarač, standarde za poređenje i reagens za izazivanje hromatograma koji ćete, pored ninhidrinskog reagensa, da upotrebite.

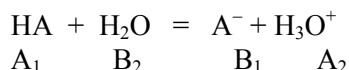
Dodatak uz vežbu 1: Puferi

Biohemičar se sreće sa puferima u svakodnevnoj laboratorijskoj praksi. Zato je poznavanje teorijskih i praktičnih aspekata pufera deo osnovnog obrazovanja svakog biohemičara. U okviru ove vežbe ćemo ponoviti i dopuniti dosadašnja teorijska znanja o puferima, a potom se upoznati sa puferima u biohemiji.

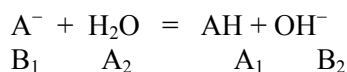
Zadatak: Obnoviti (ukoliko je potrebno) gradivo o slabim kiselinama i bazama i puferima. Proučiti dole navedeni materijal o puferima u biohemiji. Uraditi navedene zadatke. Pripremiti u dogovoru sa asistentom pufer koji ćete koristiti u nekoj od narednih vežbi.

Slabe kiseline i baze

Po protolitičkoj teoriji, kiselina se definiše kao supstanca koja može da otpušta protone, a baza kao supstanca koja može da prima protone. Ovo se odnosi i na vodenu i na nevodenu sredinu. U vodenoj sredini ovaj proces može da se predstavi na sledeći način:



gde su A_1 i A_2 međusobno konjugovani par kiselina, a B_1 i B_2 međusobno konjugovani par baza. HA je kiselina jer predaje proton. A^- je baza jer može da primi proton, npr. u reakciji u kojoj H_2O igra ulogu kiseline:



Svaka slaba kiselina ili baza može da se okarakteriše svojom konstantom disocijacije. Za slabu kiselinu biće:

$$K'_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_2\text{O}][\text{HA}]} \qquad K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HA}]}$$

Za njenu konjugovanu bazu:

$$K'_b = \frac{[\text{HA}][\text{OH}^-]}{[\text{A}^-][\text{H}_2\text{O}]} \qquad K_b = \frac{[\text{HA}][\text{OH}^-]}{[\text{A}^-]}$$

Kakav je odnos između ove dve konstante? Ako ih pomnožimo, dobićemo:

$$K_a \cdot K_b = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \cdot \frac{[\text{HA}][\text{OH}^-]}{[\text{A}^-]} = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14} \text{ (jonski proizvod vode)}$$

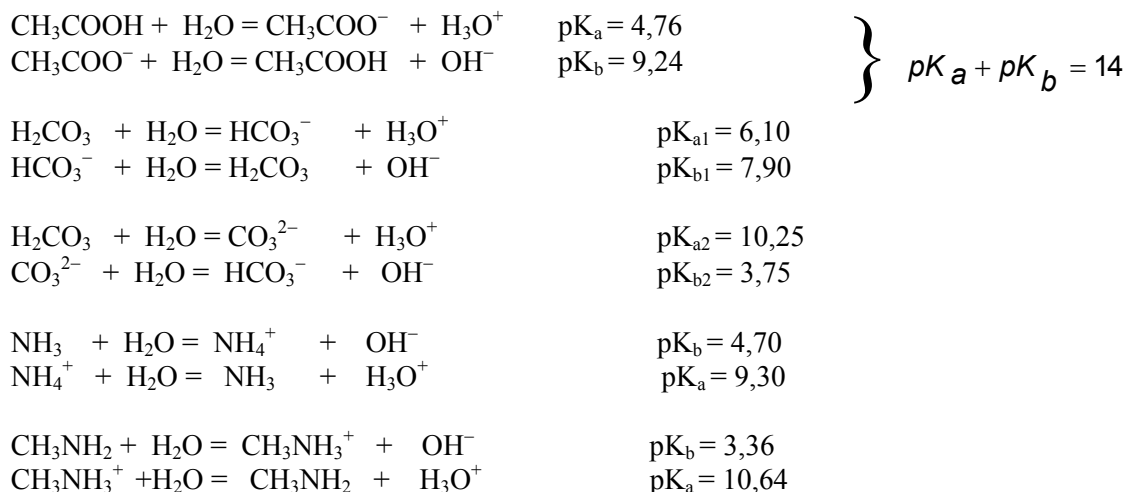
odnosno:

$$pK_a + pK_b = 14$$

Isti odnos važi i za slabu bazu i njenu konjugovanu kiselinu:

$$K_a \cdot K_b = \frac{[B][H_3O^+]}{[BH^+]} \cdot \frac{[BH^+][OH^-]}{[B]} = 10^{-14} \quad \therefore \quad pK_a + pK_b = 14$$

U gornjim jednačinama primenjen je uobičajen način označavanja: $pX = -\log(X)$. Odavde proizilazi da svaku slabu kiselinu ili bazu možemo okarakterisati njenom konstantom kiseline (K_a) ili konstantom konjugovane baze (K_b). Na primer:



Slabe kiseline i baze u vodenom rastvoru nisu potpuno disosovane. Kod kiselina je, na primer, jedan deo u HA a drugi u A^- obliku. Procenat disosovanog oblika u odnosu na ukupnu količinu kiseline ili baze naziva se **stepen disocijacije**. Odnos disosovanog i nedisosovanog oblika zavisi od K_a i od pH (koncentracije H_3O^+). Ako logaritmujeemo izraz za K_a i preuredimo dobijenu jednačinu dobićemo:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad \rightarrow \quad \log K_a = \log[H_3O^+] + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$-\log[H_3O^+] = -\log K_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = pK_a + \log[A^-]/[HA]$$

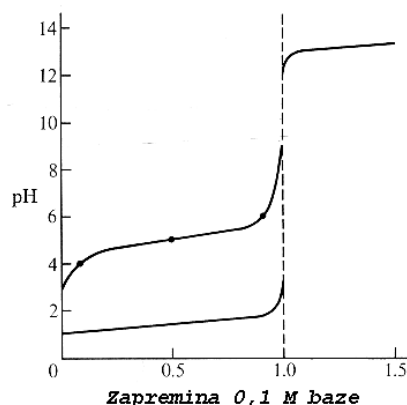
Gornja jednačina se naziva *Henderson-Hasselbachova jednačina* i u biohemiji se, kao što ćemo videti, mnogo primenjuje.

Za slabe baze može se izvesti analogni izraz:

$$pH = pK_a + \log[B]/[BH^+]$$

Titracija slabih kiselina

Kada se slaba kiselina titruje jakom bazom dobija se titraciona kriva kao na slici 4-1.



Slika 1-5 – Kriva titracije slabe kiseline jakom bazom

pH se u svakom stadijumu titracije može izračunati iz Henderson-Hasselbachove jednačine. Pre početka titracije pH će odgovarati pH kiseline:

$$K_a = [H_3O^+][A^-]/[HA] \quad pH = \frac{1}{2}(pK_a + p[HA])$$

Kada je kiselina delimično utrošena pH rastvora će zavisiti od odnosa koncentracija preostale kiseline i nastale soli (čija koncentracija odgovara koncentraciji dodate baze):

$$pH = pK_a + \log[A^-]/[HA]$$

Kada je $\frac{1}{2}$ kiseline istitrovano koncentracija soli je jednaka koncentraciji kiseline pa će pH rastvora biti jednako pK_a :

$$[A^-] = [HA] \quad pH = pK_a$$

U oblasti pH oko pK_a rastvora se vrlo malo menja s dodatkom baze (*puferska oblast*). Kada je cela kiselina utrošena pH će biti alkalno zbog hidrolize nastale soli:

$$K_b = [OH^-][HA]/[A^-] \rightarrow pOH = \frac{1}{2}pK_b + p[A^-] \rightarrow pH = 14 - pOH$$

Laboratorijski puferi

Termin **pufer** označava odupiranje promeni. U hemiji se pod nazivom pufer podrazumeva *rastvor slabe kiseline i njene soli (ili rastvor slabe baze i njene soli) koji ima osobinu da sprečava velike promene pH pri dodavanju manjih količina H^+ ili OH^-* . Poznavanje pufera je za svakog biohemičara neophodno, kako zbog razumevanja osnovnih biohemijskih procesa, tako i zbog svakodnevne laboratorijske prakse.

Ako imamo rastvor slabe kiseline i njene soli, pH rastvora će po Henderson-Hasselbach-ovoj jednačini zavisiti od pK_a kiseline i odnosa koncentracija soli i kiseline:

² U daljem tekstu pisaćemo H^+ umesto H_3O^+ itd.

$$pH = pK_a + \log \frac{[so]}{[kiselina]}$$

Može se uzeti da koncentracija HA odgovara količini kiseline, a koncentracija A^- količini soli u puferu. Zbir ovih koncentracija naziva se **molaritet pufera**. Na primer, u 0,2 M acetatnom puferu zbir koncentracija sirćetne kiseline i acetatnih jonova je 0,2 M.

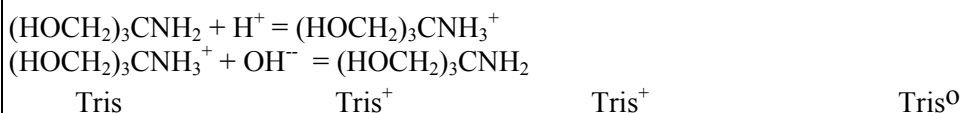
Mala količina H^+ koja se doda u rastvor pufera neutrališe se nastajanjem odgovarajuće količine kiseline HA, i obratno, OH^- se neutrališe u reakciji sa HA. Kako se pri ovome menja odnos $[A^-]/[HA]$ i pH će se malo promeniti. Sposobnost pufera da se odupre promeni pH biće najveća kada je $pH = pK_a$. Oblast u kojoj se jedna slaba kiselina ili baza ponašaju kao puferi je veća i iznosi $pK_a \pm 1$ (Slika 1-5). U prilogu II date su pK_a vrednosti nekih kiselina i baza koje se koriste u laboratorijskoj praksi za pravljenje pufera. Za pufere u kiselom području pH uzimaćemo supstance sa $pK_a < 7$, a za pufere u baznoj oblasti supstance sa $pK_a > 7$. Sposobnost pufera da se odupre promeni pH zavisi od njegovog **kapaciteta**. Mera za **kapacitet pufera** je promena pH nastala u zavisnosti od količine dodatih H^+ ili OH^- jona (nagib titracione krive). *Kapacitet pufera se definiše kao ona količina H^+ ili OH^- jona koju treba dodati u dati pufer da bi mu se pH promenilo za 1. Kapacitet će biti isti u kiselom i alkalnom smeru samo kod pufera kod kojih je $pH = pK_a$. Kapacitet datog pufera zavisice od koncentracije komponenti (0,2M pufer ima veći kapacitet od 0,1M pufera) i od pH (zbog odnosa pH i pK_a).* Potpuno analogno razmatranje može se primeniti i na slabe baze što će se videti iz sledećeg primera.

Primer:

Neka reakcija katalizovana enzimom izvođena je u 0,2 M Tris puferu ($pK_a = 8,1$) na pH 7,8. Kao rezultat reakcije nastaje 0,03 mol/L H^+ jona. (a) Napisati jednačinu reakcije kojom ovaj pufer održava pH konstantnim. (b) Odrediti koncentracije $Tris^+$ i $Tris^0$ na početku i na kraju reakcije. (c) Odrediti pH pufera na kraju reakcije. Koliki bi bio pH kada bi se reakcija vršila bez pufera? (d) Kako biste pripremili 1 L ovog pufera polazeći od $Tris \cdot HCl$ i čvrstog NaOH? (e) U kojoj oblasti pH Tris može da se upotrebi kao pufer? Koliki je kapacitet ovog pufera?

Tris je komercijalni naziv za tris(hidroksimetil)aminometan. Hidroksilne grupe povećavaju rastvorljivost ovog amina u vodi.

(a) Reakcije Trisa sa H^+ i OH^- jonima:



(b)

$$pH = pK_a + \log \frac{[Tris^0]}{[Tris^+]} \rightarrow 7,8 = 8,1 + \log \frac{[Tris^0]}{[Tris^+]} \rightarrow \log \frac{[Tris^0]}{[Tris^+]} = 0,5$$

Na početku reakcije, pošto je $[Tris^0] + [Tris^+] = 0,2$ M biće $[Tris^+] = 0,133$ M i $[Tris^0] = 0,067$ M. Na kraju reakcije je $[H^+] = 0,030$ M, te je zato $[Tris^+] = 0,163$ M i $[Tris^0] = 0,037$ M.

(c)

$$pH = 8,1 + \log(0,037/0,167) = 7,456 \approx 7,5$$

Bez pufera: $pH = -\log(0,03) = 1,52$

Znači, pH pufera se smanjilo sa 7,8 na 7,5 a bez pufera bi se pH smanjilo na 1,5. Međutim, ovo pH se najverovatnije ne bi ni dostigao jer bi se enzim na nižim pH denaturisao.

(d) Odmerili bismo 0,2 mola (31,4 g) Tris•HCl i 0,067 mola NaOH (2,68 g), rastvorili ih u izvesnoj količini H₂O, proverili pH rastvora i rastvor razblažili do 1L. Pošto pH zavisi od odnosa [Tris⁰]/[Tris⁺], pH ne bi trebalo da se promeni (videti odeljak *Razblaženje pufera*).

(e) $pH = pK \pm 1 = 8,1 \pm 1 \rightarrow 7,1 < pH < 9,1$

$$6,8 = 8,1 + \log [Tris^0]/[Tris^+] \rightarrow [Tris^0]/[Tris^+] = 0,05$$

$$[Tris^0]/[Tris^+] = 0,20 \quad [Tris^+] = 0,190 \text{ M}$$

Smanjenjem pH za 1 (7,8 → 6,8) [Tris⁺] se povećava sa 0,133 M na 0,190 M, što odgovara [H⁺] = 0,057 M (kapacitet u kiselom smeru). Na isti način možemo da pokažemo da će kapacitet ovog pufera u alkalnom smeru (pH 7,8→8,8) biti [OH⁻] = 0,051 M.

Razblaživanje pufera

Prema Henderson-Hasselbachovoj jednačini pH pufera zavisi samo od pK_a i odnosa koncentracija kiseline i konjugovane baze, te pri razblaženju pH pufera ne bi trebalo da se menja. Međutim, pri velikom razblaženju (kada je koncentracija pufera reda veličine K_a) doći će do promene pH pri razblaženju pufera. Do ovoga dolazi iz više razloga. Koeficijenti aktiviteta se pri razblaženju rastvora približavaju jedinici, a stepen disocijacije konjugovane baze (ili kiseline) se povećava. Pri naročito velikim razblaženjima treba uzeti u obzir i koncentraciju H⁺ jona iz vode.

Puferi konstantne jonske sile

Puferi različitog sastava pa čak i puferi istog sastava, na različitim pH, imaju različite jonske sile. Podešavanje jonske sile pufera može se postići dodavanjem potrebne količine neke neutralne soli kao što je NaCl.

ZADACI I PROBLEMI (Odgovori)

- Koliko je pH 0,2 M rastvora: (a) H₃PO₄, (b) KH₂PO₄, (c) K₂HPO₄, (d) K₃PO₄, (e) CH₃COOK, (f) NH₄Br, (g) Na-fenolata, (h) Na₃-citrata, (i) Na₂-citrata, (j) etanolamin-hidrohlorida ? (Za pK vrednosti videti Prilog). (a) 1,46; b) 4,67; c) 9,76; d) 12,74; e) 9,03; f) 4,98; g) 11,59; h) 9,35; i) 5,07; j) 5,07).
- Koliko je [H⁺] i pH rastvora dobijenog mešanjem 100 mL 0,2 M KOH sa 150 mL 0,1M sirćetne kiseline ? ([H⁺] = 5·10⁻³ M; pH = 12,3)
- Kolika je [H⁺] i pH rastvora dobijenog mešanjem 250 mL 0,1 M limunske kiseline sa 300 mL 0,1 M KOH? ([H⁺] = 7,25·10⁻⁵ M; pH = 4,14)
- Kolika je koncentracija H⁺ i pH rastvora dobijenog mešanjem 400 mL, 0,2 M NaOH sa 150 mL 0,1 M H₃PO₄ ? ([H⁺] = 1,6·10⁻¹³ M; pH = 12,8)
- Koliko je pH rastvora dobijenog rastvaranjem 5,35 g NH₄Cl u 1 L 0,2 M NH₃ ? (pH = 9,56)
- Koliko je mL 0,2 M KOH potrebno za potpunu neutralizaciju 650 mL 0,05 M limunske kiseline? Kako izgleda titraciona kriva? (487,5 mL)

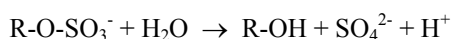
7. Koliko anhidrovane limunske kiseline, a koliko NaOH treba uzeti da bi se pripremio 1 L citratnog pufera pH 5,2 koji je 0,2 M u odnosu na Na^+ ? (22,28 g limunske kiseline; 8 g NaOH i H_2O do 1L)

8. Kako biste napravili 0.1 M fosfatni pufer pH 7,2, ako na raspolaganju imate samo kristalni Na_3PO_4 i koncentrovanu HCl? (16,39 g Na_3PO_4 ; 10,65 mL konc.HCl i H_2O do 1L)

9. Purin ksantin ima dva protona koji mogu da jonizuju ($\text{pK}_a = 7,53$ i $\text{pK}_{a2} = 11,63$). Kako biste napravili 1 L pufera pH 7,40 koji je 0,001M u odnosu na ksantin polazeći od 0,1 M NaOH ili 0,1 M HCl, destilovane vode i ksantina. (0,15 g ksantina + 15,7 mL 0,1 M HCl i H_2O do 1L)

10. Koliko je mL 0,1 M HCl potrebno da se pH 1200 mL fosfatnog pufera promeni sa 5,6 na 5,0 ako je koncentracija pufera 57 mM? (37,2 mL)

11. Hidrolizom sulfatnog estra nastaju H^+ joni:



Gornja reakcija je izvođena u 1 mL 0,02 M Tris pufera (pH = 8,10), a koncentracija estra je bila 0,01 M. Reakcija je katalizovana enzimom sulfatazom. Posle 10 minuta pH reakcione smeše je opao na 7,97. Koliko je μmola R-O-SO_3^- hidrolizovano tokom tih 10 minuta? (1,49 $\mu\text{mol/L}$)

13. Uporedite kapacitet 0,4 M acetatnog pufera pH 6,6 sa kapacitetom 0,6 M fosfatnog pufera pH 7, 5. (Fosfatni pufer je bolji iz dva razloga: kapacitet je veći I pH acetatnog pufera je izvan puferske oblasti a fosfatnog nije).

Prilog: Slabe kiseline I baze koje se koriste za pufere u biohemiji

IME (TRIVIJALNO)	STRUKTURA	pKa
Pirofodfat		1,52 2,36 6,60 9,25
Maleat		1,92 6,23
Fosfat		2,12 7,21 12,32
Glicin	$\text{H}_3^+\text{NCH}_2\text{COOH}$	2,34 9,78
Ftalat		2,95 5,41
Citrat		3,09 4,75 5,41
Glicilglicin	$\text{H}_3^+\text{NCH}_2\text{C(=O)NHCH}_2\text{COOH}$	3,06 8,13
Format	HCOOH	3,77
Acetat	CH_3COOH	4,76
Piridin		5,14
MES		6,15
PIPES		6,8
HIPES		7,55
	$(\text{HOCH}_3)_3+\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	7,5
	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_3+\text{NH}$	7,77
TRIS	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_3^+$	8,10
TRICIN	$(\text{HOCH}_2)_3\text{C}+\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	8,15
BICIN	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2+\text{NHCH}_2\text{COOH}$	8,35
Borat	H_3BO_3	9,23
Bikarbonat	HCO_3^-	10,3
Trietilamin (TEA)	$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3+\text{NH}$	10,65

VEŽBA 2 Upoznavanje sa proteinima

Polazeći od prethodne vežbe u kojoj ste se upoznali sa aminokiselinama kao polibaznim kiselinama u okviru ove vežbe ćete prvo primeniti ta znanja te detaljnije obraditi elektrolitičke osobine peptida i proteina. Ta znanja se primenjuju u eksperimentalnom radu sa proteinima (taloženje, rastvaranje, hromatografske i elektroforetske tehnike) kao i za razumevanje njihove strukture i aktivnosti (funkcije). U okviru eksperimentalnog dela upoznaćete neke od osnovnih osobina proteina na primerima proteina iz lako dostupnog (i bezbednog) biološkog materijala kao što su mleko i jaje. *Steći ćete predstavu o tome kako izgledaju proteini, kako se talože i rastvaraju, uočićete razlike među različitim proteinima. Na osnovu zapažanja o rastvorljivosti proteina pri raznim uslovima uočićete razlike između nativnog i denaturisanog proteina. Na osnovu dokaznih reakcija za aminokiseline utvrdićete da li postoje razlike u aminokiselinskom sastavu datih proteina.* Sa ovom vežbom počinjete da se bliže upoznajete sa fizičkim i hemijskim osobinama proteina i eksperimentalnim radom sa njima.

PRIPREMA VEŽBE: Proučite priloženi materijal o elektrolitičkim osobinama peptida i proteina i izolovanju proteina taloženjem na osnovu razlika u njihovoj rastvorljivosti. Uradite zadatke. Rezimirajte ukratko cilj i predmet eksperimentalne vežbe. Pokušajte da objasnite kako će navedeni postupci/reagensi da deluju na date proteine. Pripremite pitanja za teorijske vežbe.

2.1. Elektrolitičke osobine peptida i proteina

Naelektrisanje peptida i proteina na određenom pH jednako je zbiru naelektrisanja ostataka aminokiselina koje mogu da disosuju. To su: krajnja (terminalna) amino i karboksilna grupa i grupe iz bočnih ostataka aminokiselina: bazne grupe Lys, His i Arg, karboksilne grupe Asp i Glu, fenolna grupa Tyr i sulfhidrilna grupa Cys. pK_a vrednosti ovih grupa kod peptida i proteina mogu i znatno da odstupaju od onih u slobodnim aminokiselinama. Na veličinu odstupanja utiče blizina elektron-privlačnih grupa, kao što su hidroksilna, amidna ili tiolna, koje povećavaju kiselost grupa sa kojima interaguju. Koliko će ovaj efekat biti izražen zavisi i od dielektrične konstante medijuma, pri čemu treba imati u vidu da se dielektrična svojstva medijuma na površini molekula proteina mogu znatno razlikovati u odnosu na okolni rastvor. Na pK_a vrednosti utiče i jonska sila rastvora: što je jonska sila rastvora veća pK_a vrednosti su manje. Navedeni faktori ne utiču poednako na sve ostatke aminokiselina u molekulu proteina, tako da se pK_a vrednosti istoimenih ostataka aminokiselina u molekulu proteina mogu razlikovati među sobom. Opseg i srednje vrednosti pK_a za funkcionalne grupe u proteinima date su u tabeli 2-1.

Tabela 2.1 – Opseg i srednje vrednosti pK_a funkcionalnih grupa u proteinima

	Opseg		Srednja vrednost
α -COOH (terminal)	3.0	3.6	3.3
δ ili γ -COOH (Asp, Glu)		3.0	4.7 3.8
Imidazol (His)	5,6	7.0	6,3
α -NH ₂ (terminal)	7.5	8.4	8.0
ϵ -NH ₂ (Lys)	4.4	10.6	10.0
Guanidino (Arg)	12.0	13.0	12.5
Fenolna-OH (Tyr)	9.8	10.4	10.1
-SH (Cys)	9.1	10.8	10.0

Primer:

Kolika je šarža tripeptida Gly-Asp-Gly na pH = 4 ? Koliko je pI ovog peptida?

Šaržu računamo kao što je napred pokazano za aminokiseline. Ukupna šarža jednaka je zbiru α -ŠCOO⁻] + β -ŠCOO⁻] + α -ŠNH₃⁺] = (-0,85) + (-0,53) + (+1,00) = -0,4.

Dati peptid se može posmatrati kao monoamino-dikarbonska kiselina (pK_{a1} odgovara α -karboksilnoj grupi Gly, a pK_{a2} β -karboksilnoj grupi Asp) pa je, prema tome:

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} = \frac{(3,2) + (3,8)}{2} = 3,5$$

Primer:

Ovalbumin (mol. masa 45 000 daltona) sadrži sledeće ostatke polifunkcionalnih aminokiselina:

Tyr 9, Cys 2, Cys 25, Arg 15, His 7, Lys 20, Asp 32, Glu 52, amida 31, i 1 N-acetilovani kraj.

Kolika je šarža ovog proteina u kiseloj sredini (potpuno protonovan oblik), a kolika u baznoj sredini (potpuno disosovan oblik)? Koliko je pI ovalbumina?

Pošto molekul ovalbumina ima 54 COOH grupe, 20 NH_3^+ , 7 His^+ , 15 Arg^+ , 5 SH, i 9 fenolnih OH grupa, ukupna šarža u kiseljoj sredini biće +42, a u alkalnoj –35 (Arg je uzet kao protonovan).

pI kod ovako kompleksnog molekula ne može da se izračuna na način pokazan za peptide. pI se može naći iz titracione krive: pI će odgovarati pH na kojem su 42 od prisutnih 54 COOH grupa u ovalbuminu istitrovane. pI se može izračunati pomoću Henderson-Hasselbachove jednačine uzimajući $\text{pK}_a = 3,7$ (srednja vrednost za COOH grupe). Na taj način dobijamo:

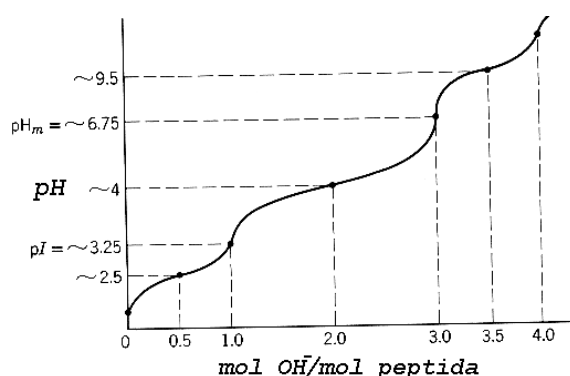
$$\text{pH} = 3,7 + \log(42/12) = \text{pI} = 4,2$$

42 = broj COO^- grupa
12 = broj preostalih COOH.

Dobijena vrednost se dobro slaže sa eksperimentalno određenom koja iznosi 4,6.

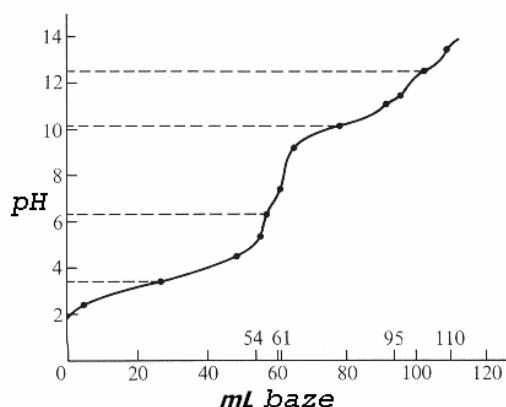
Titracione krive peptida i proteina

Peptidi: Titracione krive peptida se konstruišu na analog način kao što je opisano za aminokiseline. Primera radi, na slici 4-1 prikazana je titraciona kriva za peptid Glu-Ser-Glu-Val·HCl.



Slika 2-1 – Titracija Glu-Ser-Glu-Val·HCl

Proteini: Titracione krive za proteine konstruišemo na osnovu pK_a vrednosti i broja naelektrisanih funkcionalnih grupa. Kriva za ovalbumin (Slika 4-2) konstruisana je polazeći od sledećih podataka: 54 COOH grupe (sa C-kraja i iz bočnih nizova) ($\text{pK}_a = 3,8$), 7 imidazol grupa ($\text{pK}_a = 6,3$), 20 NH_3^+ grupa ($\text{pK}_a = 10,0$), 14 OH i SH grupa zajedno ($\text{pK}_a = 10,1$), i 15 guanidino grupa ($\text{pK}_a = 12,5$).



Slika 2-2 – Titracija ovalbumina

Slaganje eksperimentalne i teorijske titracione krive kod proteina obično je mnogo slabije nego kod peptida. Pri titraciji proteina treba voditi računa da pri promeni pH može da dođe do denaturacije. Vrlo je mali broj proteina dovoljno stabilan u tako širokom opsegu pH da bi se mogli titrovati u nativnom obliku.

Zadaci i problemi

1. Koji je od sledećih peptida rastvorljiviji u vodi:

(a) Phe₂₀ ili Gly₂₀, (b) Asp₂₀ ili Glu₂₀ na pH 6, (c) Phe₂₀ ili Tyr₂₀

2. Izračunati pI za peptid Tyr-Asn-Leu-Thr.

3. Nacrtati titracionu krivu i izračunati pI za vazopresin:

Cys-Tyr-Phe-Glu-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-amid



(Srednje vrednosti pK_a za funkcionalne grupe u proteinima nalaze se u tabeli 4-1).

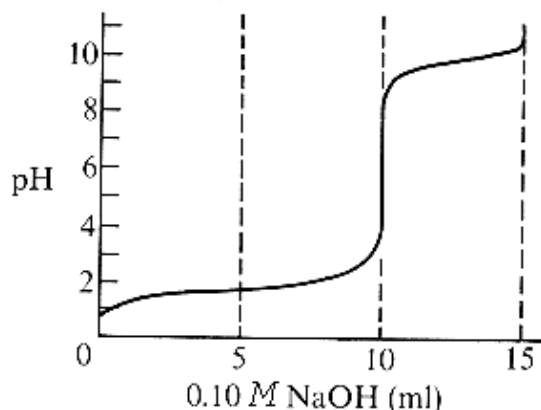
4. Glutation, γ -Glu-Cys-Gly, ima sledeće pK_a vrednosti: 2,12; 2,34; 8,66 i 9,62.

Nacrtati titracionu krivu za ovaj peptid, obeležiti koje su jonske vrste prisutne na platoima krive i izračunati njegovo pI.

5. Nacrtati titracionu krivu i izračunati pI za α -melanocitni-stimulativni hormon (MSH):

Acetil-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Tyr-Gly-Lys-Pro-Val-amid.

6. Nepoznati tripeptid (10 mg) je potpuno hidrolizovan s 5.7M HCl, i višak HCl je potpuno odstranjen. Suvi ostatak je rastvoren u vodi i titrovan sa 0,1 M NaOH. Dobijena je titraciona kriva sledećeg oblika:



(a) izračunati molekulsku masu tripeptida, (b) napisati moguće strukture tripeptida.

7. Napisati strukturnu formulu Glu-Gly-Tyr-Lys. Koliko bi bilo približno pI za ovaj peptid? U kom intervalu pH će ovaj peptid delovati kao pufer?

8. Uraditi isto kao u zadatku 7 za peptid Lys-Val-Thr-Asp(NH₂)-Tyr-Glu.

9. Uraditi isto kao u zadatku 7 za peptid Lys-His-Tyr.

10. Hemoglobin (Hb) i oksihemoglobin (HbO₂) su slabe kiseline: ($pK_a(\text{Hb}) = 7,71$ a $pK_a(\text{HbO}_2) = 7,16$). Izračunati za koliko je veća koncentracija protonovanog oblika HbO₂ od Hb na pH 7,4.

2.2. Principi izolovanja proteina: ekstrakcija i taloženje

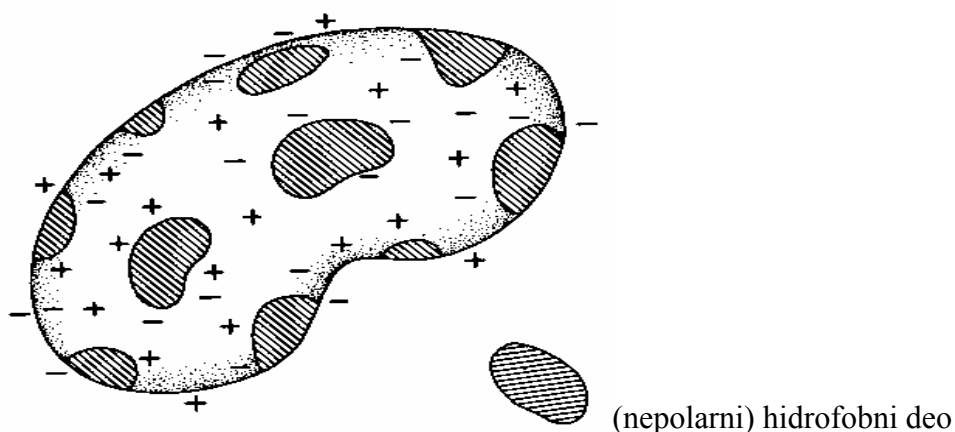
U bilo kojem biološkom materijalu nalazi se veliki broj različitih proteina, koji su naravno i različito zastupljeni. Problem koji se obično pred istraživača postavlja je izolovanje jednog, određenog, od ovih proteina. Kako se to postiže? Pošto se proteini razlikuju po rastvorljivosti, prva faza u kojoj može da se izvrši grubo frakcionisanje, a izuzetno i izolovanje određenog proteina je ekstrakcija (ako je polazni materijal čvrst), ili taloženje (ako je polazni materijal tečan). Tako se iz ekstracelularnih tečnosti proteini talože, a ukoliko se protein izoluje iz čvrstog materijala (organ, tkivo, mikroorganizmi) prva faza je dezintegracija i homogenizacija, a potom se proteini iz homogenizata ekstrahuju pomoću odgovarajućih

pufera. Kako se i ovde dobija smeša proteina, dalje sledi njihovo frakcionisanje, takođe taloženjem. *Taloženjem*, proteini koji su bili u rastvoru prelaze u agregate, koji su dovoljno veliki da se mogu lako odvojiti centrifugovanjem.

Različita rastvorljivost proteina bila je zapažena još u najstarijim danima proteinske hemije. *Tako su proteini koji se rastvaraju u vodi nazivani albumini, a proteini koji se ne rastvaraju u vodi, već u razblaženim rastvorima soli, globulini. Ovi nazivi su se još uvek zadržali (npr. albumin iz seruma, ovalbumin iz belanceta, imunoglobulini).*

Proteini iz rastvora mogu da se talože podešavanjem pH, dodatkom soli ili organskih rastvarača. Kada je pH rastvora blisko pH vrednosti koja predstavlja izoelektričnu tačku proteina - pI, rastvorljivost proteina je najmanja (*zašto?*). Proteini se rastvaraju u prisustvu manjih koncentracija soli, dok se u prisustvu većih koncentracija soli proteini talože. *Rastvorljivost proteina se smanjuje i pri njihovoj denaturaciji, što se u nekim slučajevima može koristiti za odstranjivanje neželjenih proteina iz smeše.*

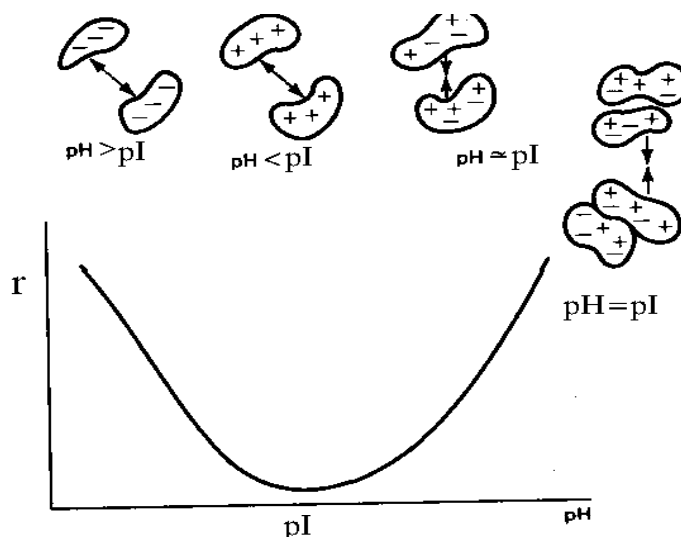
Rastvorljivost nativnog proteina zavisi od prisustva i rasporeda hidrofilnih (polarnih: naelektrisanih i nanaelektrisanih) i hidrofobnih (nepolarnih) delova na površini molekula proteina (Slika 2-3). Na površini molekula proteina nalazi se većina polarnih ostataka, od kojih su pojedini (*koji?*) pozitivno ili negativno naelektrisani na određenom pH. Većina nepolarnih ostataka aminokiselina nalazi se u unutrašnjosti proteina, ali se izvestan broj, koji naravno varira od proteina do proteina, nalazi i na površini (Slika 2.3).



Slika 2-3 - Na površini molekula globularnih proteina nalaze se polarni (nanaelektrisani i naelektrisani) aminokiselinski ostaci, kao i delovi u kojima dominiraju nepolarni aminokiselinski ostaci.

Molekuli proteina se nalaze u rastvoru jer njihovi bočni ostaci (*koji?*) grade vodonične veze sa molekulima vode i elektrostatičke interakcije sa jonima soli iz rastvora, kao i što se molekuli proteina, usled istoimenog naelektrisanja koja nose, međusobno odbijaju.

Taloženje proteina na pI: Kada je ukupno naelektrisanje molekula proteina blisko nuli (kada je pH rastvora $\approx$ pI datog proteina) odbijanje među molekulima proteina je najmanje, dolazi do interakcija (privlačenja) među molekulima proteina i nastajanja agregata koji se talože (Slika 2.2). Ovaj efekat se povećava pri smanjenju jonske sile rastvora (*zašto?*).



Slika 2-4 - Rastvorljivost (r) proteina u blizini njihove izoelektrične tačke (pI)

Taloženje proteina solima: Taloženje proteina iz rastvora pri povišenim koncentracijama soli može se objasniti na više načina. Najjednostavnije objašnjenje je da usled solvatacije jona soli u rastvoru dolazi do odstranjivanja molekula vode sa površine molekula proteina, što omogućuje nastajanje interakcija među nepolarnim delovima susednih molekula proteina.

Najpodesnija so (osim ako treba da se koristi u alkalnoj sredini) za taloženje proteina je amonijumsulfat (AS). Amonijumsulfat je vrlo rastvorljiv u vodi (533 g/L - 4,05 M; za zasićeni rastvor treba uzeti 761 g za 1 litar vode na 20° C), rastvorljivost mu se ne menja mnogo sa temperaturom i što je takođe važno koncentrovani rastvor AS (2 - 3 M) stabilizuje proteine. Taloženje proteina iz rastvora amonijumsulfatom vrši se dodavanjem čvrstog (sprasjenog) AS, ili dodavanjem zasićenog rastvora AS.

Uobičajeno je da se rastvor proteina koji je zasićen sa AS obeležava kao zasićenje 100 %, a koncentracije AS pri kojima se pojedini proteini talože izražavaju se kao procenat od 100 % zasićenja. Tako npr. ako se neki protein taloži pri zasićenju 33 % to odgovara koncentraciji AS jednakoj 33 % od zasićenog rastvora AS. Količinu čvrstog AS u gramima (g) koju treba dodati u 1 litar rastvora određenog zasićenja (% S1) da bi se postiglo neko više zasićenje (% S2) može se izračunati iz formule:

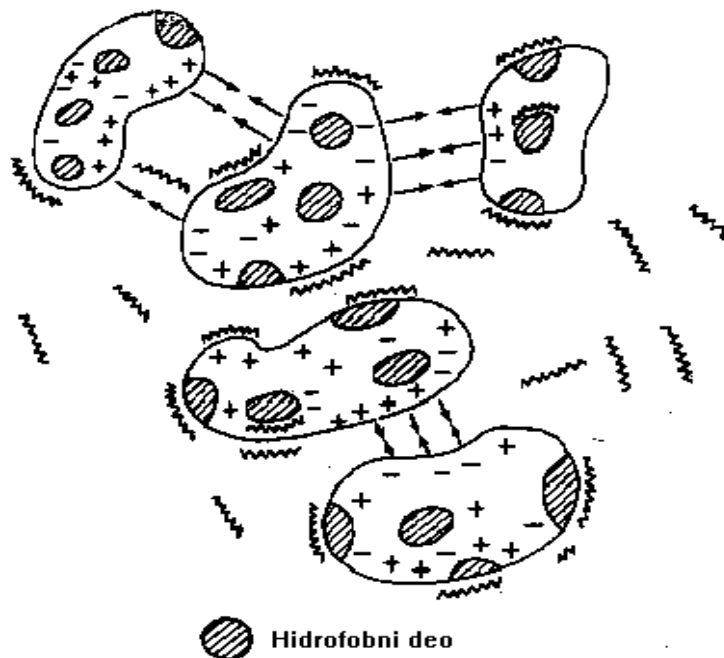
$$g = \frac{533 \cdot (S2 - S1)}{100 - 0,3 \cdot S2}$$

Umesto čvrstog AS, da bi se obezbedilo bolje i brže mešanje, kada je to moguće, dodaje se zasićeni rastvor AS. Zapremina (V) zasićenog rastvora AS koju treba dodati u rastvor koji već sadrži C1 % (v/v), da bi se dobila C2 % iznosi (za 1 litar rastvora):

$$V \text{ (mL)} = \frac{10 \cdot (C2 - C1)}{100 - C2}$$

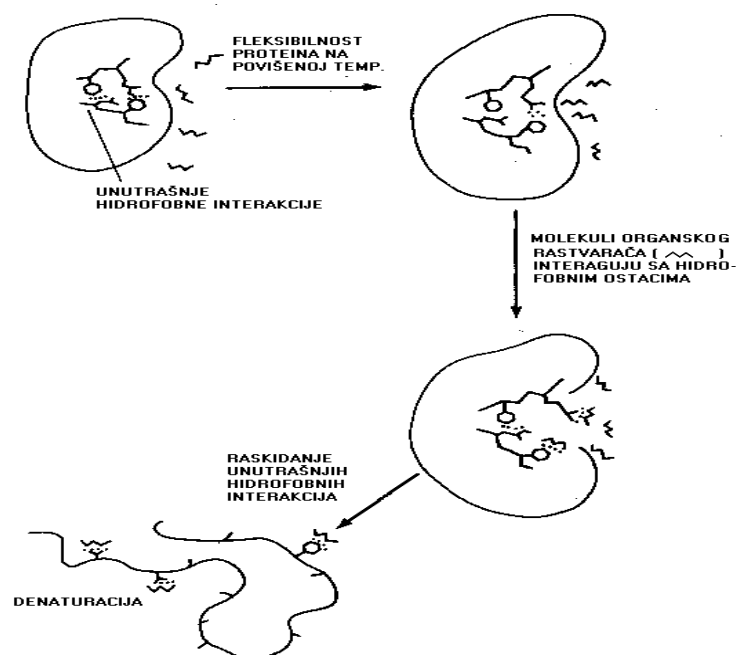
Kako je rastvor AS slabo kiseo (*zašto?*), taloženje se obično izvodi u fosfatnom puferu (50 mM) pH 6-7.

Taloženje proteina iz rastvora organskim rastvaračima (na primer etanolom ili acetonom), zasniva se na smanjenju aktiviteta vode kojom je okružen molekul proteina. Kako je time dielektrična konstanta rastvora smanjena, povećavaju se elektrostatičke interakcije među polarnim delovima različitih molekula proteina, što dovodi do njihovog agregiranja i taloženja (Slika 2.3).



Slika 2-5 - Agregiranje proteina u smeši voda /organski rastvarač

Na višim temperaturama organski rastvarači izazivaju denaturaciju proteina (Slika 4-6), što se izbegava ako se radi na hladno. Denaturacija proteina može se, kao što ćemo videti, izazvati i na druge načine: toplotom, drastičnim promenama pH rastvora, dodatkom nekih agenasa (urea, detergents). Pri denaturaciji dolazi do razvijanja proteinske globule, pri čemu nepolarni ostaci, koji su bili u unutrašnjosti proteina, dolaze u dodir sa vodom. Denaturisani proteini manje su rastvorni od nativnih, osim ako se u rastvoru ne nalaze pomenuti agensi za denaturaciju (*pokušajte ovo da objasnite!*).



Slika 2-6 - Denaturacija proteina organskim rastvaračima

PRILOG. TABLICE ZA PODEŠAVANJE KONCENTRACIJE RASTVORA AMONIJUM-SULFATA

VREDNOSTI ZA 0 °C

KRAJNJI % ZASIĆENJA (S_2)

PO^ETNI % ZASI^ENJA (S_1)

	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	67	70	75	80	85	90	95	100
0	53	80	106	134	164	187	194	226	258	291	326	361	398	421	436	476	516	559	603	650	697
5	27	56	79	108	137	162	166	197	229	262	296	331	368	390	405	444	484	526	570	615	662
10		28	53	81	109	133	139	169	200	233	266	301	337	358	374	412	452	493	536	581	627
15			26	54	82	87	111	141	172	204	237	271	316	327	343	381	430	460	503	547	592
20				27	55	75	83	113	143	175	207	241	276	296	312	349	387	427	469	512	557
25					27	46	56	84	115	146	179	211	245	264	280	317	355	395	436	488	522
30							28	56	86	117	148	181	214	233	249	285	323	362	402	445	488
33								40	70	101	133	166	200	216	235	271	309	347	387	429	472
35								28	57	87	118	151	184	201	218	254	291	329	369	410	453
40									29	58	89	120	153	170	182	212	258	296	335	376	418
45										29	59	90	123	138	156	190	226	263	302	342	383
50											30	60	92	107	125	159	194	230	268	308	348
55												30	61	76	93	127	161	197	235	273	313
60													31	44	62	95	129	164	201	239	279
65															31	63	97	132	168	205	244
67																52	85	130	156	194	233
70																32	65	99	134	171	209
75																	32	66	101	137	174
80																		33	67	103	139
85																			34	68	105
90																				34	70
95																					35

VREDNOSTI ZA 25 °C

KRAJNJI % ZASIĆENJA (S_2)

PO^ ETNI % ZASI ENJA (S ₁)		10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	67	70	75	80	85	90	95	100	
	0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	446	472	516	561	608	662	709	767	
10				57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	380	406	449	494	537	592	634	694	
15				28	58	88	107	119	151	185	219	255	292	331	347	371	412	456	501	547	596	647	
20					29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	313	340	382	424	456	520	559	619	
25						30	49	61	93	125	158	193	230	267	280	307	348	390	429	485	522	583	
30							19	30	62	94	127	162	198	235	247	273	314	356	394	449	485	546	
33								12	43	74	107	142	177	214	227	252	292	333	372	426	462	522	
35									31	63	94	129	164	200	213	238	278	319	358	411	447	506	
40										31	63	97	132	168	180	205	245	285	322	375	410	469	
45											32	65	99	134	147	171	210	250	287	339	373	431	
50												33	66	101	113	137	176	214	250	302	336	392	
55													33	67	80	103	141	179	215	264	298	353	
60														34	47	69	105	143	179	227	261	314	
65																34	70	107	143	190	224	275	
67																	55	91	129	177	209	251	
70																		35	72	107	153	186	237
75																			36	72	115	149	198
80																				36	77	112	157
85																					36	75	114
90																							79
95																							38

Zadatak: Upoznavanje sa fizičkim i hemijskim svojstvima proteina mleka i belanceta jajeta

*ZADATAK: U dogovoru sa asistentom izolujte prvo kazein i/ili radite sa celokupnim (obranim) mlekom i belancetom koje ćete pripremiti na dole opisani način. Ispitajte dejstvo navedenih agenasa/postupaka na taloženje/rastvaranje proteina i na osnovu vaših zapažanja zaključite koji od njih izazivaju denaturaciju proteina. Formirajte tabelu i u nju unesite zapažanja. Izvedite dokazne reakcije na prisustvo određenih aminokiselinski ostataka u datim proteinima (Odeljak 3.2) i rezultate unesite u drugu tabelu. Rezimirajte razlike između kazeina i ovalbumina koje ste uočili. **Studenti koji su pokazali dobar uspeh na vežbama mogu, ukoliko to žele, da u dogovoru sa asistentom izoluju i ispituju osobine i nekih drugih proteina.***

Izolovanje kazeina iz mleka

Kazein, koji čini oko 80 % proteina mleka, predstavlja heterogenu frakciju koja se taloži na pH 4,6 i 20° C. Postoje tri glavne komponente kazeina: alfa, beta i kapa kazein, koji se međusobno razlikuju po aminokiselinskom sastavu, sadržaju vezanog šećera i jona kalcijuma. Kazeini se u mleku nalaze u obliku sfernih struktura (micela) prečnika 50 - 300 nm, od kojih potiče karakteristična bela boja mleka.

Postupak:

50 mL nekuvanog (obranog) mleka razblažite sa 150 mL destilovane vode. U ovaj rastvor, zagrejan na 40° C, pažljivo dodajte u kapima 2 % HCl do pH 4,8 (oko 5 mL). *Posmatrajte šta se dešava tokom dodavanja HCl, ako radite pažljivo lako ćete uočiti kada je taloženje potpuno.* Proverite pH rastvora na pH-metru i doterajte ga do pH 4,6. Nastavite sa mešanjem tokom još 5 - 10 minuta, a zatim ostavite da se talog slegne u frižideru tokom 1/2 sata.

Rastvor nad talogom (supernatant) odekantujte (i sačuvajte za određivanje količine proteina u njemu), a talog resuspendujte u preostalom rastvoru i prenesite ga u kivetu za centrifugu. Odvojite kazein centrifugovanjem na 4000 obrtaja/minuti, tokom 5 - 10 minuta, a supernatant pripojite prethodnom. Talog kazeina resuspendujte u destilovanoj vodi (pomoću staklenog stapića ili "Vorteksa") i ponovo centrifugujte. Ponovite operaciju ispiranja kazeina do negativne reakcije na hloride (2 - 3 puta). Ovaj preparat kazeina možete koristiti u daljim eksperimentima. Ukoliko želite da osušite preparat (odstranite vodu iz njega) dobijeni talog isperite na isti način dva puta sa 96 % etanolom, a potom sa etrom (1 - 2 puta). Na ovaj način ćete dobiti preparat u obliku belog lakog taloga.

Albumin iz belanceta (ovalbumin)

Ovalbumin čini 64 % od proteina belanceta i prema tome njegova je glavna proteinska komponenta. Jedan je od prvih proteina dobijenih u kristalnom stanju. To je kompaktan sferni molekul molekulske mase 45 000 Da.

Postupak:

Stavite jedno belance u 500 mL destilovane (dejonizovane) vode i energično promešajte. Zabeležite šta ste zapazili i pokušajte vaša zapažanja da objasnite. Procedite rastvor kroz više slojeva gaze da biste odvojili membrane. Energično mešajte staklenim štapićem da biste ubrzali prolazak belanceta kroz gazu.

Ispitivanje rastvorljivosti kazeina i ovalbumina

Taloženje proteina amonijumsulfatom: U 3 mL ispitivanog rastvora proteina dodajte iz pipete zasićeni rastvor amonijumsulfata. Zabeležite zapreminu pri kojoj dolazi do taloženja. Ukoliko ne dolazi do taloženja dodajte čvrsti amonijumsulfat do zasićenog rastvora. Izračunajte zasićenje amonijumsulfata pri kojem dolazi do taloženja.

Taloženje proteina 96 % etanolom: Eksperiment izvodite kao što je gore opisano, samo što u rastvor proteina dodajte ohlađeni 96 % etanol. Taloženje etanolom po pravilu se radi na hladno (u čaši sa ledom). Zabeležite zapreminu etanola pri kojoj dolazi do taloženja i izračunajte koncentraciju etanola pri kojoj dolazi do taloženja. Taloge odvojite centrifugovanjem i sačuvajte ih za ispitivanje rastvorljivosti.

Taloženje proteina promenom pH: U po 2 mL rastvora proteina dodajte pažljivo u malim kapima, pomoću npr. Pasterove pipete, rastvor 0,1 M HCl odnosno 0,1 M NaOH i posmatrajte da li dolazi do taloženja. Izmerite pH (pomoću univerzalnog indikatora, ako nije moguće na pH-metru).

Taloženje (koagulacija/denaturacija) proteina zagrevanjem: Po 2 mL rastvora svakog proteina stavite na ključalo vodeno kupatilo i posmatrajte da li (i posle koliko vremena) dolazi do taloženja. Odvojite nastale taloge centrifugovanjem i sačuvajte ih za ispitivanje rastvorljivosti.

Taloženje (koagulacija/denaturacija) proteina raznim reagensima:

U 1 - 2 mL rastvora proteina dodajte u kapima sledeće reagense:

- 1 M (ili konc.) HCl i 1 M (ili konc.) NaOH,
- 10 % rastvor trihlorsirćetne kiseline (TCA),
- 0,05 M HgCl₂ ili 0,05 M PbAc.

Posmatrajte da li (i posle koliko vremena) dolazi do taloženja proteina.

Rastvaranje dobijenih taloga proteina: Dobijene taloge pokušajte da rastvorite (ne zaboravite blago mešanje) u destilovanoj vodi. Ako se proteini ne rastvaraju pokušajte sa pažljivom promenom pH (dodavanjem 0,1 M HCl i 0,1 M NaOH), dodavanjem čvrstog NaCl i na kraju, ako ništa od ovog ne pomogne, dodajte u suspenziju proteina čvrstu ureu.

Vežba 3 Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina rutinski se i veoma često primenjuje u biohemijskoj praksi. Postoji više metoda i postupaka za određivanje koncentracije proteina. Izbor metode, između ostalog, zavisi i od prirode materijala, količine uzorka i koncentracije proteina u njemu. U okviru ove vežbe upoznaćete metode za određivanje koncentracije proteina sa kojima ćete se sretati u svojoj biohemijskoj praksi, a potom ćete odrediti koncentraciju proteina u datom uzorku primenjujući metodu koju smatrate najpodesnijom.

PRIPREMA: Ukoliko vam to od ranije nije poznato upoznajte se sa principom rada spektrofotometra i Lambert-Beerovim zakonom (Uvodni biohemijski praktikum). Upoznajte se sa principima metoda za određivanje koncentracije proteina koje su opisane u ovom odeljku. Gde je potrebno, prikažite hemijske reakcije na kojima se metoda zasniva. Zamislite/predpostavite u kojim slučajevima biste primenili svaku od navedenih metoda. Razjasnite zašto se za određivanje koncentracije proteina kolorimetrijskim metodama koristi standardna prava, a ne apsorptivnost ili samo apsorbancu jedne poznate koncentracije proteina? Uočite prednosti i nedostatke svake od navedenih metoda. Pripremite pitanja za teorijske vežbe.

Metode za određivanje koncentracije proteina obuhvataju:

- a) *Gravimetrijske metode:* direktno merenje izolovanog proteina posle liofilizovanja i sušenja na 60° C u vakuumu nad P₂O₅ do konstantne težine. Potrebno je 1 - 2 mg uzorka.
- b) *Određivanje azota po Kjeldalu:* zasniva se na određivanju azota na osnovu količine amonijaka u prethodno mineralizovanom (do amonijumsulfata) uzorku. Potrebno je 1 - 2 mg uzorka. Metoda se još primenjuje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.
- c) *Aminoanaliza:* određivanje se zasniva na određivanju aminokiselina prisutnih u hidrolizovanom uzorku pomoću aminoanalizatora. Potrebno je 5 - 10 nmola uzorka, mada se u specijalizovanim laboratorijama aminoanaliza može uraditi i sa 50 - 100 pmola uzorka.
- d) *Spektrofotometrijske metode:* određivanje se zasniva na specifičnoj apsorpciji svetlosti proteina u UV oblasti. Većina proteina ima apsorpcioni maksimum na 280 nm koji potiče od tirozina i triptofana. Ukoliko apsorptivnost (ekst. koeficijent) proteina koji određujemo nije poznat, uzima se kao srednja vrednost $A_{280}^{1\text{mg/ml}} = 0,91$. Nukleinske kiseline, koje su često prisutne u preparatu proteina, apsorbuju takođe na 280 nm, ali im je maksimum na 260 nm. Koncentracija proteina može da se dobije merenjem apsorbance rastvora na 260 i 280 nm i primenom tablica (videti kod vežbe iz nukleinskih kiselina) ili iz jednačine:

$$\text{Koncentracija proteina (mg/mL)} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$$

- e) *Kolorimetrijske metode:* određivanje se zasniva na (inter)reakciji proteina sa odgovarajućim reagensom, pri čemu nastaje obojeni proizvod čija je koncentracija ("jačina" boje) proporcionalna koncentraciji proteina. Određivanje se vrši na osnovu standardne prave (krive) koja se pravi sa proteinom poznate koncentracije. Za standard se obično uzima goveđi serum albumin (BSA), koji se prethodno osuši na 60° C u vakuumu nad P₂O₅ do konstantne mase, ili se alternativno koncentracija albumina određuje na osnovu A_{280} (1 mg/mL) = 6,6 za BSA. Najviše primenjivane kolorimetrijske metode (kao i metode za određivanje proteina uopšte) su: *biuretska*, *Lowry-jeva* i *vezivanje boje (Bradford-ova metoda)*. Rad u kojem je

opisana Lowry-jeva metoda (J. Biol. Chem. (1951), **193**:265) najviše je citirani naučni rad u istoriji. Opisaćemo detaljnije ove metode.

Biuretska metoda

Ova metoda zasniva se na osobini peptidne veze da u jako alkalnoj sredini gradi ljubičasti kompleks sa Cu(II) koji ima apsorpcione maksimume na oko 545 nm i na oko 260 nm. Intenzitet boje, pod određenim eksperimentalnim uslovima, proporcionalan je koncentraciji peptidnih veza (odnosno proteina). Merenje se po pravilu vrši u vidljivoj oblasti. Pri povećanju pH dolazi do deprotonovanja NH grupe iz peptidne veze (jer je iz poznatih razloga ovaj proton slabo kiseo) i tako se deprotonovani azot koordinuje sa Cu(II), dajući karakteristični ljubičasto obojeni kompleks, kvadratno planarne geometrije. *Da li biste umeli da prikazete ovu reakciju i predložite moguću strukturu kompleksa?* Azot iz peptidne veze može da se koordinuje samo ako je deprotonovan. Vezivanje protonovanog azota (NH grupe) zahtevalo bi promenu valentnog stanja azota iz sp^2 u sp^3 , što bi dovelo do (nepovoljnog) narušavanja karaktera peptidne veze.

Biuretski reagens:

Rastvorite 1,5 g kuprisulfata ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 6,0 g natrijum-kalijumtartarata i 30 g NaOH u 500 mL destilovane vode. Ako dodate 1 g kalijumjodida, reagens može da traje beskonačno u dobro zatvorenoj plastičnoj flaši.

Postupak:

U 0,5 mL rastvora (koji sadrži do 3 mg proteina) dodajte 2,5 mL reagensa. Posle 20 - 30 minuta merite apsorbancu na 540 nm naspram slepe probe ili fiziološkog rastvora (na isti način kao kod pripreme standardne prave). Koncentraciju proteina odredite na osnovu standardne prave koju ćete pripremiti pomoću albumina poznate koncentracije (5 - 6 mg/mL). Standardna prava se priprema na sledeći način: pripremite 6 epruveta u koje stavite rastvore kao što je predviđeno u tabeli:

Broj epruvete		1	2	3	4	5	6
mL 0,9 % NaCl		0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0
mL rastvora albumina	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	
mL biuretskog reagensa		2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Posle 20 - 30 minuta merite apsorbancu na 540 nm u svakoj probi. Merenje vršite naspram epruvete broj 1 (slepa proba) ili naspram fiziološkog rastvora (destilovane vode), u kojem slučaju oduzmite vrednost za slepu probu.

Lowry-jeva metoda

Ova metoda zasniva se, pored nastajanja kompleksa biuretskog tipa sa Cu(II), na redukciji Folin-Ciocalteu-ovog reagensa (fosfomolibdenska i fosfovolframova kiselina) pomoću bočnih ostataka tirozina i triptofana. Metoda je vrlo osetljiva: 5 μ g proteina lako se određuje.

Reagensi:

Rastvor A: Rastvorite 0,5 g kuprisulfata ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) i 1 g natrijumcitrata u 100 mL destilovane vode. Rastvor je neograničeno stabilan.

Rastvor B: Rastvorite 20 g Na_2CO_3 i 4 g NaOH u 100 mL destilovane vode.

Rastvor C: U 50 mL rastvora B dodajte 1 mL rastvora A.

Rastvor D: U 5 mL Folin-Ciocalteu fenolnog reagensa dodajte 5 mL vode.

Postupak:

U 0,5 mL uzorka (koji sadrži do 0,5 mg proteina) dodajte 2,5 mL rastvora C, izmešajte i ostavite 5 - 10 minuta. Zatim dodajte 0,25 mL rastvora D. Dobro promešajte i ostavite 20 - 30 minuta da se boja razvije. Merite na talasnoj dužini između 600 i 750 nm (kako ćete izabrati talasnu dužinu na kojoj ćete vršiti merenje?). Koncentraciju odredite na osnovu standardne prave, koju pripremate po analogiji sa postupkom opisanim kod Biuretske metode.

Vezivanje boje

U ovim metodama određivanje proteina se zasniva na vezivanju boje za molekul proteina, pri čemu dolazi do pomeranja apsorpcionog maksimuma vezane, u odnosu na apsorpcioni maksimum slobodne nevezane boje. Vezivanje molekula boje i proteina ostvaruje se elektrostatičkim i hidrofobnim interakcijama. Metode su jednostavne i osetljive, ali se stepen vezivanja boje veoma razlikuje od proteina do proteina. Pri većim koncentracijama proteina dolazi do taloženja kompleksa protein-boja.

Bradfordov reagens:

60 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 rastvori se u 1 litru 3 % perhlorne kiseline i rastvor procedi da bi se odvojila nerastvorena boja. Apsorbanca ovog rastvora na 465 nm treba da je između 1,3 i 1,5.

Postupak:

U 1,5 mL rastvora proteina (koji sadrži do 50 μg proteina) dodajte 1,5 mL Bradfordovog reagensa i posle 20 - 30 minuta čitajte apsorbanču na 595 nm. Ukoliko dolazi do taloženja, pripremite novu, razblaženu probu. Praktičnije je da odmah pripremite razblaženje 1:10 i 1:100. Koncentraciju proteina odredite na osnovu standardne prave koju pripremate po analogiji sa napred opisanim postupkom.

Zadatak: određivanje koncentracije proteina u datom uzorku

Zadatak: Odredite koncentraciju proteina u uzorku koji ćete dobiti od asistenta ili tehničkog saradnika. Od navedenih metoda izaberite onu koju smatrate najpogodnijom za Vaš uzorak. Obrazložite vaš izbor.

Vežba 4 Gel filtracija i jonoizmenjivačka hromatografija; SDS elektroforeza proteina

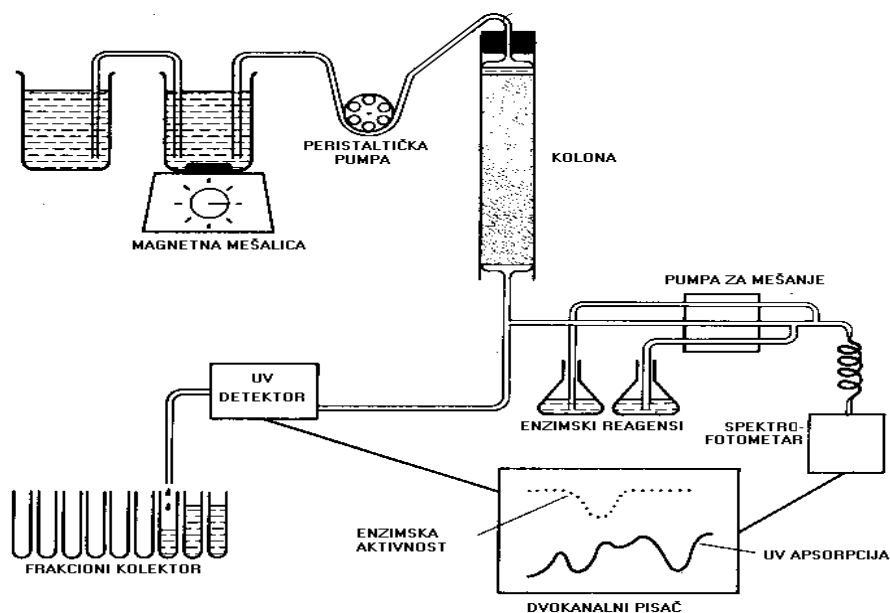
UVOD: gel filtracija i jonoizmenjivačka hromatografija

Cilj ove vežbe je da se bliže upoznate sa hromatografskim metodama za izolovanje proteina, koje se rutinski primenjuju u biohemijskim laboratorijama. Vrlo je mali broj proteina koji se iz biološkog materijala mogu izolovati u čistoj formi, samo primenom taložnih metoda sa kojima ste se se upoznali u prethodnoj vežbi. Po pravilu, primenom taložnih metoda postiže se grubo frakcionisanje, a protein koji želimo da izolujemo se izdvaja dalje iz odgovarajuće frakcije primenom hromatografskih metoda. U nekim slučajevima se i cela polazna smeša može direktno (bez prethodnog frakcionisanja taloženjem) hromatografski razdvajati. Sa principima na kojima se zasnivaju hromatografske metode upoznali ste se na kursevima iz analitičke hemije, ovde ćemo se samo ukratko osvrnuti na osnovne hromatografske metode koje se koriste u biohemiji. Za *hromatografsko razdvajanje proteina* koriste se razlike u njihovim svojstvima: veličini i obliku molekula (gel-filtracija), naelektrisanju molekula (jonoizmenjivačka hromatografija), biološkoj aktivnosti (afinitetna hromatografija) i rastvorljivosti (neke od HPLC metoda). U okviru ovog odeljka ukratko je opisano kako se izvodi hromatografija proteina, a potom je dat osvrt na gel filtraciju i jonoizmenjivačku hromatografiju. Sa gel filtracijom ćete se praktično upoznati u okviru vežbe određivanja molekulske mase hemoglobina, a sa jonoizmenjivačkom hromatografijom na primeru odvajanja i određivanja frakcije glikozilovanog hemoglobina HbA1 (HbA1c).

PRIPREMA VEŽBE: Ponovite sve što ste spremali, radili i naučili na proteklm vežbama iz proteina, naročito principe taloženja proteina i elektrolitičke osobine aminokiselina, peptida i proteina. Podsetite se šta smo na predavanjima govorili o metodologiji rada sa proteinima. Proučite dole navedeni materijal o gel filtraciji i jonoizmenjivačkoj hromatografiji proteina. Rezimirajte o čemu se radi u okviru eksperimentalnih vežbi. Pripremite pitanja za teorijske vežbe.

4.1 Aparatura za hromatografiju proteina

Jedna tipična i kompletna aparatura za hromatografiju proteina prikazana je na slici 6.1. Naravno, u zavisnosti od primene, pojedini delovi (*šta mislite koji?*) mogu da se izostave.

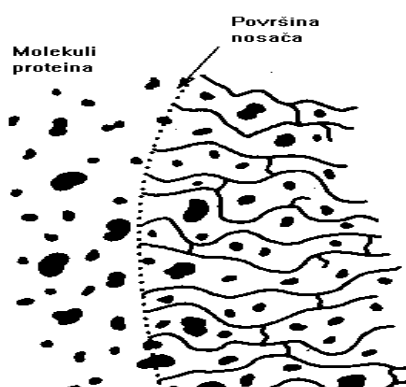


Slika 4-1 - Kompletna aparatura za hromatografiju proteina

4.2 Gel-filtracija

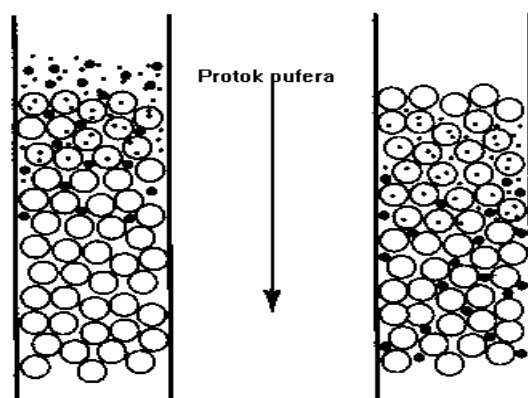
Naziv gel-filtracija za ovu metodu, iako najbolje ne odgovara, u najširoj je upotrebi, pa ćemo ga i mi primenjivati. Metoda se naziva i gel hromatografija, molekulsko prosejavanje, gel permeaciona hromatografija. Metoda se primenjuje za razdvajanje proteina, rasoljavanje (odvajanje veće količine soli od proteina), za izmenu pufera (npr. za pripremu uzoraka za jonoizmenjivačku hromatografiju), kao i za određivanje nepoznate molekulske mase proteina.

Osnovni princip na kojem se zasniva metoda jednostavan je: gel se sastoji iz otvorene trodimenzionalne molekulske mreže, koja je napravljena u obliku kuglica da bi se obezbedio bolji protok pufera kroz kolonu. Pore unutar mreže takvih su dimenzija da, pri eluiranju kolone puferom, manji molekuli iz smeše koju smo naneli na kolonu mogu, dok veći ne mogu u njih da uđu (Slika 4.2).



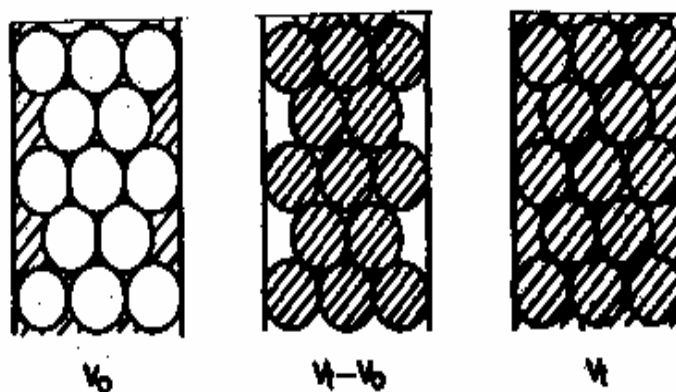
Slika 4-2 - Dvodimenzionalni prikaz materijala za gel filtraciju: vidi se dostupnost različitih delova gela za molekule različite veličine

Shematski prikaz principa gel-filtracije, koji uzima u obzir i odnose između dimenzija molekulskih vrsta koje učestvuju u procesu, dat je na slici 4.3.



Slika 4-3 - Princip razdvajanja molekula različite veličine gel-filtracijom: molekuli koji ne ulaze u pore gela kreću se brzo kroz kolonu "ispred fronta rastvarača"

Veličine koje karakterišu gel-filtraciju su elucione zapremine: V_0 , V_t (Slika 4.4) i V_e (Slika 4.5). V_0 ("void volume" ili "dead volume": "početna" ili "mrtva" zapremina) predstavlja zapreminu između pora gela i odgovara elucionoj zapremini supstance velike molekulske mase, koja bez zadržavanja prolazi kroz kolonu. V_t odgovara ukupnoj zapremini kolone i odgovara elucionoj zapremini supstance male molekulske mase, koja se najviše zadržava u porama gela. V_e je eluciona zapremina datog molekula (proteina), koja se nalazi između V_0 i V_t (Slika 4.4).



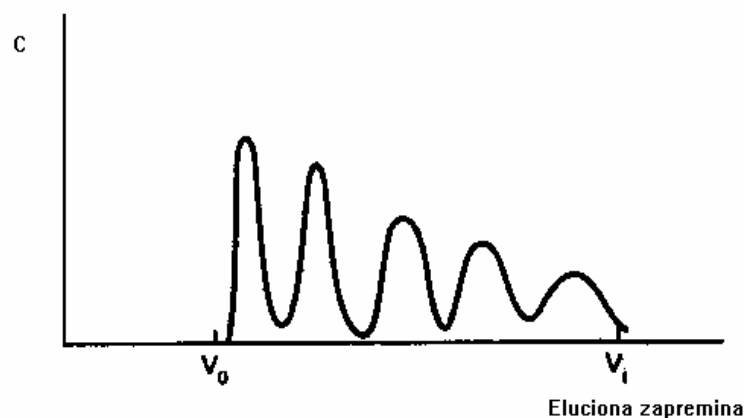
Slika 4-4 - Shematski prikaz V_t i V_0

Ponašanje datog molekula pri gel-filtraciji karakteriše se elucionom zapreminom V_e , odnosno preciznije (*Zašto?*) podeonom konstantom K_{av} :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

$$V_t - V_0$$

Molekuli proteina koji se dovoljno razlikuju po veličini, a istog su oblika, imaće različite elucione zapremine V_e , pri čemu će redosled eluiranja biti obrnuto srazmeran njihovim molekulskim masama (Slika 4.5).



Slika 4.5. Idealno razdvajanje gel-filtracijom pet proteina čije se molekulske mase međusobno razlikuju za faktor 2. Sa slike se vidi da se pikovi koji odgovaraju proteinima manje mase šire, pošto je difuzija manjih molekula veća.

Poznavajući elucione zapremine (V_e , odn. K_{av}) proteina poznatih molekulskih masa može se odrediti nepoznata molekulska masa proteina na osnovu njegove elucione zapremine.

Postoji veći broj materijala koji se koriste za gel-filtraciju. Najstariji i još uvek mnogo korišćeni materijal je Sephadex, koji se zasniva na umreženim dekstranima. Takođe se mnogo primenjuju i materijali koji se dobijaju polimerizacijom akrilamida i bisakrilamida u različitim odnosima. Lista materijala koja se koristi za gel-filtraciju, kao i njihov opseg frakcionisanja za globularne proteine dat je u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Materijali koji se koriste za gel-filtraciju

Proizvođač	Oznaka gela	Tip gela	Opseg molekulskih masa globularnih proteina (Da)
Bio-Rad Biogels	P-2	Polyacrylamide	100 - 1800
	P-4	Polyacrylamide	800 - 4000
	P-6	Polyacrylamide	1000 - 6000
	P-10	Polyacrylamide	1500 - 20000
	P-30	Polyacrylamide	2500 - 40000
	P-60	Polyacrylamide	3000 - 60.000
	P-100	Polyacrylamide	5000 - 100.000
	P-150	Polyacrylamide	15.000 - 150.000
	P-200	Polyacrylamide	30.000 - 200.000
	P-300	Polyacrylamide	60.000 - 400.000
Bio-Rad Biogels	A-0,5m	Agarose	1000 - 500.000
	A-1,5m	Agarose	2000 - 1.500.000
	A-5,0m	Agarose	4000 - 5.000.000
	A-15m	Agarose	60.000 - 15.000.000
	A-50m	Agarose	200.000 - 50.000.000
	A-150m	Agarose	1.000.000 - 150.000.000

Tabela 4.1 (nastavak...)

Proizvođač	Oznaka gela	Tip gela	Opseg molekulskih masa globularnih proteina (Da)
LKB Ultragels	AcA22	Agarose/polyacrylamide	60.000 - 1.000.000
	AcA34	Agarose/polyacrylamide	20.000 - 400.000

	AcA44	Agarose/polyacrylamide	12.000 - 130.000
	AcA54	Agarose/polyacrylamide	6000 - 70.000
LKB Agaroses	A2	Agarose	120.000 - 20.000.000
	A4	Agarose	55.000 - 9.000.000
	A6	Agarose	25.000 - 2.400.000
Pharmacia Sephadex	G-10	Dextran	50 - 700
	G-15	Dextran	50 - 1500
	G-25	Dextran	1000 - 5000
	G-50	Dextran	1500 - 30.000
	G-75	Dextran	3000 - 70.000
	G-100	Dextran	4000 - 150.000
	G-150	Dextran	5000 - 300.000
	G-200	Dextran	5000 - 600.000
Pharmacia Sepharoses	6B	Agarose	10.000 - 4.000.000
	4B	Agarose	60.000 - 20.000.000
	2B	Agarose	70.000 - 40.000.000

4.3 Jonoizmenjivačka hromatografija

Jonoizmenjivači su čvrsti nerastvorni nosači (celuloza, Sephadex i dr.), za koji su kovalentno vezane naelektrisane grupe, koje mogu da izmenjuju katjone i anjone (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Funkcionalne grupe koje se koriste u jonoizmenjivačima:

Anjonski jonoizmenjivač:

Aminoetil (AE-)
Dietilaminoetil (DEAE-)
Kvartenarni aminoetil (QAE-)

funkcionalna grupa:

$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$
 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$

Katjonski jonoizmenjivač:

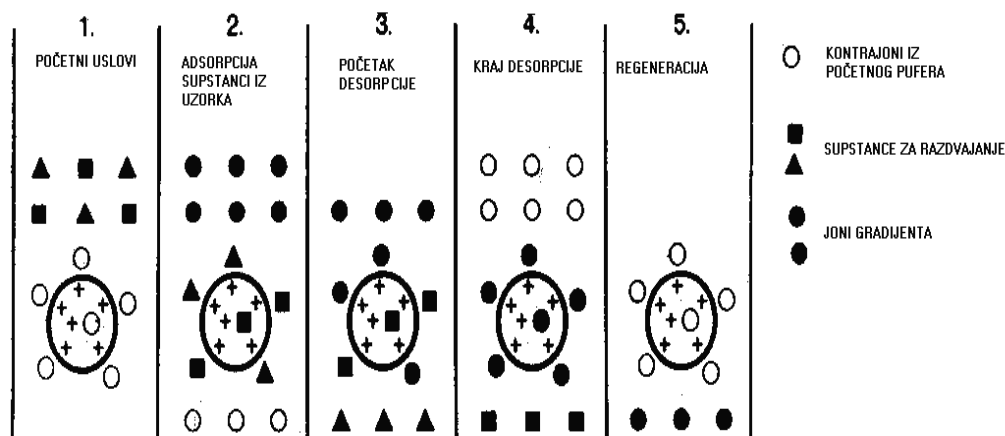
Karboksimetil (CM-)
Fosfo
Sulfopropil

funkcionalna grupa:

$-\text{OCH}_2\text{COO}^-$
 $-\text{PO}_4\text{H}_2^-$
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

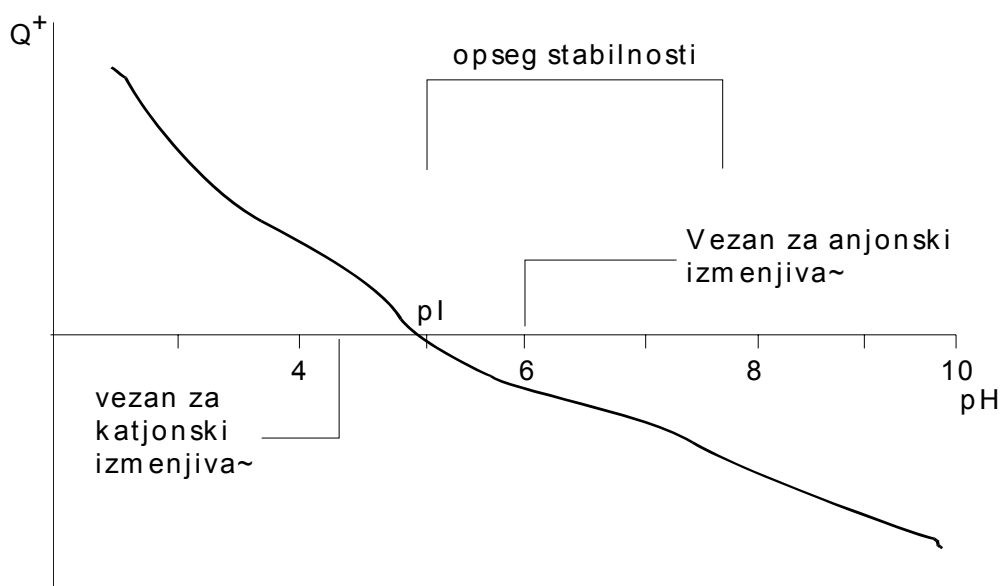
Razdvajanje proteina na jonoizmenjivačkoj koloni prikazano je na slici 6.6.

Na kolonu jonoizmenjivača, koja je ekvilibrisana puferom odgovarajućeg pH i jonske sile, nanese se rastvor smeše proteina koji želimo da hromatografišemo. Proteini koji se ne vezuju za kolonu, pod datim uslovima, eluiraju se sa početnim puferom, dok se proteini koji se zadržavaju na koloni potom eluiraju sa većom zapreminom istog pufera, ili sa puferom čija se jonska sila postepeno povećava (gradijent).



Slika 4-6 - Princip razdvajanja proteina na jonoizmenjivačkoj koloni

Eluiranje proteina koji su se vezali za kolonu može se postići i promenom pH pufera (kontinualnom ili diskontinualnom). Kako svaki protein može da ima pozitivno i negativno naelektrisanje, u zavisnosti od svoje izoelektrične tačke i pH pufera (Slika 4.7), za razdvajanje proteina mogu se koristiti i katjonski i anjonski jonoizmenjivači.



Slika 4-7 - Naelektrisanje proteina u zavisnosti od pH: opseg u kojem je protein vezan za katjonski, odnosno anjonski jonoizmenjivač i opseg u kojem je hipotetični protein stabilan

Zadatak: Određivanje molekulske mase humanog hemoglobina primenom gel filtracije

ZADATAK: U ovoj vežbi ćete napakovati i ekvilibrisati kolonu Sephadex-a G-100 i potom je kalibrisati i pri tom koristiti za određivanje molekulske mase humanog hemoglobina. Studenti koji su postigli dobar uspeh na dosadašnjim vežbama mogu, ukoliko žele da

pripreme i polimerizovani hemoglobin reakcijom sa glutaraldehydom te da odrede molekulske mase dobijenih agregata.

Postupak za pakovanje i kalibraciju Sephadex G-100 kolone

Materijal:

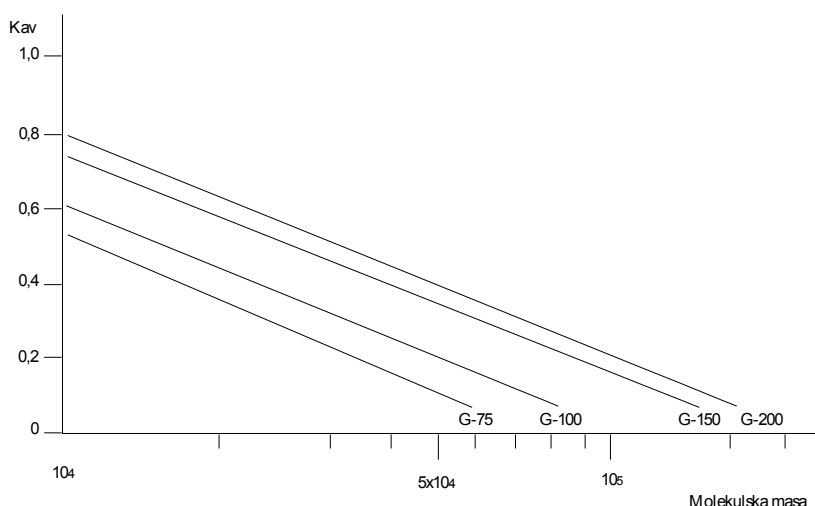
Staklene kolone dimenzija oko 1 x 50 cm,
 Sephadex G-100 u 0,05 M fosfatnom puferu pH oko 7,
 Rastvor plavog dextrana i rastvor kalijumdihromata (10 mg/mL),
 Rastvor humanog hemoglobina
 Frakcioni kolektor,
 VIS Spektrofotometar.

Postupak:

Suspenziju Sephadex-a G-100 u puferu pažljivo dezaerirajte, a zatim napakujte i ekvilibrišite kolone (operaciju će Vam pokazati asistent ili tehnički saradnik). Gornji sloj pufera sa kolone pomoću pipete odstranite, a zatim nanosite pažljivo po 0,1 - 0,2 mL rastvora plavog dextrana, hemoglobina i kalijumdihromata, pazeći da je pre nanošenja sledećeg rastvora prethodni ušao u sloj gela. Posle nanošenja rastvora dihromata nanosite 0,2 - 0,5 mL pufera, a kada je i on ušao u sloj gela napunite kolonu do vrha puferom (pažljivo da se sloj gela ne poremeti (*zašto je ovo važno?*)) i spojite kolonu sa bocom u kojoj se nalazi pufer za eluiranje kolone.

Čim ste počeli eluiranje kolone počnite i sa sakupljanjem eluata sa kolone u frakcijama od po 2 mL. Za ovu operaciju možete koristiti i frakcioni kolektor. Protok podesite na oko 0,4 mL/min. Posmatrajte kolonu tokom hromatografije - šta zapažate? Kada je hromatografija završena, odredite u kojim epruvetama se nalaze elucioni maksimumi (ako je potrebno pomognite se spektrofotometrom!) i odredite elucione zapremine svake od nanetih supstanci (*kako ćete to da uradite?*).

Nacrtajte hromatogram na kojem ćete prikazati zavisnost stepena eluiranja od broja frakcije, odn. elucione zapremine. Iz dobijenih elucionih zapremina izračunajte K_{av} i pomoću kalibracione prave prikazane na slici 3.11 odredite molekulsku masu Hb. Uporedite dobijenu vrednost sa literaturnom (64 000 Da) i ukoliko se vrednosti razlikuju ponudite objašnjenje.



Slika 4-11 Kalibraciona prava za Sephadex

Zadatak: Određivanje frakcije glikozilovanog hemoglobina primenom jonoizmenjivačke hromatografije

ZADATAK: U okviru ove vežbe ćete ekvilibrisati dobijene kolone napunjene Bio-Rex jonoizmenjivačem i potom ih koristiti za određivanje frakcije glikozilovanog hemoglobina (HbA1 ili HbA1c) u uzorcima sopstvene krvi ili krvi kolega. Dobijene rezultate ćete (u dogovoru sa asistentom) na odgovarajući način obraditi/komentarirati. **Studenti koji su pokazali dobar uspeh na prethodnim vežbama mogu, ukoliko žele, da predlože (u dogovoru sa asistentom) projekat (na primer da bliže ispituju reakciju hemoglobina sa glukozom!) te da rezultate zajednički prezentiraju.**

Hemoglobin u eritrocitima podleže u maloj meri hemijskim reakcijama sa glukozom i njenim metabolitima iz glikolize (glukozo-6-fosfatom i fruktozo-1,6-difosfatom). Ovako modifikovani hemoglobin može da se odvoji od preostalog hemoglobina jonoizmenjivačkom hromatografijom, u obliku tzv. HbA₁ frakcije. Ova frakcija kod zdravih osoba iznosi oko 7 % ukupnog Hb. Koncentracija HbA₁ frakcije proporcionalna je koncentraciji glukoze u krvi, tako da kod ljudi obolelih od šećerne bolesti (dijabetesa) može da bude povišena. Određivanje HbA₁ frakcije nalazi veliku primenu u dijagnostici i praćenju terapije kod pacijenata obolelih od ove bolesti.

Glukoza reaguje sa N-terminalnim amino grupama β -nizova molekula hemoglobina, pri čemu nastaje aldimin (Šifova baza), koji Amadori premeštanjem prelazi u stabilni ketoaminski derivat. N-terminalne grupe u β -nizu molekula Hb imaju nižu pK_a vrednost od ϵ -amino grupe lizina, čime se objašnjava njihova veća reaktivnost. Modifikacija krajnjih amino grupa još više snižava njihove pK_a vrednosti, tako da HbA₁ frakcija može da se odvoji od preostalog Hb (na čemu se zasniva odvajanje Hb modifikovanog reakcijom sa šećernim fosfatima?). Utvrđeno je da i ϵ -amino grupe lizina u molekulu Hb reaguju sa glukozom, ali da ova reakcija ne utiče na naelektrisanje molekula Hb.

Razdvajanje (i određivanje) HbA₁ frakcije od ukupnog Hb (HbA) vrši se najčešće na slabom katjonskom jonoizmenjivaču (koji sadrži COOH grupu) kao što je Bio-Rex.

Postupak za razdvajanje i određivanje HbA₁ frakcije

Hromatografija rastvora hemoglobina se radi na 0,6 x 5,5 cm koloni, napunjenoj jonoizmenjivačem Bio-Rex 70, koji je prethodno ekvilibrisan sa 41 mM kalijumfosfatnim puferom pH 6,83 $\pm$ 0,02. Kolona se pažljivo ekvilibriše istim puferom (dok se ne postigne da je pH na ulazu i izlazu kolone istovetno), a potom se na kolonu nanese 50 μ L rastvora hemoglobina razblaženog puferom (tako da je koncentracija uzorka koji se nanosi 5 puta razblažena u odnosu na početnu krv). Alternativno u ovoj vežbi možete koristiti (u dogovoru sa asistentom) uzorak sopstvene

krvi (iz prsta) koji ćete preneti u odgovarajući rastvor detergenta i potom alikvot naneti direktno na kolonu. Kada je uzorak ušao u kolonu, nanese se pažljivo 0,2 mL pufera, da bi se sprali eventualno zaostali tragovi uzorka sa kolone, a potom se kolona prenese nad čistu epruvetu i HbA₁ frakcija eluira sa 4 mL pufera. Kada je HbA₁ frakcija eluirana, Hb zaostao na koloni se eluira sa 4 mL 1,5 M KCl i ovaj eluat razblaži 4 puta destilovanom vodom. U oba rastvora izmeri se apsorbancu na 415 nm (apsorpcioni maksimum za hemoglobin), na osnovu čega se izračuna % HbA₁ frakcije.

SDS elektroforeza

Cilj ove vežbe je da se upoznate sa principima i primenom SDS elektroforeze

PRIPREMA VEŽBE: Ponovite ukoliko je potrebno o elektrolitičkim osobinama proteina sa prethodnih vežbi. Proučite odeljak o principima elektroforetskih tehnika i uradite priložene zadatke. Proučite eksperimentalne aspekte PAGE i SDS PAGE. Upoznajte se u najkraćim crtama sa proteinima plazme i membrane eritrocita. Rezimirajte ukratko o čemu se radi u vežbama koje ćete raditi. Pripremite pitanja za teorijske vežbe.

UVOD

U biohemijskoj praksi je često potrebno da dobijemo predstavu o prisustvu svih proteina u nekom biološkom sistemu (uzorku) ili da nađemo da li je (ili ne) neki protein prisutan u datom biološkom sistemu (uzorku). Posle izolovanja potrebno je odrediti čistoću (homogenost) izolovanog proteina. Sve ovo se jednostavno i pouzdano postiže elektroforetskim tehnikama i metodama. Elektroforetski se prati i proces izolovanja i prečišćavanja proteina, od početne do krajnje faze. Princip elektroforeze proteina je jednostavan, mada savremene elektroforetske tehnike i metode, koje omogućuju visoko razlaganje kompleksnih smeša proteina primenom male količine uzorka, mogu biti i vrlo sofisticirane. U okviru odeljaka koji slede upoznaćete principe elektroforetskih tehnika, a potom će biti ukratko dat osvrt na eksperimentalne aspekte osnovnih elektroforetskih tehnika i metoda: gel elektroforeze (**p**oli**a**krilamidna **g**el **e**lektroforeza - PAGE) i SDS gel elektroforeze.

4.4 Elektroforeza

Pod elektroforezom se podrazumeva transport naelektrisanih čestica u električnom polju. Elektroforeza predstavlja vrlo efikasno sredstvo za analizu i preparativno razdvajanje malih naelektrisanih molekula i biopolimera: proteina i nukleinskih kiselina. U početku se elektroforeza izvodila u rastvoru određenog pH i gustine (koja se postizala dodatkom saharoze ili glicerola). Tek uvođenjem čvrstih nosača (hartija, celulozne trake) i raznih vrsta gelova (skrob, poliakrilamid) omogućena je široka i raznovrsna primena elektroforeze.

Ako se molekul sa šaržom q nađe u električnom polju na njega će delovati sila F koja će zavisiti od šarže molekula (q) i jačine polja (E/d) (gde je E = razlika potencijala između elektroda, a d = rastojanje između elektroda):

$$F = E/d \cdot q$$

U suprotnom smeru će delovati sila trenja sa molekulima rastvarača, koja će zavisiti od prirode rastvarača i veličine molekula. Ako je molekul (približno) sferan, po Stokes-ovom zakonu biće:

$$F = 6\eta r\pi v$$

gde je F = sila trenja; r = poluprečnik molekula; η = koeficijent trenja; v = brzina kretanja molekula. Ako se u jednom momentu te sile izjednače, biće:

$$E/d \cdot q = 6\eta r\pi v \quad \text{ili} \quad v = Eq/6d\eta r\pi$$

Ponašanje molekula u elektroforezi izražava se preko tzv. *pokretljivosti (mobilnosti)* koja se definiše kao odnos između brzine kretanja molekula i jačine električnog polja:

$$\text{Mobilnost} = \frac{v}{E/d} \quad \text{i ima dimenzije } \text{cm}^2 \text{Vs}^{-1}$$

Ako se ovaj izraz kombinuje sa izrazom za brzinu kretanja molekula, dobija se:

$$\text{Mobilnost} = \frac{q}{6\eta r\pi}$$

Pošto je trenje proporcionalno veličini molekula može se uzeti da je proporcionalno i njegovoj molekulskoj masi (M_m), a pošto šarža molekula zavisi od pH biće:

$$\text{Mobilnost} = k \cdot (pH - pI) / M_r$$

gde je k = konstanta proporcionalnosti, koja pored gore pomenutih, obuhvata i sve druge faktore koji utiču na mobilnost. Pozitivna vrednost gornjeg izraza znači da će se molekuli kretati ka pozitivnom polu, a negativna da će se kretati ka negativnom polu. Kada je $pH = pI$ molekuli se neće kretati u električnom polju. Stoga pomoću elektroforeze može da se eksperimentalno odredi pI peptida i proteina. U ovom vrlo pojednostavljenom opisu procesa koji se dešavaju pri elektroforezi mnogi faktori koji utiču na brzinu kretanja molekula nisu uzeti u obzir. Tako, na primer, na brzinu utiče "atmosfera" jona suprotnog znaka koja se formira oko naelektrisanog makromolekula i koja raste s porastom jonske sile pufera, utiče i samo kretanje makromolekula, njihov oblik, distribucija šarže na molekulu, kao i interakcije makromolekula sa nosačem. Svi ovi faktori i ne mogu da se kvantitativno izraze tako da elektroforeza ostaje vrlo moćno sredstvo za eksperimentalni rad, ali ne i za teorijske studije.

Primer:

Koje su pokretljivosti Gly, Leu, Asp i Lys pri elektroforezi na pH 4.7.

Aminokiselina	Mm	pI	Pokretljivost (pH-pI)/Mm na pH=4,7
Lys	146,2	9,74	-0,0345
Gly	75,1	5,97	-0,0169
Leu	131,2	5,98	-0,0098
Asp	133,1	2,38	+0,0129

Na pH 4,7 Lys će se najbrže kretati prema negativnom polu, a pratiće ga Gly i Leu. Asp će se kretati ka pozitivnom polu.

ZADACI I PROBLEMI

1. (a) Izvršena je elektroforeza na pH 3,9 sledeće smeše aminokiselina: Ala, Ser, Phe, Leu, Arg, Asp, i His. Koja će se aminokiselina kretati ka anodi (+), a koja ka katodi (-) ?

(b) Aminokiseline sa identičnom šaržom (Gly i Leu) se ipak razdvajaju pri elektroforezi. Objasnite ovu pojavu.

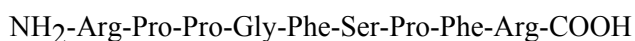
(c) Kakva će se slika dobiti posle razdvajanja elektroforezom na pH 6,0 i bojenja sa ninhidrinom sledeće smeše aminokiselina: Ala, Val, Glu, Lys, i Thr.

2. Kako će se pri elektroforezi na pH 3,0 kretati peptidi: Phe-Ile, Lys-Lys, Arg-Asp?

3. Kakve će biti relativne mobilnosti dole navedenih aminokiselina pri hromatografiji na hartiji u rastvaraču butanol-AcOH-H₂O (uzeti da je u vodenoj fazi pH = 4,5): (a) Ile, Lys; (b) Phe, Ser; (c) Ala, Val, Leu; (d) Pro, Val; (e) Glu, Asp; (f) Tyr, Ala, Ser, His?

42. Koja se od sledećih smeša peptida i aminokiselina može razdvojiti pri uslovima iz prethodnog zadatka: (a) Lys-Lys i Lys; (b) Leu-Leu-Leu i Leu; (c) Trp-Ile-Phe i Arg-Ile-Phe; (d) Cys-Cys-Ser i Ala-Ala-Ser?

4. Pri izučavanju odnosa strukture i aktivnosti peptida bradikinina:



koji ima vasodilatatorsko dejstvo, pronađen je još jedan peptid, kalidin:



koji ispoljava sličnu aktivnost. U čemu će se razlikovati ponašanje ovih peptida pri elektroforezi i pri jonoizmenjivačkoj hromatografiji na Dowex-u?

5. β -melanocit-stimulativni hormon (MSH) govečeta i svinje ima sledeće aminokiselinske sekvence:

Goveče: Asp-Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp

Svinja: Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp

Sumnjate da ste od proizvođača dobili proizvod koji je smeša ova dva peptida. Kako biste ih pomoću elektroforeze razdvojili? Dati obrazloženje za uslove rada koje ste izabrali. Kakve rezultate očekujete?

6. pI proteina može da se izračuna na osnovu poznavanja zavisnosti njihove mobilnosti u električnom polju od pH. Polazeći od podataka u tabeli odredite pI za β -laktoglobulin na $\frac{1}{2}\Gamma = 0,01$ i $\frac{1}{2}\Gamma = 0,03$:

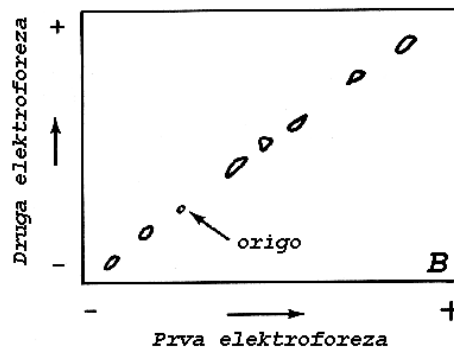
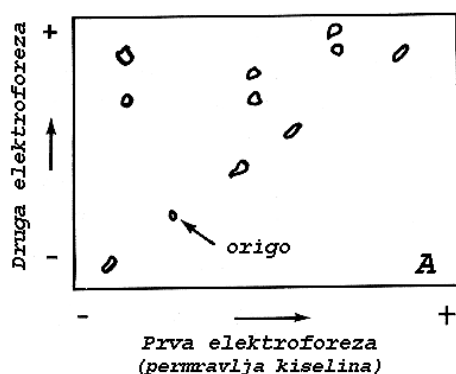
$$\frac{1}{2}\Gamma = 0,01$$

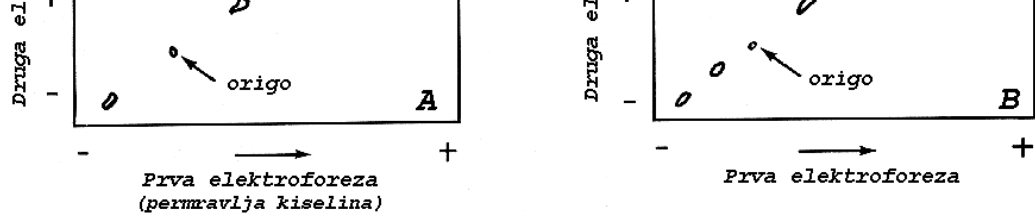
$$\frac{1}{2}\Gamma = 0,03$$

pH	Mobilnost	pH	Mobilnost
4,13	1,71	4,15	0,93
4,98	0,30	4,62	0,52
4,98	0,01	4,95	0,17
5,58	-1,10	5,52	-0,59
5,84	-1,02	5,79	-0,85
5,94	-1,33	7,09	-1,75

Mobilnost je data u $\mu\text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{cm}$.

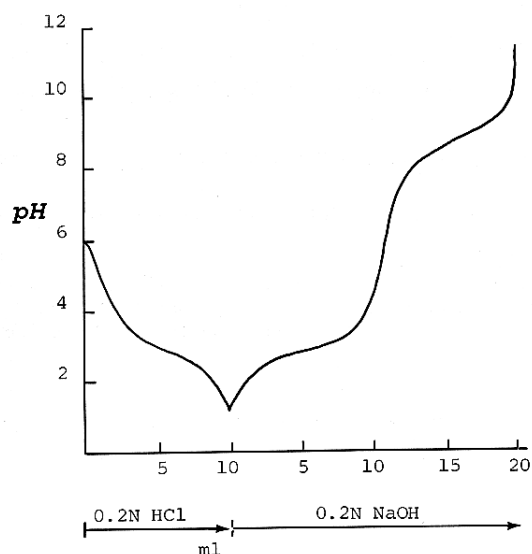
7. Iz urina pacijenta izolovan je Bence-Jones-ov protein. Posle digestije sa tripsinom dobijena smeša peptida podvrgnuta je dvodimenzionalnoj elektroforezi na hartiji na pH 6,5. Dobijeni rezultat je prikazan na slici B. Drugi eksperiment je rađen pod istim uslovima, ali je posle prve elektroforeze elektroforegram izložen permravljnoj kiselini. Dobijeni rezultat je prikazan na slici A.





Šta se može zaključiti iz ovih rezultata? (Za bliže informacije o dijagonalnoj elektroforezi konsultovati savremene udžbenike iz biohemije).

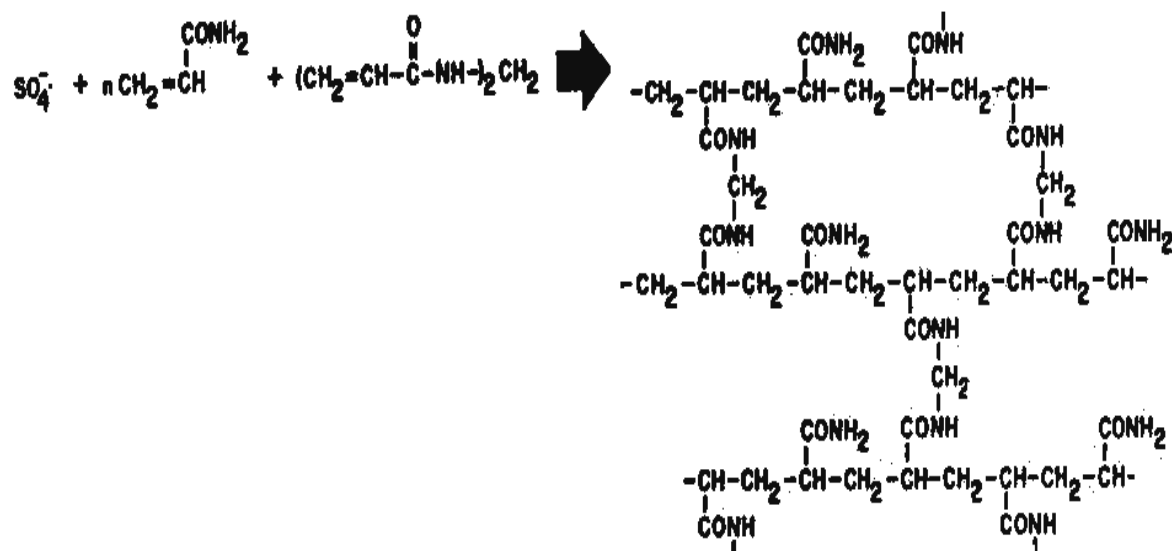
8. U hromatogramu aminokiselina iz urina nekog pacijenta pojavila se mrlja koja nije odgovarala ni jednoj poznatoj aminokiselini. Nepoznata supstanca je izolovana i dalje analizirana. Posle hidrolize ove supstance sa HCl identifikovan je His i jedna neutralna aminokiselina. Titracijom 178 mg ove aminokiseline dobijena je sledeća titraciona kriva:



Posle tretiranja sa fluor-dinitrobenzolom i kisele hidrolize ova supstanca je dala dva DNP-derivata: imidazol-DNP-His i drugi koji nije odgovarao ni jednoj uobičajenoj aminokiselini. Koja je verovatna struktura izolovane supstance?

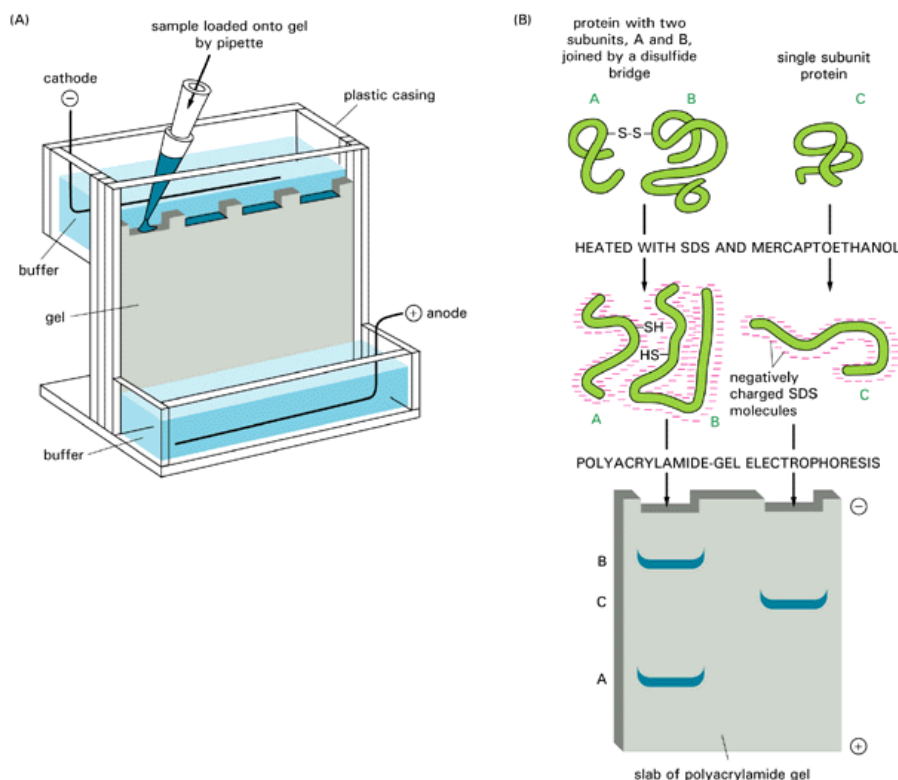
4.5 Gel elektroforeza (PAGE)

Elektroforeza proteina se radi u gelu, koji se nalazi između dve staklene ploče, koji se priprema polimerizacijom akrilamida i N,N-metilen-(bis)akrilamida:



Stepen umreženja gela zavisi od količine dodatog N,N-metilen-(bis)akrilamida. Za proteine čije su molekulske mase milion i veće koriste se manje umreženi gelovi (3 - 4 %), dok se za većinu proteina koristi akrilamidni gel 7 - 10 % umreženja. Za analizu je dovoljno 5 - 25 μg proteina. Šema aparature za elektroforezu data je na slici 4.12, a slika aparature na kojoj ćete raditi data je na slici 4.18.

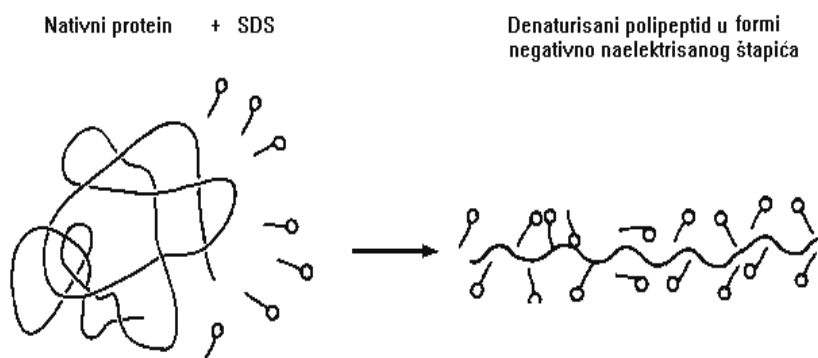
Ova elektroforeza se obično radi u puferu alkalnog pH, jer je pri tim uslovima većina proteina negativno naelektrisana, te se kreću od katode ka anodi. Posle završene elektroforeze, kada negativno naelektrisana boja - "tracking dye" dođe do kraja gela, gelovi se izvade, razdvojeni proteini "fiksiraju", obično taloženjem pomoću trihlor-sirćetne kiseline, a potom boje. Višak boje se ispere, a trake razdvojenih proteina vide se na osnovu boje koja se na njima adsorbovala (Slika 4.12).



Slika 4-12 - Skica aparature za elektroforezu i primer elektroforegrama (SDS-PAGE)

7.4 SDS elektroforeza

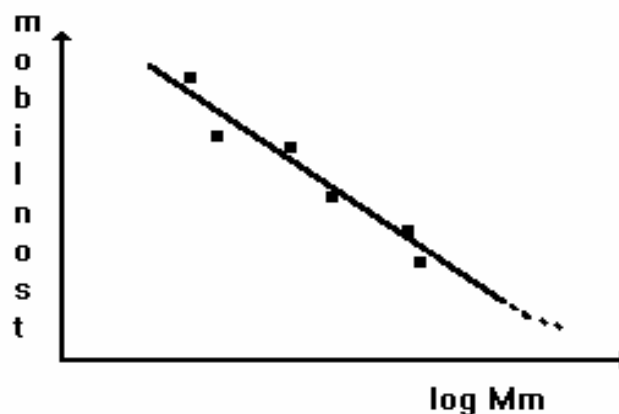
SDS elektroforeza se koristi za razdvajanje proteina koji su nerastvorni u puferima koji se koriste za elektroforezu (npr. membranski proteini), kao i za određivanje molekulskih masa proteina. Jedina razlika, u odnosu na napred opisani postupak za PAGE, je dodatak (nekoliko %) SDS-a ("sodium dodecilsulfat"), koji se vrlo čvrsto vezuje za molekule proteina, denaturišući ih pri tome (Slika 4.13).



Slika 4-13 - Denaturacija proteina u prisustvu SDS-a

Utvrđeno je da se 1 molekul SDS-a vezuje prosečno na 2 aminokiselinska ostatka u molekulu proteina. Uzimajući da je prosečna masa aminokiselinskog ostatka 110 Da proizilazi da će protein čija je molekulska masa 40 000 Da vezati 180 molekula SDS-a. "Kompleksi" molekula proteina i SDS-a su negativno naelektrisani, sa istim odnosom naelektrisanje/masa molekula. Stoga će se proteini pri SDS elektroforezi razdvajati samo na osnovu veličine

(mase) molekula. Između pokretljivosti molekula proteina u SDS-elektroforezi i logaritma njihovih molekulskih masa postoji linearan odnos (Slika 4.14).



Slika 4.14 - Dijagram pokretljivosti proteina u SDS elektroforezi u zavisnosti od njihove molekulske mase

ZADATAK:** U okviru ove vežbe ćete prvo u uzorku(cima) krvi odvojiti eritrocite od plazme, izvršiti njihovu hemolizu i odvojiti membrane. U sledećem koraku ćete uraditi SDS elektroforezu membranskih proteina i proteina plazme te poređenjem sa elektroforegramima iz literature datim na slikama 4.15 i 4.17 identifikovati proteine u vašim uzorcima. Koristićete, kao što je na početku Uputstava za vežbe naglašeno, humanu krv, ili krv životinja. **Obratite pažnju na predostrožnosti u radu sa uzorcima krvi. Ukoliko ste na dosadašnjim vežbama pripremili još neke preparate proteina možete sada proveriti njihovu homogenost.

Osvrt na proteine plazme i membrane eritrocita

Krv je biološki materijal sa kojim se često srećemo, kako u istraživačkoj, tako i u rutinskoj, biohemijskoj praksi. Proteini krvne plazme, kao što su albumin i imunoglobulini spadaju u najviše izučavane i korišćene proteine u biomedicinskoj praksi. Hemoglobin, koji je (zajedno sa mioglobinom) prvi protein čija je trodimenzionalna struktura određena, jedan je od najviše, ako ne i najviše izučavani (bio)molekul. Membrana eritrocita je model za izučavanje plazmine membrane. U odeljku koji sledi daćemo prvo kratak osvrt na proteine plazme i membrane eritrocita.

Proteini plazme

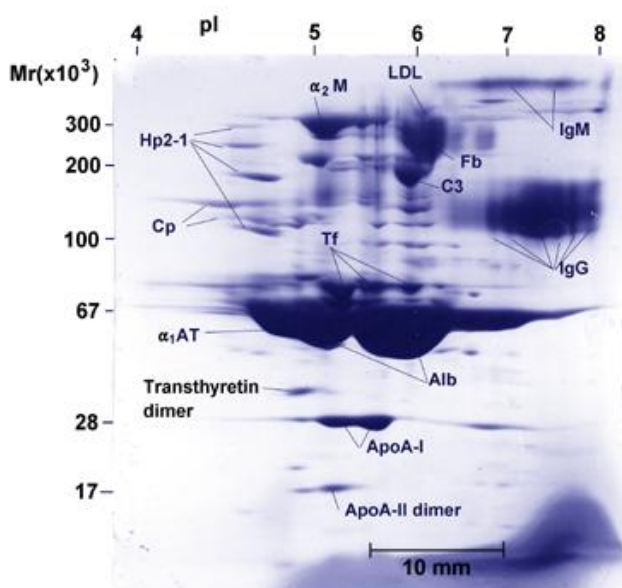
Plazma predstavlja 46-63% zapremine pune krvi, sa vodom koja čini oko 92% zapremine plazme. Plazma sadrži značajnu količinu rastvorenih proteina (prosečno 7.6 g na 100 ml plazme). Više od 100 različitih proteina se smatra tipičnim (karakterističnim) za plazmu. Pored ovih u plazmi se nalazi i niz drugih proteina i peptida, kao što su na primer hormoni koji potiču iz endokrinih žlezda. Raznolikost proteina prisutnih u plazmi ilustruje slika 4.15 na kojoj je prikazana 2-D elektroforeza proteina iz uzorka normalne plazme. Najzastupljeniji proteini plazme su *albumin(i)*, *globulini* i *fibrinogen*.

Albumin predstavlja 60% od ukupnih proteina plazme. Kao najzastupljeniji protein u plazmi albumin najviše doprinosi održavanju osmotskog pritiska plazme. Albumin je važan za

transport u vodi nerastvornih supstanci kao što su masne kiseline, steroidni i tiroidni hormona, kao i za transport metalnih jona. Za albumin je karakteristično da interaguje sa nizom supstanci, uključujući i mnoge lekove (razni ligandi se vezuju za različite domene!).

Globulini predstavljaju oko 35% proteina plazme. Primeri važnih imunoglobulina su *imunoglobulini* i *transportni globulini*. *Imunoglobulini*, koji se nazivaju i antitela interaguju sa stranim telima (proteini, patogeni) i stoga imaju važnu ulogu u odbrambenom sistemu. *Transportni globulini* transportuju jone, hormone i druge supstance koje bi inače bile izlučene preko bubrega ili koje nisu rastvorne u vodi. Ovde spadaju: *globulin koji vezuje tiroidne i steroidne hormone*, *transferin* koji transportuje gvožđe (Fe^{2+}), *apolipoproteini* koji transportuju trigliceride i druge lipide u krvi. Kada vežu lipide *apolipoproteini* postaju *lipoproteini*.

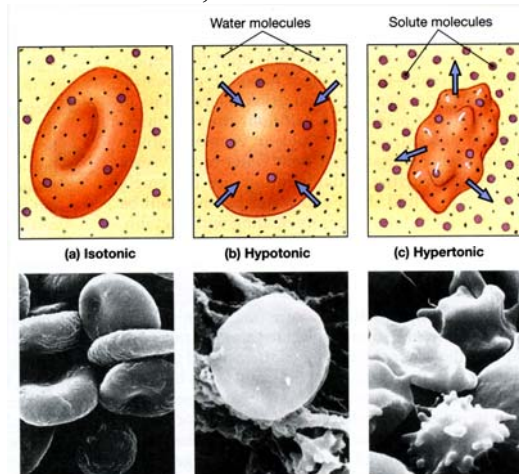
Fibrinogen predstavlja oko 4% od ukupnih proteina plazme. Pod određenim uslovima molekuli fibrinogena interaguju gradeći velike, nerasvorne lance *fibrina*. Ova vlakna predstavljaju osnovu za *zgrušavanje (koagulaciju)* krvi. *Ako se pri uzimanju krvi (Slika 3.1) ne doda antikoagulans doći će do nastajanja fibrina u plazmi što će izazvati koagulaciju. Centrifugovanjem ovakvog uzorka dobiće se talog koji će sadržati eritrocite sa fibrinom i drugim sastojcima i supernatant koji se naziva serum.* U biohemijskoj praksi se uvek naglašava da li se radi analiza u *serumu (S)* ili u *plazmi (P)*.



Slika 4-15 - 2-D elektroforeza proteina plazme (razdvajanje proteina izofokusiranjem po pI vrednostima u jednoj, a potom po molekulskim masama SDS elektroforezom u drugoj dimenziji).

Membranski proteini eritrocita

Ukoliko se izolovani eritrociti prenesu iz *izotonog* (*iso*, isti + *tonos*, pritisak, misli se na osmotski pritisak) u *hipotoni* rastvor, voda će ulaziti u ćeliju koja će bubriti „kao balon“ (Slika 4.16). Na kraju će ćelijska membrana popucati i oslobodiće se sadržaj ćelije u rastvor. Ovaj proces se naziva *hemoliza* (*hemo-*, krv + *liza*, rastvaranje). Ćelija stavljena u *hipertoni* rastvor će ispuštati vodu u okolinu, smežuraće se i dehidrirati (Slika 4.16).



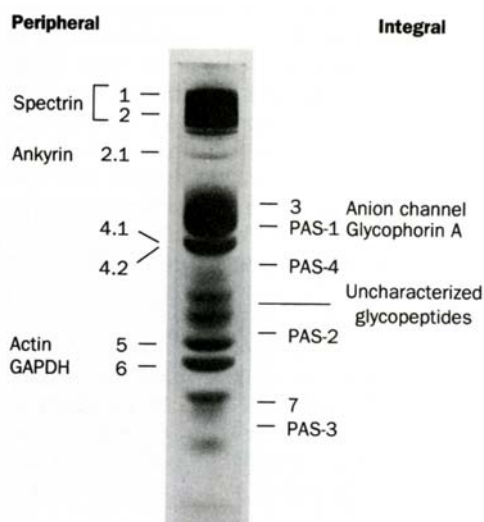
Slika 4-16 - Efekat osmotskog pritiska na eritrocite

Hemolizat eritrocita će sadržavati delove plazmine membrane i sadržaj citosola, čija je glavna komponenta kao što smo videli hemoglobin. Centrifugovanjem hemolizata istaložiće se membrane, koje kada se isperu izgledaju prozračno beličaste („ghost“ – duhovi), a u supernatantu zaostaju rastvorni proteini, od kojih više od 95% otpada na hemoglobin.

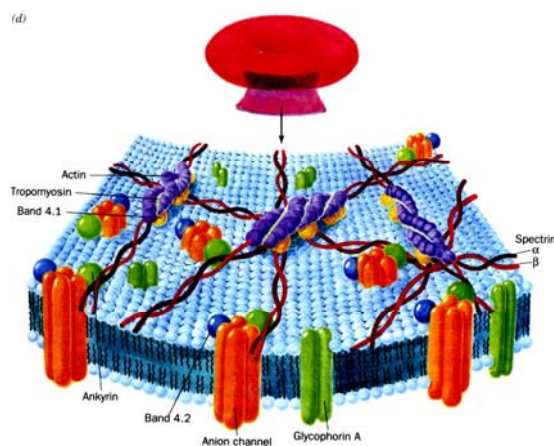
Zbog svoje relativne jednostavnosti, dostupnosti i lakoće sa kojom se izoluje membrana eritrocita je najviše ispitivana i najbolje upoznata biološka membrana. Stoga je membrana eritrocita model za kompleksnije membrane drugih ćelija. Membrana eritrocita ima sličan sastav kao i druge membrane: polovina proteini, nešto manje lipidi i ostatak ugljeni hidrati. Membranski proteini se mogu razdvojiti *SDS elektroforezom* (Slika 4.17a). Na dobijenem elektroforegramu obojenom „Coomassie brilliant blue“ (CBB) bojom vidi se nekoliko većih i veći broj manjih traka. Ukoliko se bojenje izvrši reagensom za ugljene hidrate („periodic acid-Schiff reagent“ PAS) mogu se uočiti četiri takozvane PAS-trake (Slika 4.17a). Polipeptidi koji odgovaraju trakama 1, 2, 4.1, 4.2, 5 i 6 lako se izoluju iz membrana promenom pH i jonske sile što ukazuje da su ovi proteini periferni. Ovi proteini su locirani sa unutrašnje strane membrane eritrocita (Slika 4.17b). Nasuprot njima, traka 3, 7 i sva 4 PAS proteina su integralni proteini koji se mogu ekstrahovati iz membrane samo primenom detergenata i organskih rastvarača. Transport CO_2 zahteva da je membrana eritrocita propustljiva za HCO_3^- i Cl^- (da bi se očuvao elektrolitički balans ulazak jednog HCO_3^- jona zahteva izlazak jednog Cl^- jona!). Traka 3 (*anjonski kanal*) omogućuje transport HCO_3^- i Cl^- . Specifičan bikonkavni diskoidni oblik eritrocita, fluidnost, fleksibilnost, deformabilnost i elastičnost eritrocita, koji su kao što smo videli izuzetno važni za funkciju eritrocita potiče od mreže proteina koja čini ćelijski citoskelet. Najzastupljeniji protein citoskeleta eritrocita je

spektrin koji se sastoji iz 2 polipeptidna niza (traka 1 i 2 na elektroforegramu sa slike 7.6a i α i β nizovi sa slike 4.17b). Ova dva polipeptidna niza se uvijaju jedan oko drugog dajući $\alpha\beta$ heterodimere spektrina koji se dalje organizuju u heterotetramere. Ovi tetrameri se uzajamno povezuju pomoću trake 4.1 i trake 5 (za koju je pokazano da predstavlja protein *aktin*, čest sastavni deo citoskeleta i kod drugih ćelija). U umrežavanju spektrina učestvuje i tropomiozin, protein koji i u mišićima interaguje sa aktinom. Spektrin takođe interaguje sa proteinom *ankirinom* koji ga povezuje sa trakom 3 (Slika 4.17b).

a)



b)



Slika 4-17 – a) SDS-elektroforeza membranskih proteina; (b) šematski prikaz membrane eritrocita

Odvajanje plazme i izolovanje eritrocita iz krvi

Pridržavajte se Uputstava za rad sa humanim materijalom! Asistent ili tehnički saradnik će Vam pokazati kako se dole opisane operacije pravilno izvode.

Uzmite iz frižidera krv koja sadrži antikoagulans (3,8 % citrat), a potom je centrifugujte u laboratorijskoj centrifugi na 2 - 3000 o/min, tokom 5 - 10 minuta. Plazmu, koja se nalazi nad eritrocitima, prenesite pomoću Pasterove pipete u čistu epruvetu i koristite je u daljim eksperimentima gde je to predviđeno. *Plazmu koju niste upotreбили čuvajte duboko zamrznutu.* Staložene eritrocite isperite 2 - 3 puta sa po 2 zapremine ohlađenog 0,9 % NaCl (ne zaboravite da smešu promešate pomoću staklenog štapića ili blago među dlanovima). Eritrocite odvojite centrifugovanjem na 2 - 3000 obr/min., u laboratorijskoj centrifugi, a supernatante odbacite (koristeći Pasterovu pipetu). Ovako dobijene eritrocite koristićete za izolovanje membrana i dobijanje rastvora hemoglobina (hemolizata). *Obratite pažnju da sav materijal i korišćeno posuđe odložite u poseban sud, kako je to Pravilima predviđeno.*

Hemoliza eritrocita i izolovanje membrana

U jednu zapreminu eritrocita, pripremljenih na napred opisani način, dodajte 15 zapremina hladnog pufera za hemolizu (10 mM natrijum fosfatni ili 10 mM Tris·HCl pufer, pH 7,4). Uzorak ostavite na 4° C tokom 30 minuta. Nakon hemolize, membrane eritrocita staložite centrifugovanjem na 10 000 o/min tokom 15 minuta. Membrane isperite dva puta istim puferom i istaložite ih posle svakog ispiranja centrifugovanjem pod navedenim uslovima. Suspendujte membrane u maloj zapremini (0.1 – 0.5 ml) istog pufera i odmah koristite za dalji rad, ili ih čuvajte duboko zamrznute.

Postupak za SDS-gel elektroforezu (SDS-PAGE)

Prvo odredite koncentraciju proteina u vašim uzorcima (koristite u dogovoru sa asistentom neku od metoda za određivanje koncentracije proteina). Alikvot uzorka prenesite u pufer za rastvaranje uzorka (videti u odeljku Materijal) tako da koncentracija uzorka koji ćete nanositi na elektroforezi iznosi 1 mg/ml.

Potreban materijal:

Aparatura za vertikalnu elektroforezu (Slika 4.18)

Monomerni rastvor (30 % akrilamid, 2,7 % bisakrilamid) / *Pažnja: kancerogen !!!*

Pufer gela za razdvajanje (1,5 M TRIS pH 8,8),

Pufer gela za nadslojavanje (0,5 M TRIS pH 6,8),

Rastvor za iniciranje reakcije (10 % amonijum persulfat),

N,N,N',N' tetrametiletilendiamin (TEMED),

Rastvor SDS-a (10 % SDS),

Tank pufer (0,025 M TRIS, 0,192 M glicin, 0,1 % SDS, pH 8,3),

Pufer za rastvaranje uzorka (0,0625 M TRIS pH 6,8, 2 % SDS, 20 % glicerol, 10 % β -merkaptotanol, 0,03 % bromfenol plavo),

Rastvor za fiksiranje (40 % metanol, 10 % sirćetna kiselina),

Rastvor za bojenje (0,125 % Coomassie Blue R-250, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina),

Rastvor za obezbojavanje (7 % sirćetna kiselina).

Zapremine rastvora potrebnih za SDS-elektroforezu:

Rastvor	Gel za razdvajanje	Gel za nadslojavanje
Monomerni rastvor (1)	5 ml	0,66 ml
Pufer gela za razdvajanje (2)	3,75 ml	/
Pufer gela za nadslojavanje (3)	/	1,25 ml

10 % SDS (4)	0,15 ml	50 μ L
H ₂ O	6 ml	3,05 ml
Amonijumpersulfat (5)	75 μ L	25 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L
Ukupna zapremina	15 ml	5 ml

Priprema rastvora za SDS-PAGE:

(1) Monomerni rastvor:

Akrilamid 58,4 g
Bisakrilamid 1,6 g

Destilovana voda do 200 ml

Čuvati na 4° C u tamnoj boci.

(2) 4x pufer gela za razdvajanje (1,5 M Tris·HCl pH 8,8):

Tris 36,3 g

Podesiti na pH 8,8 pomoću 6 M HCl

Destilovana voda do 200 ml

(3) 4 x pufer gela za nadslojavanje (0,5 M Tris·HCl pH 6,8):

Tris 3,0 g

Podesiti na pH 6,8 pomoću 6 M HCl

Destilovana voda do 50 ml

(4) 10 % SDS:

SDS 10,0 g
Destilovana voda do 100 ml

(5) Inicijator (10 % amonijum-persulfat):

Amonijum-persulfat 0,5 g
Destilovana voda do 5 ml

(6) Tank Pufer (0,025 M Tris pH 8,3, 0,192 M Gly, 0,1 % SDS):

Tris 6,0 g
Glicin 28,8 g
SDS 20 ml rastvora (4)
Destilovana voda do 2 L

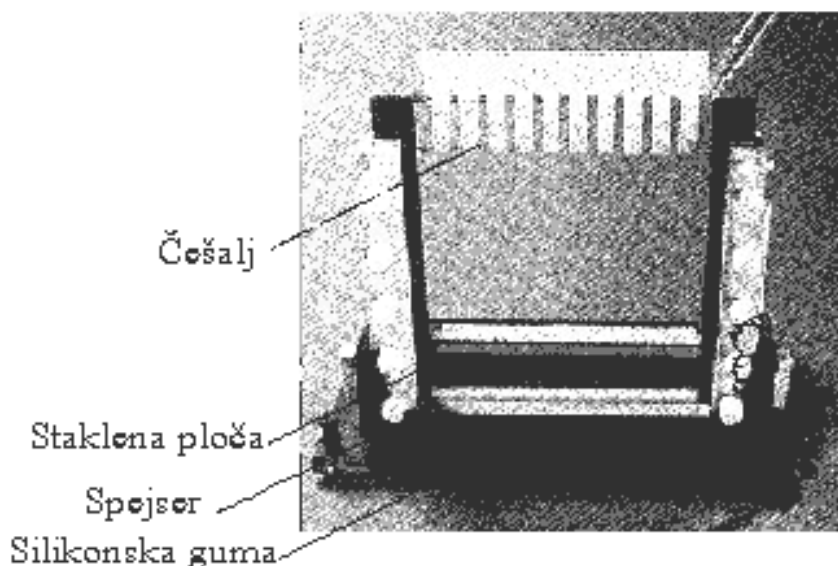
(7) 2x Pufer za uzorke (0,125 M Tris·HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 10 % 2-merkaptetanol):

Tris 2,5 ml rastvora (3)
SDS 4,0 ml rastvora (4)
Glicerol 2,0 ml

2-merkaptetanol	1,0 ml
Destilovana voda	do 10,0 ml

Podeliti u alikvote i zamrznuti.

Gel za razdvajanje ("running gel") se priprema u vakuum boci (100 ml) dodavanjem rastvora monomera, pufera gela za razdvajanje, vode i TEMED-a u količinama navedenim u tabeli. Boca sa rastvorom se zatvori gumenim zapašaćem (koji se okrene „naopačke“ da bi se brže uklonio ukoliko je to potrebno!) i rastvor dezaeriše 10 do 15 minuta na vodenoj vakuum pumpi uz povremeno mućkanje. Nakon dezaeracije dodaje se rastvor SDS-a i amonijumpersulfata. Rastvor se dobro promeša i odmah nalije u već pripremljeni sendvič staklenih ploča, razdvojenih 0,75 mm "spejserima" (Slika 3.4). Gel za razdvajanje se lagano nadsloji rastvorom n-butanola zasićenog vodom. Dok traje reakcija polimerizacije (30 - 60 minuta) može da se počne sa pripremom gela za nadslojavanje. Ovo se radi na istovetan način kao kod gela za razdvajanje (Tabela).



Slika 4-18 - Aparatura za vertikalnu elektroforezu.

Vežba 5 Ponašanje proteina: Denaturacija/renaturacija proteina Protein-ligand interakcije

Cilj vežbi koje slede, a koje su uzajamno povezane, je da se bliže upoznate (a) sa reversibilnom i ireversibilnom denaturacijom (razvijanjem/uvijanjem) proteina i (b) sa interakcijama proteina i liganada.

PRIPREMA VEŽBE: Ponovite ukoliko je potrebno osnovne pojmove iz termodinamike (konstanta ravnoteže, ΔG , ΔH , ΔS , odnos konstante ravnoteže i ΔG) – koristite vaše udžbenike iz fizičke hemije i/ili odgovarajuće odeljke iz ovog Praktikuma. Naučite najosnovnije o konformacionim prelazima i konformacionoj stabilnosti proteina i protein-ligand interakcijama – koristite predavanja iz PNK i tamo predloženu literaturu. Obnovite strukturu i aktivnost mioglobina i hemoglobina: možete koristiti materijal sa predavanja i tamo predloženu literaturu. Proučite eksperimentalne aspekte predviđenih vežbi. Rezimirajte ukratko o čemu se radi u vežbama koje ćete raditi. Pripremite pitanja za teorijske vežbe.

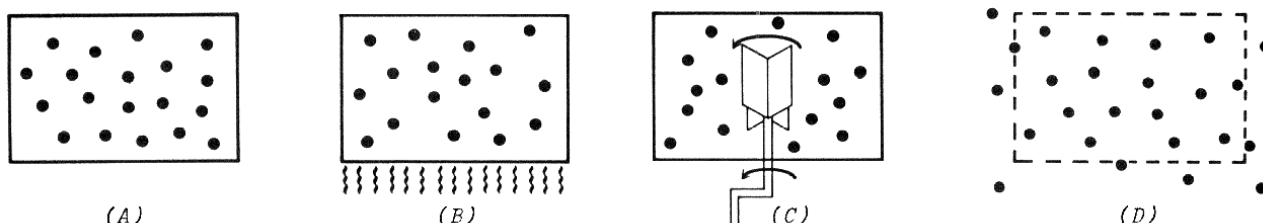
UVOD

Pod ponašanjem proteina podrazumevamo dinamičke aspekte strukture proteina, pre svega konformacione prelaze denaturaciju/renaturaciju (uvijanje-razvijanje proteina) kao i protein-ligand interakcije. Da bismo ove teme (kako teorijski, tako i eksperimentalno) razmatrali potrebno je da imamo operativno poznavanje osnovnih pojmova iz termodinamike. Zato će u odeljcima koji slede biti prvo dat kratak osvrt na osnovne termodinamičke veličine, a potom će ovi koncepti biti primenjeni na uvijanje i denaturaciju proteina. Interakcije proteina sa ligandima upoznaćemo na primeru hemoglobina, mioglobina i fikobilinskih proteina, a denaturaciju reversibilnu, odnosno ireversibilnu upoznaćemo na primeru mioglobina i fikobilinskih proteina odnosno hemoglobina.

5.1 Podsetnik iz termodinamike

Toplota, rad i energija - prvi princip termodinamike

Sistem je deo univerzuma koji smo izabrali za ispitivanje. Biohemijski sistem može da bude, na primer, reakcija, mitohondrija, ćelija, srce, miš, itd. Sistem je ograničen u prostoru i odvojen od *okoline*.



Slika 5.1 Izolovan sistem (A); zatvoren sistem (B i C); otvoren sistem (D)

Sistem može da bude *izolovan* (ne razmenjuje materiju i energiju sa okolinom), *zatvoren* (razmenjuje samo energiju sa okolinom), i *otvoren* (razmenjuje i materiju i energiju sa

okolinom). Čelija, na primer, predstavlja otvoren sistem. Navedeni slučajevi šematski su prikazani na slici 5.1.

Ravnoteža: Sistem je u ravnoteži kada se ni jedna njegova osobina ne menja sa vremenom.

Stanje sistema: Termodinamičko stanje sistema jasno se može definisati samo za sistem koji se nalazi u ravnoteži. U tom slučaju definisanje izvesnog broja promenljivih (dve od tri promenljive - temperatura, pritisak i zapremina - plus mase i identiteti hemijskih supstanci u sistemu) definisaće stanje sistema. Ako je stanje definisano, sistem se može u bilo koje doba reprodukovati. Takođe, ako je stanje sistema definisano i njegova svojstva (osobine) su data. Svojstva sistema mogu biti dvojaka. Definisanje *ekstenzivnih* svojstava, kao što su zapremina i energija, zahteva definisanje stanja sistema uključujući i količine svih supstanci u sistemu. *Intenzivna svojstva*, kao to su viskoznost i gustina, mogu se definisati sa manje podataka - potrebne su samo *relativne* količine različitih supstanci. Na primer gustina 1 M NaCl je nezavisna od veličine uzorka, mada zavisi od temperature T, pritiska P, i koncentracije NaCl.

Sve veličine koje su jednoznačno definisane u stanju ravnoteže nazivaju se **funkcije stanja**. Njihova promena zavisi samo od početnog i krajnjeg stanja, a ne i od puta - načina na koji se prelaz vrši. Centralni problem termodinamike je nalaženje ovih funkcija stanja. Temperatura, zapremina, koncentracija - kao funkcije stanja su veličine koje se lako mere, ali su one sa stanovišta termodinamike i najmanje korisne. One funkcije stanja koje su, kao što ćemo videti, najkorisnije, skrivene su i o njihovom postojanju se može zaključiti samo indirektnim putem.

Termodinamika se obično bavi prelazima između ravnotežnih stanja. Ovi prelazi (proces) mogu biti *reversibilni ili ireversibilni (spontani)*. Ako je prelaz reversibilan, put od početnog do krajnjeg stanja vodi kroz niz stanja koja su blizu ravnoteže. Sistem je uvek tako blizu ravnoteže da se smer procesa može izazvati beskonačno malom promenom u okolini. Postoji više načina za ilustraciju pojma ireversibilnosti, od kojih navodimo jedan. Zamislamo da film na kojem smo snimili neki proces od početka do stanja ravnoteže posmatramo unazad. Ukoliko nam sekvence događaja izgledaju neverovatne, proces koji smo posmatrali je ireversibilan. Znači, ireversibilan proces može da se dešava samo u jednom smeru. Koji je to smer, kao i dokle će proces teći, govore nam nove funkcije stanja čiji su odnosi definisani drugim principom termodinamike.

Toplota¹ q, je energija koju sistem apsorbira ili otpušta zbog razlike u temperaturi između sistema i okoline.

Rad w, obuhvata svaki drugi oblik razmene energije između sistema i okoline izuzev toplote. Razlikujemo PΔV rad i takozvani koristan rad (w') koji obuhvata sve ostale vrste rada kao što su električni, mehanički, itd.:

$$W = W' + P \Delta V$$

Unutrašnja energija E, predstavlja ukupnu energiju unutar sistema. U hemiji razmatramo samo one vrste energije koje se mogu menjati u hemijskim procesima (na primer, energija atomskog jezgra se ne razmatra). Uzima se da unutrašnja energija sistema uključuje: translacionu, vibracionu i rotacionu energiju molekula, energiju hemijskih veza i energiju

¹ Oznake za termodinamičke veličine u ovom poglavlju su u saglasnosti sa preporukama IUPAC-a.

nevezivnih interakcija među molekulima. Nevezivne interakcije utiču na strukturu i stabilnost biomakromolekula.

Unutrašnja energija je funkcija stanja sistema. To znači da, ako je stanje sistema definisano, unutrašnja energija sistema ima određenu vrednost, bez obzira na način na koji je sistem došao u to stanje. Pošto se obično bavimo energetskim promenama, unutrašnja energija se definiše u odnosu na neko proizvoljno izabrano standardno stanje.

Entalpija $H = E + PV$, predstavlja zbir unutrašnje energije sistema i proizvoda iz zapremine sistema i spoljašnjeg pritiska na sistem. Entalpija je takođe funkcija stanja.

Polazeći od napred definisanih pojmova, definišaćemo *prvi zakon termodinamike, zakon o održanju energije*. Pri promeni stanja, promena unutrašnje energije sistema jednaka je količini absorbovane toplote umanjenoj za rad koji sistem vrši:

$$\Delta E = q - W$$

Za male promene biće:

$$dE = dq - dw$$

Crta kroz simbol za diferenciranje nas podseća da, dok je E funkcija stanja i dE ne zavisi od puta kojim se prelaz vrši, q i w zavise od puta.

Odnosi koji proizilaze iz prvog principa termodinamike sumirani su na slici 5.2. Za promene pri konstantnoj zapremini biće:

$$dE = dq$$

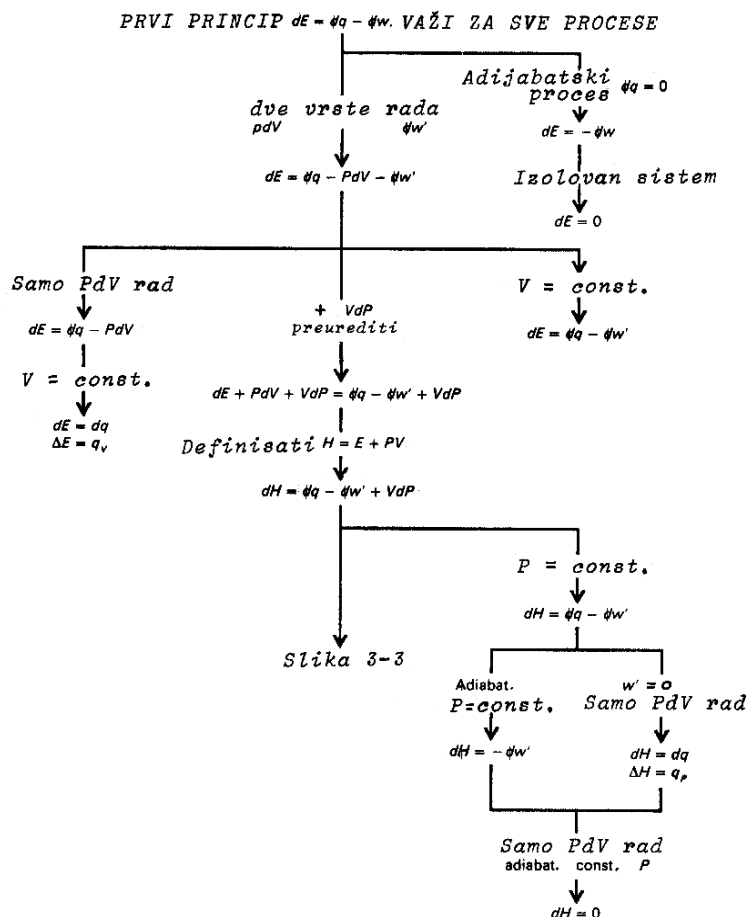
$$\Delta E = q, \text{ za konačnu promenu stanja}$$

dok, za procese koji se dešavaju pri konstantnom pritisku, biće

$$dH = dq$$

$$\Delta H = q, \text{ za konačnu promenu stanja}$$

To znači, da toplota apsorbirana u procesu koji se dešava na konstantnoj zapremini predstavlja meru ΔE , a toplota absorbovana u procesu koji se dešava na konstantnom pritisku predstavlja meru ΔH . Pošto se većina bioloških procesa dešava na konstantnom pritisku, u biohemiji se koristi ΔH . Međutim, pošto se većina ovih procesa dešava u tečnom ili čvrstom stanju, u kojima su promene zapremine zanemarljive, može se uzeti da promena u entalpiji sistema odgovara promeni u unutrašnjoj energiji ($\Delta E \approx \Delta H$). Znači, količina toplote koja se apsorbira ili oslobađa u nekom biološkom procesu direktna je mera promene unutrašnje energije sistema i može da se meri izvođenjem datog procesa u kalorimetru.



Slika 5.2 Odnosi koji proističu iz prvog zakona termodinamike

Entropija, slobodna energija i ravnoteža

U dosadašnjem izlaganju bilo je reči samo o energetskim promenama koje prate hemijske i fizičke procese. Namerno je izostavljen važan faktor - *smer* u kojem će proces teći. Tako, prvi zakon termodinamike nam omogućuje da razmatramo promene toplote i rada koje prate neku hemijsku reakciju, kao što je na primer hidroliza ATP do neorganskog fosfata:



ali nam ne pruža mogućnost da zaključimo da li će ATP spontano da hidrolizuje u vodenom rastvoru. Intuitivno ćemo pretpostaviti da će pod datim uslovima nastati ravnoteža između H_2O , ATP, ADP i neorganskog fosfata, ali nema načina da na osnovu prvog zakona termodinamike nađemo gde se ta ravnoteža nalazi.

Posmatrajući razne ireversibilne procese, uočićemo da ravnotežno stanje u odnosu na početno stanje karakteriše veća *neuređenost* i *veća verovatnoća*. Ako se radi o sistemu s velikim brojem čestica (na primer, hemijski sistem atoma ili manjih molekula) i koji stoga može statistički da se tretira, videćemo da u stanju ravnoteže postoji veći broj načina na koje čestice mogu da se rasporede (neuređenost je veća). Zbog toga definišemo novu funkciju stanja koju nazivamo *entropija* (S):

$$S = k \ln W$$

gde je k = Boltzman-ova konstanta, a W = broj načina na koji se čestice mogu rasporediti. Promena entropije pri prelasku iz nekog stanja (1) u ravnotežno stanje (2) biće:

$$\Delta S = S_2 - S_1 = k \ln W_2 - k \ln W_1$$

Pošto je, kao što smo već pomenuli, $W_2 > W_1$, entropija će u ravnotežnom stanju imati maksimalnu vrednost.

Razmotrimo i beskonačno male promene u stanju sistema. Pretpostavićemo da se radi o reversibilnim promenama, što znači da pri ovome sistem ne odstupa znatno od stanja ravnoteže. U tom slučaju, može se dokazati, da je:

$$dS = dq_{rev}/T$$

Ovo je klasična definicija za promenu entropije. Za dati izotermalni proces biće:

$$\Delta S = q_{rev}/T$$

Iz gornjeg odnosa proizilazi da ako želimo da izračunamo promenu entropije pri prelasku sistema iz stanja 1 u stanje 2, potrebno je jedino razmatrati reversibilni put između ova dva stanja i odrediti absorbovanu ili oslobođenu toplotu.

Definisanje promene entropije u (infinitesimalnim), reversibilnim procesima kao $dS = dq_{rev}/T$ omogućuje nam da preformulišemo prvi zakon termodinamike za reversibilne procese:

$$dE = dq - dw = TdS - PdV$$

Ovo nam omogućuje da precizno definišemo kriterijum za sistem u ravnoteži. *Ako i samo ako je sistem u ravnoteži, beskonačno male promene će biti reversibilne.* Ako se energija i zapremina sistema održavaju konstantnim, za reversibilnu promenu biće:

$$dS = 0$$

Ovo znači da S mora da bude ili u maksimumu ili u minimumu da bi sistem sa konstantnom E i V bio u ravnoteži. Bliža analiza pokazuje da se radi o prvom slučaju. U izolovanom sistemu (održava se E i V konstantnim), sistem će biti u ravnoteži samo kada entropija dostigne maksimum, tj sistem dotigne stanje maksimalne neuređenosti. Ovo je najčešći način na koji se izražava *drugi zakon termodinamike*.

Izolovani sistemi koji se održavaju na konstantnoj zapremini nisu mnogo interesantni za biohemiju. Većina biohemijskih sistema odgovara uslovima konstantne temperature i pritiska. Za ove uslove važi nova funkcija,

Gibbs-ova slobodna energija, G :

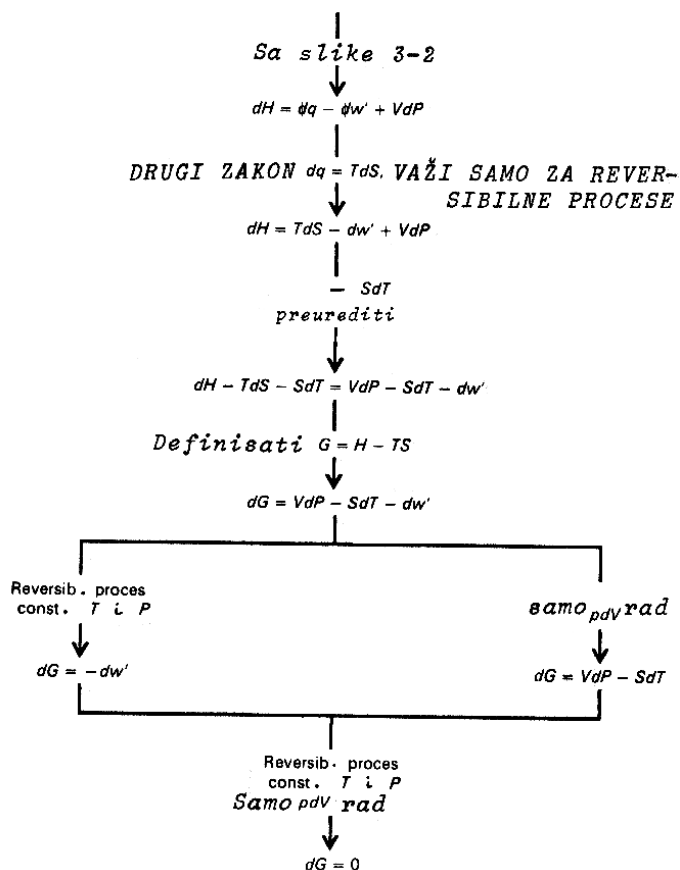
$$G = H - TS$$

Izraz za promenu dG se dobija diferenciranjem gornje jednačine (videti sliku 6.3). Ako je dati proces reversibilan, i ako je T i P konstantno biće:

$$dG = 0$$

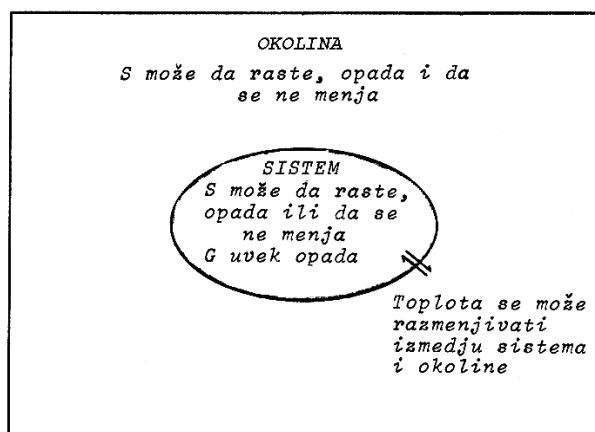
Ovo može da se interpretira na isti način kao što smo to napred učinili. Za sistem koji je u ravnoteži i u kojem su P i T konstantni, G ima ekstremnu vrednost, ali u ovom slučaju to će biti minimum. Neke od posledica drugog zakona sumirane su na slici 5.3.

Gibbsova slobodna energija je od ogromne važnosti za određivanje smeru procesa i položaja ravnoteže u biohemijskim procesima. Ako je promena slobodne energije za neki proces negativna, taj proces će biti spontan, jer vodi u smeru uspostavljanja ravnoteže. Štaviše, ΔG je kombinacija ΔH i ΔS , što ukazuje da i smanjenje energije i povećanje entropije (neuređenosti) imaju važnu ulogu u određivanju položaja ravnoteže.



Slika 5.3 Odnosi koji proističu iz drugog zakona termodinamike

Odnosi između G , H i S za otvoren sistem prikazani su na slici 5.4.



Univerzum = sistem + okolina

Prvi princip: ukupna energija univerzuma je konstantna

Drugi princip: Entropija univerzuma stalno raste

Slika 5. 4 Odnosi između entropije (S) i slobodne energije (G) u sistemu i okolini na konstantnom pritisku i temperaturi

Na osnovu dosadašnjeg izlaganja zaključujemo da ravnotežno stanje karakterišu minimalna entalpija i maksimalna entropija (ali entropija univerzuma!).

ΔG i konstanta ravnoteže reakcije

Posmatrajmo hemijsku reakciju $aA + bB + \dots \rightleftharpoons mM + nN + \dots$ koja nije u stanju ravnoteže i gde je koncentracija A jednaka c_A , koncentracija B c_B , itd.. Promena slobodne energije pri prelasku reakcionog sistema iz početnog u neko krajnje, ravnotežno stanje biće:

$$\Delta G = G_{\text{krajnje}} - G_{\text{početno}}$$

Izraz za ΔG izveden preko hemijskih potencijala glasi:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln(c_M^m \cdot c_N^n \dots / c_A^a \cdot c_B^b \dots) + RT \ln(\gamma_i)$$

Prvi član, ΔG° , *standardna slobodna energija*, označava promenu slobodne energije koja nastaje kada se i reaktanti i proizvodi nalaze u nekom proizvoljno izabranom "standardnom" stanju. U hemijskim reakcijama se uzima da to odgovara stanju u kojem se koncentracije reaktanata i proizvoda održavaju na 1M:

$$\Delta G = \Delta G^\circ \text{ ako je } c_i = 1M \text{ i } \gamma_i = 1 \text{ za sve } i$$

Drugi član u gornjoj jednačini govori o uticaju koncentracija reaktanata i proizvoda na ΔG , a treći član govori o uticaju aktiviteta. U biohemijskim izračunavanjima treći član se obično zanemaruje jer se radi o razblaženim rastvorima pa se može uzeti da su aktiviteti reaktanata i proizvoda jednaki jedinici. Za sistem u ravnoteži $\Delta G = 0$, iz čega sledi:

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln(c_M^m \cdot c_N^n \dots / c_A^a \cdot c_B^b \dots) = \Delta G^\circ + RT \ln K$$

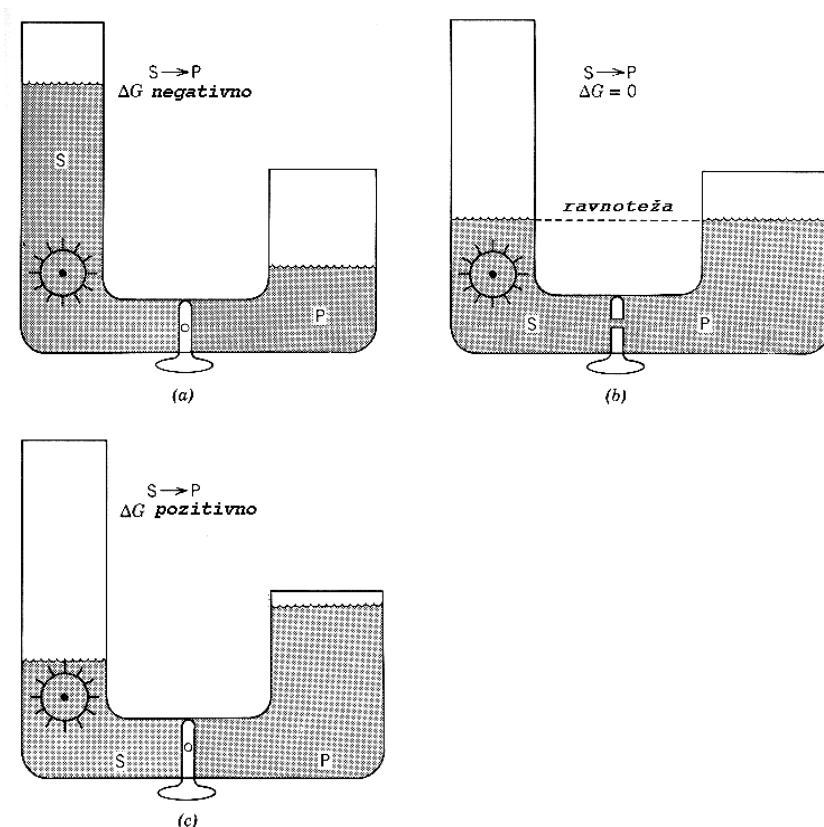
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

gde je K = konstanta ravnoteže. Na temperaturi od 25°C biće $\Delta G^\circ = -5\,707 \log K$. Ukoliko u reakciji učestvuje i voda (kao na primer, pri hidrolizi) u vrednost za ΔG° uključuje se i koncentracija vode (55.5M, za razblažene rastvore). U biohemijskim reakcijama ΔG° se određuje na 25°C i pH 7 i u tom slučaju se obeležava sa ΔG° ili $\Delta G'$. ΔG za bilo koje drugo stanje (na primer, za različite koncentracije reaktanata i proizvoda) može da se izračuna polazeći od ΔG° ili ΔG° vrednost. Odnosi između ΔG i koncentracija reaktanata i proizvoda slikovito su prikazani na slici 5.5. Odnosi između konstanti ravnoteže (K) i ΔG° na različitim temperaturama dati su u tabeli 5.1.

Tabela 5.1 Odnosi između K i ΔG° na različitim temperaturama

K	$\log K$	$\Delta G^\circ(25^\circ\text{C})$	$\Delta G^\circ(30^\circ\text{C})$	$\Delta G^\circ(37^\circ\text{C})$
0,001	-3	17 108	17 422	17 824
0,01	-2	11 406	11 606	11 883
0,1	-1	5 707	5 803	5 941
1,0	0	0	0	0
10,0	1	-5 707	-5 803	-5 941
100,0	2	-11 414	-11 606	-11 883
1000,0	3	-17 108	-17 422	-17 824

Iz tabele 5.1 vidimo da čak i male vrednosti za K odgovaraju velikim vrednostima za ΔG° . Za reakciju za koju je $K > 10^4$ (koja će biti praktično potpuno pomerena udesno) biće $\Delta G^\circ > 20$ kJ/mol. Ilustracije radi, u tabeli 5-2 date su ΔG° vrednosti za neke hemijske reakcije.



Slika 5.5 (a) Odnos reaktanta S i proizvoda P na početku reakcije je veći nego u stanju ravnoteže: reakcija će teći spontano ako je zapašać otvoren; (b) Stanje ravnoteže; (c) Odnos reaktanta S i proizvoda P je manji nego u stanju ravnoteže: reakcija će teći spontano u pravcu nastajanja reaktanta S, ako je zapašać otvoren

Tabela 5.2 ΔG° za neke hemijske reakcije na 25°C i pH 7

	ΔG° kJ/mol
Oksidacija	
glukoza + 6O ₂ → 6CO ₂ + 6H ₂ O	-2870
laktat + 3O ₂ → 3CO ₂ + 3H ₂ O	-1393
palmitat + 23O ₂ → 16CO ₂ + 16H ₂ O	-9782
Hidroliza	
saharoza + H ₂ O → glukoza + fruktoza	-30
glukozo-6-fosfat + H ₂ O → glukoza + H ₃ PO ₄	-14
glicilglicin + H ₂ O → 2 glicin	-9,2
Premeštanje	
glukozo-1-fosfat → glukozo-6-fosfat	-7,1
fruktozo-6-fosfat → glukozo-6-fosfat	-1,7
Eliminacija	
malat → fumarat + H ₂ O	+3,1

Primer:

ΔG° za hidrolizu ATP je $-32,2$ kJ/mol. Izračunati ΔG za hidrolizu ATP pri uslovima koji vladaju u ćeliji: koncentracija ATP = 10^{-3} M, koncentracija ADP = 10^{-4} M, a P_i = 10^{-2} M, (P_i = neorganski fosfat), pH = 7, i $t = 25^\circ\text{C}$.



$$\begin{aligned}\Delta G &= \Delta G' + 5,708 \log \frac{(\text{ADP})(\text{P}_i)}{(\text{ATP})} \\ &= -32,217 + 5,708 \log(10^{-4} \cdot 10^{-2} / 10^{-3}) \\ &= -32,217 - 17,124 = -49,341 \\ \Delta G &= -49,341 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

5.2 Spontano uvijanje i konformaciona stabilnost proteina

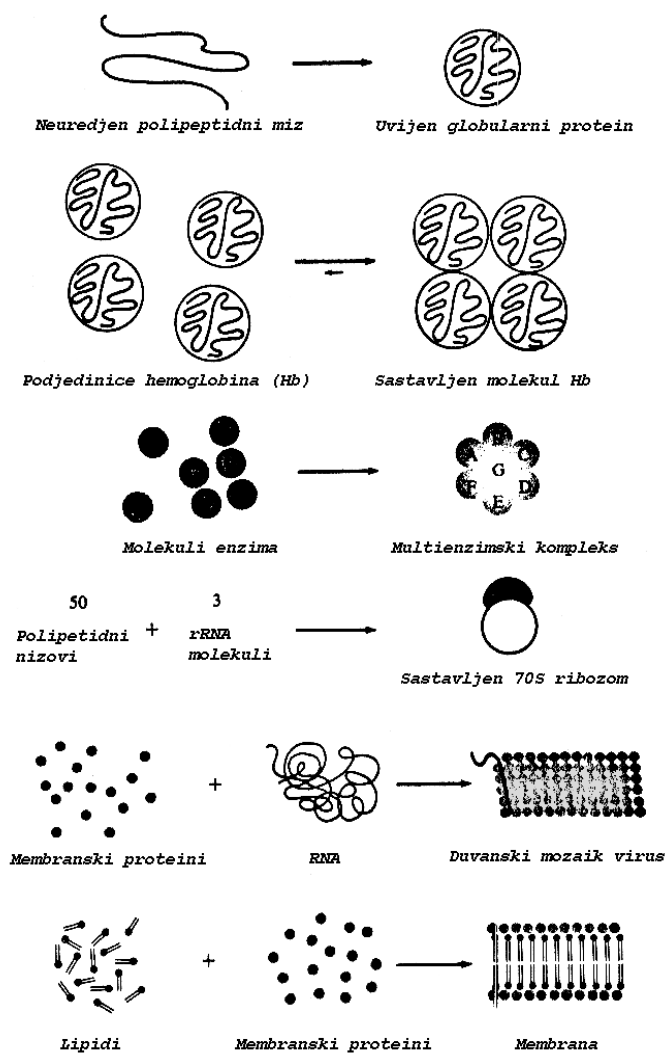
Razvijeni polipeptidni niz se pod fiziološkim ili simuliranim *in vitro* fiziološkim uslovima, spontano uvija u nativnu konformaciju. Štaviše, i više (supramolekulske) strukture, kao što su hemoglobin, enzimski kompleksi, ribozomi, virusi membrane, takođe nastaju sponatno iz polaznih jedinica (Slika 5-6). U svim navedenim primerima sistem spontano prelazi iz neuređenog stanja u stanje veće uređenosti.

Proces prelaska polipeptidnog niza iz razvijene (neuređene -“random”) u uvijenu (uređenu-nativnu) konformaciju možemo prikazati na sledeći način:

$$\begin{aligned}\Delta G_t &= G_n - G_r = \Delta H_t - T\Delta S_t \\ \Delta H_t &= H_n - H_r \\ \Delta S_t &= S_n - S_r\end{aligned}$$

gde n označava uvijenu, a r razvijenu(e) konfromaciju i t - totalnu (ukupnu) promenu.

Zamislićemo prvo da se polipeptidni niz nalazi u vakuumu (Slika 5-7a). Kako je $S_r > S_n$ (jer je r -stanje neuređenije od n -stanja!) $T\Delta S_t$ će biti negativno, što znači da će entropijski faktor favorizovati konformaciju razvijenog niza. Međutim, ako se pri prelasku u uvijenu (uređenu) konformaciju unutrašnja energija sistema dovoljno smanjuje (ako je ΔH_t dovoljno negativno) biće $\Delta G_t < 0$. To se može desiti u slučaju da se uvijena konformacija stabilizuje privlačnim interakcijama među ostacima aminokiselina (elektrostatičko privlačenje među suprotno naelektrisanim grupama, vodonično vezivanje).



Slika 5.6 Spontano nastajanje uređenih bioloških struktura

	ΔG_{total}	$-T\Delta S_{niz}$	$\Delta G_{transfer}$	ΔH_{niz}	$-T\Delta S_{rastvar.}$	$\Delta H_{rastvar.}$
(a)	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$		$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$		
(b)	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$
(c)	$\text{---} R=N$	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$	$\begin{array}{ c } \hline \text{---} \\ \hline \end{array}$

Slika 5.7 Uticaj energetske faktora (po atomskoj grupi) na stabilnost proteina. Strelica označava pravac procesa koji je favorizovan. (a): Polipeptid u vakuumu. (b):

Primer:

Polipeptidni niz od 100 aminokiselinskih ostataka gradi α -heliks. Koliko je ΔG za prelazak ovog polipeptidnog niza iz neuređene konformacije u α -heliks?

$$S = R \ln w$$

$$\Delta S = S_n - S_r = R \ln W_n - R \ln W_r = R \ln(W_r/W_n)$$

gde je S_n = entropija heliksa, a S_r = entropija neuređenog, "random" niza. Heliks je definisan vrednostima za torzione uglove Φ i ψ (uglovi rotacije oko C_α -N i C_α -C' veza). U r-stanju ti uglovi mogu imati bilo koju vrednost, dok u n-stanju imaju samo određene vrednosti (npr.: -60° , $+60^\circ$). Predpostavljamo da bočni nizovi u oba slučaja mogu slobodno da rotiraju. Ako uglovi karakteristični za α -heliks predstavljaju 10% svih uglova mogućih za neuređeni oblik, onda je verovatnoća da će ostatak aminokiseline zauzeti ugao potreban za α -heliks jednaka 0,1. Za 100 ostataka aminokiselina verovatnoća postaje $(0,1)^{100}$. Tada je:

$$S = R \ln(0,1)^{100} = -1,92 \text{ kJ/mol}$$

Ako zanemarimo uticaj rastvarača, tj. ako posmatramo polipeptidni niz u vakuumu, biće, na 37°C :

$$\Delta G = \Delta H + 598 \text{ kJ/mol}$$

Prema tome, heliks će da nastane ako energija vezivanja bude veća od 6 kJ/mol peptidne veze, što se lako postiže vodoničnim vezivanjem.

Ukoliko se polipeptidni niz nalazi u vodenoj sredini, situacija postaje znatno komplikovanija. Za nativnu konformaciju malih, globularnih u vodi rastvornih proteina, karakteristično je da se polarni aminokiselinski ostaci nalaze na površini molekula, dok se u unutrašnjosti globule skoro isključivo nalaze nepolarni aminokiselinski ostaci. Interakcije nepolarnih bočnih ostataka sa molekulima vode, do kojih dolazi kada je polipeptidni niz razvijen, mnogo su jače (interakcije dipol - indukovani dipol!) od međusobnih interakcija nepolarnih grupa (disperzione sile) u unutrašnjosti uvijene konformacije globularnih proteina. Drugi zakon termodinamike neće biti narušen ukoliko je proces uvijanja polipeptidnog niza u vodenoj sredini praćen porastom entropije okoline. Takav proces postoji i odnosi se na molekule vode koji su blokirani građenjem vrlo uređenih, klatratnih (vodonično-vezanih) struktura oko nepolarnih ostataka aminokiselina u razvijenom nizu. Pri prelasku nepolarnih ostataka u unutrašnjost proteinske globule dolazi do oslobađanja ovih blokiranih molekula vode. Ovaj proces podseća na svima poznatu pojavu spontanog prelaska ulja koje je u dodiru sa vodom iz monodisperznog sloja u kapljicu. U ovim procesima veliko povećanje entropije okoline (H_2O) više nego kompenzuje opadanje entropije sistema (Slika 5.7). Opisani efekat rastvarača je u literaturi poznat kao *hidrofobni efekat* ("hidrofobne sile"). Hidrofobni efekat doprinosi i drugim procesima prikazane na slici 5-6.

5.3 Denaturacija proteina

Pod denaturacijom proteina podrazumeva se razvijanje polipeptidnog niza, tj. prelazak uređene (nativne) konformacije molekula proteina niže slobodne energije u razvijenu, neuređenu ("random") konformacije viših energija (Slika 5).

8). Denaturacija proteina može da se postigne povišenjem temperature, promenom pH rastvora proteina, dodatkom sredstava za denaturaciju (SDS, urea, organski rastvarači) ili kombinacijom navedenih faktora. Denaturisani protein gubi svoju biološku aktivnost, a razlikuje se i po nizu fizičkih i hemijskih karakteristika od nativnog.

Razvijanje proteina prati se metodama koje mogu da detektuju promene koje se u molekulu proteina dešavaju pri razvijanju. Koje su to promene? Od njih zavisi i koje ćemo metode koristiti. U donjoj tabeli su navedene neke od promene koje nastaju pri razvijanju (denaturaciji) molekula proteina. Dopunite tabelu navođenjem uzroka ovih promena i navođenjem metoda koje se mogu koristiti za njihovo detektovanje (merenje). Razmislite kakvi se rezultati dobijaju primenom svake od metoda koju ste naveli i kako dobijeni rezultati mogu da se tumače i međusobno kombinuju? Pokušajte, na osnovu dosadašnjih saznanja, da date odgovarajuće (može i hipotetične) primere.

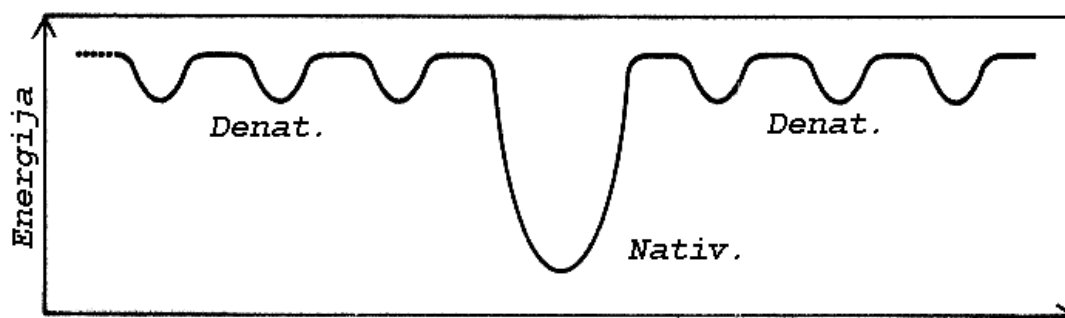
Promena pri razvijanju proteina:	Uzrok	Metoda za merenje
Viskoznost		
Izloženost ostataka aminokiselina		
Rastvorljivost		
Optička rotacija		

Promenu slobodne energije pri prelasku proteina iz nativnog u denaturisani oblik, $\Delta G_{\text{denaturacije}}$ možemo da predstavimo na sledeći način:

$$\Delta G_{\text{denat}} = \Delta H_{\text{denat}} - T\Delta S_{\text{denat}}$$

$$\Delta S_{\text{denat}} = R \ln(w_{\text{denat}}/w_n)$$

Proces denaturacije proteina toplotom praćen je povećanjem entropije i entalpije. Promena entropije u ovom procesu je pozitivna jer je $w_{\text{denat}}/w_n \gg 1$. Povećanje entalpije (unutrašnje energije) se objašnjava raskidanjem međumolekulskih interakcija koje su postojale u nativnoj konformaciji. Na povišenim temperaturama dolazi do pojačanog intramolekulskog kretanja delova molekula nativnog proteina, što dovodi do raskidanja međumolekulskih interakcija među bočnim ostacima aminokiselina koje su postojale u nativnoj konformaciji. Pored toga, i uređena struktura vode oko nepolarnih ostataka na višim temperaturama nije stabilna, što čini da sa porastom temperature doprinos hidrofobnog efekta stabilnosti uvijene globule opada ili nestaje.



Slika 5.8. Termalna denaturacija proteina

Drugim rečima, na nižim temperaturama za proces denaturacije je $\Delta G > 0$, (protein je stabilan u nativnoj konformaciji), dok je na višim temperaturama za proces denaturacije $\Delta G < 0$ (denaturacija je favorizovan proces).

ZADACI I PROBLEMI

1. Odgovorite na sledeća pitanja sa *tačno* ili *pogrešno*. Ako je odgovor *pogrešno* dati obrazloženje.

- (a) Energija se prenosi od fototrofa ka heterotrofama, dok materija kruži između njih.
- (b) U živim organizmima rad može da se ostvari prelaskom toplote sa toplijih na hladnije delove.
- (c) Sistem je u termodinamičkoj ravnoteži kada je njegova entropija u minimumu.

2. Poredajte vrednosti za entropiju od manjih ka većim vrednostima za: (a) čvrsto, tečno i gasovito agregatno stanje supstance; (b) za led i vodu.

3. Odgovorite na sledeća pitanja sa *tačno* ili *pogrešno*. Ako je odgovor *pogrešno* dajte obrazloženje.

- (a) Termodinamički najstabilnija konformacija proteina jeste konformacija najniže slobodne energije.
- (b) Stvaranje unutrašnjih vodoničnih veza je glavni razlog za uvijanje proteina.
- (c) Organski rastvarači izazivaju denaturaciju proteina zbog sprečavanja jonskih interakcija.
- (d) Urea izaziva denaturaciju zbog vodoničnog vezivanja sa peptidnim vezama.
- (e) Uvijanje proteinskog niza izaziva povećanje njegove entropije.

4. Za koje se od sledećih aminokiselinskih ostataka, na pH 7, može očekivati da se nađu u unutrašnjosti uvijene konformacije molekula proteina, a za koje na spoljašnjoj strani: Glu, Val, Ile, Asn, Ser, Arg, Phe, Met, Lys, Thr?

5. Hemoglobin (Hb) se sastoji iz dva α i dva β niza. Struktura nizova je veoma slična strukturi mioglobina, izuzev što su na više mesta hidrofilni ostaci aminokiselina koji se nalaze u molekulu mioglobina zamenjeni hidrofobnim ostacima. (a) Gde očekujete da se nalaze ove izmene? (b) šta biste na osnovu odgovora pod (a) moglo da zaključite o interakcijama koje stabilizuju kvaternu strukturu hemoglobina?

6. Šta bi se moglo reći o odnosu hidrofilnih prema hidrofobnim ostacima u seriji globularnih proteina čije molekulske mase rastu od 10 000 do 100 000 daltona?

7. Dok većina bakterija uquine na $t > 50^{\circ}\text{C}$, neke termofilne bakterije opstaju i na $70-80^{\circ}\text{C}$. Da li i kakve razlike očekujete u proteinima ovih bakterija?

8. Zamislite segment polipeptidnog niza koji može da se uvije u α heliks. Da li će biti termodinamički verovatnije da se segment uvija ako je izložen vodenoj okolini ili pak ako se nalazi u nepolarnoj unutrašnjosti molekula proteina? Dati obrazloženje.

9. Odgovoriti na sledeća pitanja *sa tačno* ili *pogrešno*. Ako je odgovor *pogrešno* dati obrazloženje.

(a) Stvaranje supramolekulskih struktura zahteva informaciju od postojećih templata.

(b) Supramolekulske strukture nastaju zbog vodoničnih veza i jonskih interakcija.

10. Pretpostavite da postoji ravnoteža između dimernog proteina i njegovih monomera



ΔS za ovaj proces varira sa temperaturom na sledeći način:

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$):	0 $^{\circ}$	25 $^{\circ}$	40 $^{\circ}$
ΔS (kJ/mol stepen):	-0,059	-0,004	+0,109

ΔH je malo u odnosu na ΔS , izuzev u blizini 25°C , Kako će se menjati asocijacija proteina ako se temperatura snizi sa 40°C na 0°C .

5.4 Protein - ligand interakcije

Proteini imaju osobinu da specifično interaguju sa malim molekulima, koje jednim imenom nazivamo ligandima. U nekim slučajevima ligandi mogu biti i makromolekuli. Podsećanja radi, u donjoj tabeli su dati primeri interakcija proteina sa ligandima. Ne treba zaboraviti da pod ligandima podrazumevamo i kofaktore (prostetične grupe) koji čine sastavni deo proteina i proširuju njegovu funkciju. Strukturna osnova specifičnog prepoznavanja i vezivanja liganda i molekula proteina zasniva se na komplementarnosti površina vezivnog mesta na molekulu proteina i molekula liganda. Komplementarnost površina doprinosi i vezivnoj energiji proteina i liganda (elektrostatička komplementarnost, vodonične veze, hidrofobni efekat).

Ispitivanje interakcija proteina sa ligandima (kvalitativni i kvantitativni aspekti) izuzetno je važno za upoznavanje aktivnosti i funkcije proteina, a ima i određenu praktičnu (biomedicinsku) primenu. Na osnovu ovih podataka mogu se izvesti i zaključci o strukturi datog proteina.

Protein	Ligand
Enzimi	Kofaktori
	Supstrati

Receptori	Hormoni Vitamini Faktori rasta
Antitela	Antigeni
Glikoproteini	Lektini
Specifični proteini	Nukleinske kiseline

Metode za ispitivanje vezivanja (malih) liganada za proteine date su u donjoj tabeli. Ove metode se mogu primeniti i na druge makromolekule (nukleinske kiseline, polisaharidi).

Tabela 11.1: Metode za ispitivanje vezivanja malih liganada za proteine (makromolekule uopšte)

Odredjivanje koncentracije slobodnog liganda: Biološka aktivnost; Odvajanje liganda: dijaliza, ultrafiltracija, gel filtracija, ultracentrifuga; Elektrohemijske: specifične elektrode, konduktometrija, polarografija.
Perturbacija osobina vezanog liganda: Optička spektroskopija, NMR, fluorescencija, ESR.
Perturbacija osobina PL kompleksa (u odnosu na protein bez liganda): Biološka aktivnost; Termodinamičke: osmotski pritisak, ΔpI , sedimentacija, rasejavanje svetlosti; Elektromagnetne: spektroskopske (UV/VIS, ORD, NMR, rendgenska strukturna analiza), elektroforetske.

Zadatak 1: Ispitati interakcije hemoglobina sa ligandima; ispitati termalnu stabilnost hemoglobina:

- (a) Izolovati** hemoglobin iz humanih eritrocita,
- (b) Ispitati** interakcije hema i globina u hemoglobinu,
- (c) Ispitati** interakcije hemoglobina sa ligandima (apsorpcioni spektri Hb),
- (d) Ispitivanje stabilnosti** methemoglobina

(a) Izolovanje hemoglobina: hemoliza eritrocita i dobijanje rastvora Hb

Hemolizu eritrocita pripremljenih na napred opisani način (Vežba 7) izvršite dodavanjem 1 - 3 zapremine vode i 1 zapremine ugljen-tetrahlorida na 1 zapreminu (1 - 2 mL) eritrocita, uz snažno mućkanje na "Vorteks-u". Ostavite hemolizat 1 sat u frižideru, nakon čega ga centrifugujte, 25 minuta na 3000 obr/min. Organski sloj i međusloj u kojem se nalaze istaloženi proteini (uglavnom iz membrana) odbacite. Rastvor, u kojem se pored hemoglobina (u kom je obliku ovaj Hb?) nalaze i manje količine drugih proteina iz unutrašnjosti eritrocita, prenesite u čistu epruvetu. Dobijeni rastvor hemoglobina razblažite tako da A_{500} nm iznosi oko 0,5.

(b) Ispitivanje interakcija hema i globina: nalaženje optimalnih uslova za odvajanje hema od globina u hemoglobinu

Odvajanje hema od globina u hemoglobinu vrši se ukapavanjem hladnog rastvora hemoglobina u ohlađeni aceton, koji sadrži malo hlorovodonične kiseline. Pri ovome se globin iz hemoglobina taloži (kao beo pahuljičasti talog), a hem zaostaje u acetonskom rastvoru (koji postaje crven). Na odvajanje hema od globina utiče koncentracija rastvora hemoglobina i jonska sila rastvora u kojem se hemoglobin nalazi. *U okviru ove vežbe ćete ispitati uticaj jonske sile i koncentracije rastvora hemoglobina na odvajanje hema od globina. Na osnovu dobijenih rezultata zaključićete koja je dominantna priroda interakcija između hema i globina u Hb.*

Materijal:

Svež hemolizat, u koncentraciji 10 %, 5 %, 2 %, 0,2 %, 0,02 % Hb u vodi,
1 % NaCl i 10 % NaCl,
Aceton koji sadrži 3 mL 2 M HCl na 1 litar, ohlađen na -18° C,
Kivete za centrifugu od 10 - 12 mL,
Pasterove pipete,
Laboratorijska centrifuga,
UV/VIS spektrofotometar

Postupak:

Odredite koncentraciju rastvora hemoglobina (koristeći ekstinkcioni koeficijent na nekom od karakterističnih apsorpcionih maksimuma – videti sledeći Odeljak). Napravite gore navedena (ili slična) razblaženja hemolizata.

Odmerite 10 mL ohlađenog acetonskog rastvora u kivetu i dodajte pažljivo, u malim kapima, 0,5 mL hemolizata u vodi. Posmatrajte kako pada talog globina. Kivetu prenesite u zamrzivač, a postupak ponovite sa razblaženim rastvorima hemoglobina koje ste pripremili. Ostavite kivete u zamrzivaču, dok se globin lepo ne istaloži (maksimalno 1 sat), a potom odvojite talog globina, centrifugovanjem u laboratorijskoj centrifugi. Acetonski supernatant odbacite, a talog globina isperite ohlađenim acetonom, ponovo odvojite centrifugovanjem, zatim rastvorite u 1 - 2 mL destilovane vode i dijalizujte, po potrebi, naspram 0,1 % sirćetne kiseline. Rastvor globina može da se čuva zamrznut, a može i da se liofilizuje. Odredite koncentraciju globina u rastvoru na osnovu merenja apsorbanse na 280 nm, a njegovu čistoću na osnovu merenja apsorbanse koja potiče od hema na 405 nm (A_{405}/A_{280} oko 0,1 znači da je 1 % hema prisutno).

Kada ste našli optimalno razblaženje za taloženje globina, postupak ponovite sa rastvorima Hb u 1 % i 10 % NaCl.

Prikažite eksperiment i dobijene rezultate u obliku tabele. Objasnite zašto se eksperiment izvodi na tako niskoj temperaturi. Izvedite zaključke na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka i prokomentarišite (objasnite) dobijene rezultate.

(c) Interakcije hemoglobina sa kiseonikom (apsorpcioni spektri hemoglobina)

U okviru ove vežbe ćete pripremiti oks-, dezoksi- i met- hemoglobin, snimiti njihove apsorpcione spektre i uporediti ih sa spektrima iz literature. Pod oks-hemoglobinom se podrazumeva Hb za koji je vezan kiseonik, dezoksi-hemoglobin je Hb bez vezanog kiseonika, a methemoglobin je Hb u kojem je Fe^{2+} iz hema oksidovano u Fe^{3+} .

Materijal:

Koncentrovani rastvor hemoglobina (hemolizat eritrocita),
Stoksov reagens (2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i 3 g vinske kiseline rastvoriti u 0,1 L vode),
28 % amonijak,
0,2 % kalijumfericijanid

OksiHb: 5 ml rastvora Hb (iz hemolizata) i 1 ml vode.

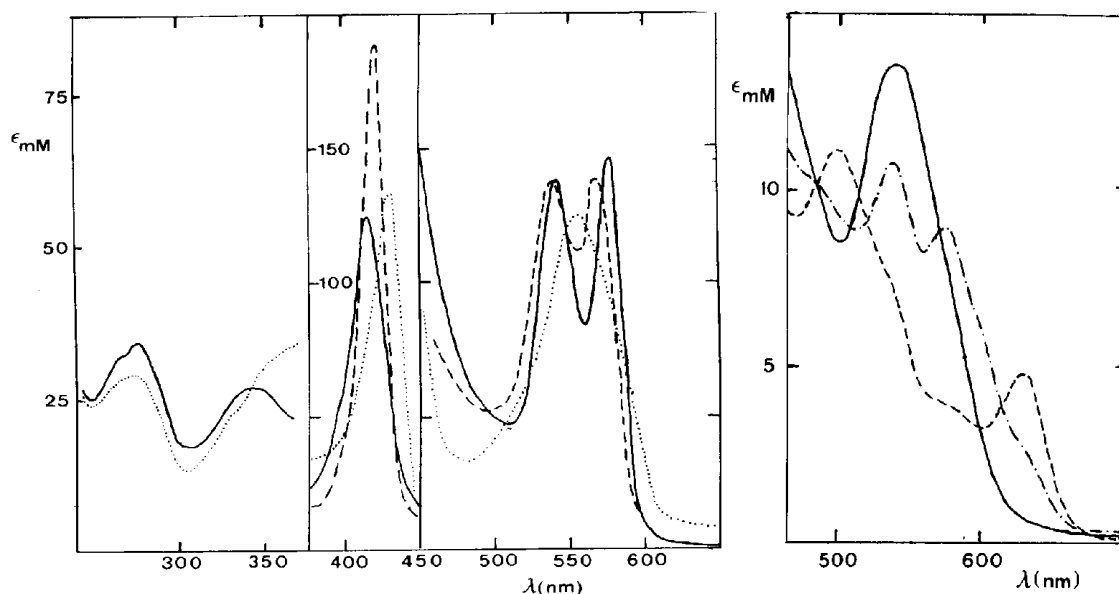
DezoksiHb: U 5 ml rastvora oksihb dodajte 1 ml amonijačnog Stoksovog reagensa (pravi se tako što se u 2 ml Stoksovog reagensa dodaje amonijak u kapima dok se ne dobije jasno zelena boja, koja se pri daljem dodavanju amonijaka ne menja), koji je prethodno razblažen istom zapreminom vode. Ovaj rastvor dobro promućkajte i ostavite u zatvorenoj epruveti tokom 30 minuta, pre nego što počnete da snimate spektar.

MetHb: U 5 ml rastvora oksihb dodajte 1 ml 0,2 % kalijumfericijanida i dobro promućkajte.

Prikažite hemijske reakcije za dobijanje dezoksi- i met-hemoglobina. Fotokopirajte dobijene spektre i zalepite ih u svesku. Uporedite dobijene spektre sa literaturnim (videti dole). Navedite da li su spektri identični ili ima nekih razlika. Ukoliko ima razlika komentarišite ih i dajte (moguće) objašnjenje.

Spektrofotometrijski podaci za derivate humanog hemoglobina:

	λ_{max} (nm)	ϵ (mM)	λ_{max} (nm)	ϵ (mM)	λ_{max} (nm)	ϵ (mM)	λ_{max} (nm)	ϵ (mM)	λ_{max} (nm)	ϵ (mM)		λ_{max} (nm)	ϵ (mM)	λ_{max} (nm)	ϵ (mM)	$\Delta \lambda_{\text{max}}$ (nm)
DeoxyHb	555	12.5	—	—	430	133	—	—	—	—	Hb ⁺ (OH ⁻)	575	9.2	540	11.0	35
OxyHb	541	13.5	576	14.6	415	125	344	27	276	34.4	Hb ⁺ (CN ⁻)	—	—	540	12.5	—
HbCO	540	13.4	569	13.4	419	191	344	28	—	—	Hb ⁺ (N ₃ ⁻)	575	9.9	540	12.8	35
HbNO	545	12.6	575	13.0	418	130	—	—	—	—	Hb ⁺ (imidazole)	560	12.5	534	14.7	26
HbEIC	530	14.4	559	17.3	428	193	—	—	—	—	Hb ⁺ (formate ⁻)	620	12.5	496	9.2	124
HbNB	562	14–15	542	13.1	422	154	—	—	—	—	Hb ⁺ (H ₂ O)	631	4.4	500	10	131
											Hb ⁺ (F ⁻)	605	10.9	483	10.3	122



Apsorpcioni spektri humanog:

Oksi-hemoglobina —————
 Dezoksi-hemoglobina
 Karbomonoksi-hemoglobina -----

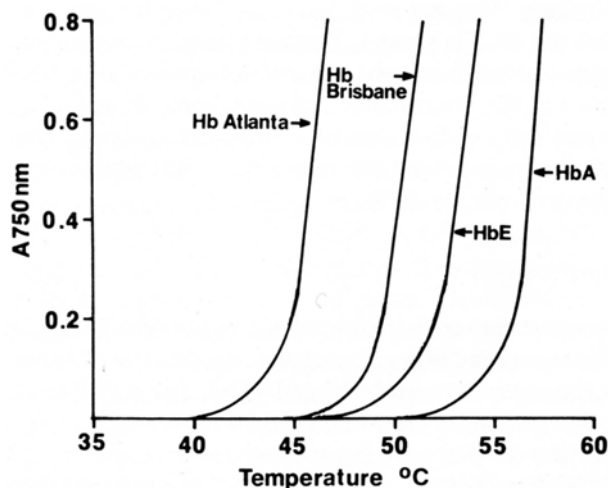
Apsorpcioni spektri humanog:

methemoglobina, kiselo pH ----
 methemoglobina alkalno pH - - - -
 cijan-methemoglobina ———

(d) Ispitivanje termalne stabilnosti methemoglobina

Oko dve trećine mutacija u molekulu hemoglobina predstavljaju izmene nepolarnih, nenaelektrisanih aminokiselinskih ostataka, tako da se ove mutacije ne mogu detektovati elektroforetskim tehnikama. S druge strane pošto se radi o nepolarnim ostacima koji se nalaze u unutrašnjosti molekula hemoglobina ili na dodirnim površinama između subjedinica Hb, ovakve izmene će se reflektovati na stabilnost molekula hemoglobina (Zašto?). Ovakve mutacije daju razne kliničke slike za koje se uzrok ne može naći dok se ne uradi test stabilnosti hemoglobina. Pod nestabilnošću se ovde podrazumeva sklonost hemoglobina ka termalnoj denaturaciji koja se reflektuje flokulacijom i taloženjem uzorka Hb. Za određivanje termalne stabilnosti hemoglobina razvijen je veći broj standardnih testova koji se koriste u hematološkim kliničkim laboratorijama u kojima se ispituju hemoglobinopatije. Prvi test koji se koristio u kliničkoj praksi bio je zagrevanje rastvora hemoglobina na 50°C tokom 2 sata. Dodatkom 17% (v/v) izopropanola vreme potrebno za denaturaciju hemoglobina se znatno skraćuje (Zašto?)

Termalna denaturacija **methemoglobina** je reproduktivna i odvija se na karakterističnoj temperaturi za svaki mutant hemoglobina. Na osnovu precipitacione krive (videti donju sliku) methemoglobina može se nepogrešivo odrediti koji je mutant hemoglobina u pitanju.



Slika: Krive taloženja methemoglobina u zavisnosti od temperature

Postupak

Test se izvodi sa 0.1% **methemolizatom** koji se priprema na sledeći način: 0.4 mL 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ se doda u 0.6 mL hemolizata koncentracije 10g Hb/ dL i ostavi na sobnoj temperaturi tokom 15 minuta. Zatim se u ovaj rastvor doda 3 mL 0.1 M EDTA i sve razblaži do 60 mL sa 0.067 M fosfatnim puferom pH 7.4. Alikvoti od po 3 mL se inkubiraju tokom 10 minuta na temperaturama od 37°C do 60°C. **Polazeći od toga da imamo normalni Hb i od podataka sa gornje slike u kojem temperaturskom intervalu biste ispitivali stabilnost vašeg uzorka Hb?**

Zadatak 2: Izolovati fikobilinske proteine iz Spiruline i ispitati denaturaciju dobijenog preparata ureom:

- (a) **Upoznajte** se bliže sa cijanobakterijom *Spirulina* i strukturom i funkcijom fikobilinskih proteina korišćenjem Interneta i preporučenih udžbenika iz biohemije. Od podataka do kojih ste došli I koje smatrate prikladnim/zanimljivim formirajte kraći UVOD za ovu vežbu (prikažite u beloj svesci!)
- (b) **Izolujte** fikobilinske proteine,
- (c) **Ispitajte** (reversibilnu) denaturaciju izolovanih proteina ureom.

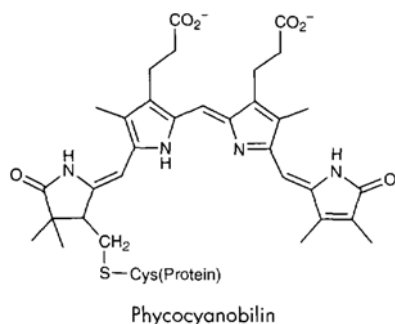
Zadatak 2a (opciono): Koncipirati eksperimente I detaljnije ispitati denaturaciju/renaturaciju fikobilinskih proteina.

NAPOMENA: Ova vežba je koncipirana na osnovu: R.Bowen et al., "A simple protein purification folding experiment for general chemistry laboratory", J.Chem.Ed. 77, 1456 (2000). Značajan doprinos u pripremi ove vežbe je dala Milica Milenković, student IV godine hemije i III godine biohemije (šk. 2007/2008 g.) na Hemijskom fakultetu.

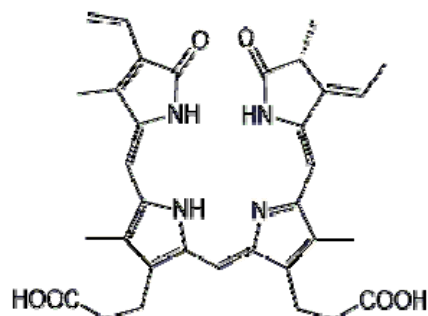
Cijanobakterija *Spirulina* sadrži fikobilinske proteine koji apsorbuju svetlost talasnih dužina 500-650 nm. Ovi proteini su rastvorni u vodi i stabilni su u rastvoru na sobnoj temperaturi. U ćelijama *Spiruline* se nalaze dva fikobilinska proteina: fikocijanin i alofikocijanin, koji predstavljaju glavne komponente takozvanih antena za žetvu svetlosti („light-harvesting antenna“). Ova dva fikobilinska proteina sadrže tetrapirolnu hromoforu - fikocijanobilin koji je kovalentno vezan za protein tioetarskom vezom preko cisteina. Boja ove hromofore zavisi

od njenog okruženja. U nativnoj konformaciji hromofora zauzima linearnu konformaciju (A), stabilizovanu vodoničnim vezivanjem sa bočnim grupama u proteinu. Kada se odstrani molekul proteina hromofora zauzima cikličnu konformaciju (B):

A)



B)



Nativni fikocijanin apsorbuje svetlost u intervalu talasnih dužina 620-630 nm, dok alofikocijanin ima apsorpcioni maksimum na 650 nm. Umesto apsorbance u vidljivoj oblasti hromofora u cikličnoj konformaciji apsorbuje na oko 370 – 380 nm. Zbog ove osobine hromofora može da služi kao „reporter“ celovitosti strukture ovih proteina. U nativnoj konformaciji protein ima divnu tamno plavu boju, koja blede kada se protein razvije!!! Pored apsorpcione spektroskopije denaturacija proteina može da se prati i merenjem fluorescence. Čak i na dnevnoj svetlosti (ili na primer ako se rastvor proteina stavi ispod jačestone lampe!!) nativni protein u rastvoru fluorescira crveno, što će izbledeti (izgubiti se) pri razvijanju proteina.

U ovom eksperimentu ćete prvo ekstrahovati fikobilinske proteine iz *Spiruline*, potom ćete posmatrati dobijeni rastvor na dnevnoj svetlosti, ispod stone i UV lampe, potom ćete protein denaturisati pomoću uree i pratiti njegovu renaturaciju nakon razblaživanja i/ili dijalize rastvora. Proces denaturacije/renaturacije ćete pratiti „golim okom“ i snimanjem apsorpcionih spektara.

Materijal

Spirulina (kupuje se u prodavnicama „zdrave hrane“)

Kvarcni pesak

Avan

Čaše 100 mL, epruvete

5 mM natrijum azid (ako se stvori proteina čuvaju nekoliko nedelja)

Urea

0.5 M kalijum fosfatni pufer pH 7

Laboratorijska centrifuga

Crevo za dijalizu

UV lampa

UV/VIS spektrofotometar

Postupak

Homogenizovati 3,0 g *Spiruline* sa 3,0 g kvarcnog peska u avanu. Smešu prebaciti u staklenu čašu i dodati 50 ml destilovane vode, a zatim dobro promešati staklenim štapićem. Talog od

rastvora odvojiti centrifugiranjem na 3 000 obrtaja/min u toku 10 min. Nakon završetka centrifugiranja supernatant u kome se nalaze rastvorni fikobiliproteini odvojiti dekantovanjem od taloga. Ekstrakt fikobiliproteina je zelenoplave boje i fluorescira crveno.

Razblažiti 5,00 ml koncentrovanog ekstrakta sa 20,0 ml destilovane vode (Rastvor 1) . Od rastvora 1 uzeti alikvot od 2,00 ml i dodati mu 3,00 ml destilovane vode (Rastvor E). Uočiti boju ovog rastvora i snimiti njegov UV/VIS spektar. Pripremite rastvor denturisanog proteina (Rastvor D): u epruveti rastvoriti 1,8 g uree u 3,00 ml destilovane vode, a potom u ovaj rastvor uree dodati 2,00 ml rastvora 1 (*koncentracija uree u rastvoru je ?????*). Uporedite boju rastvora D sa bojom rastvora E. Uočavate li razliku? Snimite UV/VIS spektre rastvora D.

Polovini ukupne zapremine rastvora D dodajte 0,5 M kalijum-fosfatni pufer pH=7 do promene boje rastvora. Snimite UV/VIS spektar i za ovaj rastvor. Uporedite UV/VIS spektre ova tri rastvora i uočite promene u apsorpciji. Alternativno, izvršite dijalizu rastvora D naspram 0.5 M kalijum fosfatnog pufera.

Vežba 6 Uvod u bioinformatiku

Cilj vežbe je da se upoznate sa dolaženjem do literaturnih (bibliografskih) i strukturnih podataka o proteinima putem Interneta.

PRIPREMA VEŽBE: Rezimirajte/navedite sve proteine sa kojima ste se do sada u okviru vežbi sreli. Navedite proteine koje smo najviše pominjali/obrađivali u okviru predavanja. Rezimirajte šta ste do sada o strukturi, aktivnosti&svojstvima, aktivnosti i funkciji ovih proteina naučili. Izdvojite proteine koje biste želeli bliže da upoznate. Ponovite gradivo koje se odnosi na 3-D strukturu proteina koje smo do sada obrađivali. Pripremite pitanja za teorijske vežbe. *U okviru ulaznog testa za ovu vežbu biće obuhvaćeno gradivo sa SVIH dosadašnjih vežbi (znači obnavljanje i utvrđivanje!!!)*

UVOD

Računar je postao esencijalno oruđe u biohemijskim istraživanjima. Računar se rutinski koristi za obradu teksta, sakupljanje i analizu podataka. Pored toga, ako je računar povezan sa Internetom može da se koristiti za pretraživanje literature, za nalaženje podataka o sekvencama proteina i nukleinskih kiselina, njihovoj strukturi, predviđanju strukture proteina i dolaženje do potrebnih metodoloških protokola. Od biohemijskih bibliografskih servisa koji su besplatni na Internetu najpoznatiji je MEDLINE (PubMed) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Dobro poznavanje rada na računaru, korišćenje programa i Interneta je izuzetno važno kako za vaše obrazovanje tako i za buduću karijeru.

U najširem smislu pod **bioinformatikom** se podrazumeva svaka primena računara u obradi bioloških informacija. U praksi, definicija koju koristi većina istraživača je uža, **bioinformatika** je sinonim za “kompjutersku molekularnu biologiju” – korišćenje računara za karakterisanje molekulskih komponenti živih bića. Sa definicijama bioinformatike i mogućnostima njene primene upoznaćete se detaljnije u okviru posebnog kursa na starijim godinama studije.

U prvo vreme novo-otkrivene sekvence proteina i nukleinskih kiselina su objavljivane u naučnim časopisima, što je ubrzo postalo nepraktično, a i mnogo je korisnije imati sekvence u kompjuterski dostupnom obliku. Sada istraživači direktno preko Interneta šalju podatke o sekvenci u odgovarajuće baze podataka koje su javno dostupne (Web adrese ovih baza su dati u donjoj tabeli, a mogu se naći u najnovijim udžbenicima iz biohemije kao što je Voet!!). U okviru bioinformatike su razvijena oruđa (metode) za čuvanje, pretraživanje i analizu podataka o sekvenci proteina i nukleinskih kiselina. Kao što smo videli poređenjem aminokiselinskih sekvenci homologih proteina dolazimo do važnih podataka o tome koji su aminokiselinski ostaci esencijalni za funkciju datog proteina kao i do evolucionih odnosa među proteinima. Pošto su proteini kodirani nukleinskim kiselinama do sličnih podataka dolazimo analizom njihovih sekvenci. Ako su sekvence dva proteina ili nukleinske kiseline vrlo slične možemo “golim okom” da ih analiziramo i uočimo razlike. Za poređenje sekvenci proteina koji su toliko međusobno udaljeni da sličnosti u njihovim sekvencama nisu više očigledne, kao i za konstruisanje filogenetskih stabala razvijene su posebne kompjuterske tehnike. Ukoliko budete zainteresovani, možete se uz pomoć asistenta ukratko upoznati sa ovim tehnikama.

Podjednako važan deo bioinformatike sa kojim ćete se nešto bliže upoznati (u delu koji se odnosi na proteine) u okviru ove vežbe jeste kako se trodimenzionalne (3-D) strukture makromolekula prikazuju i porede. Atomske koordinate poznatih struktura makromolekula se pohranjuju (čuvaju) u bazama podataka kao što je “**Protein Data Bank**” (PDB). PDB baza sadrži atomske koordinate za strukture preko 20 000 makromolekula (proteina, nukleinskih kiselina i ugljenih hidrata, koje su određene metodama difrakcije x-zraka i drugim difrakcionim tehnikama, pomoću NMR-a, elektronske mikroskopije i teorijskog modelovanja). Web adrese ovih baza su date u donjoj tabeli, a mogu se naći u najnovijim udžbenicima iz biohemije (Voet!).

Biohemijske baze podataka		
Naziv	Opis	URL
Proteinska baza podataka (Protein Data Bank (PDB))	Strukture proteina odedene difrakcijom x-zraka i NMR-om	http://www.rcsb.org/pdb/
Evropski Institut za Bioinformatiku (EBI)	DNA sekvence	http://www.ebi.ac.uk/
Švajcarska proteinska baza podataka	Sekvence i analiza	http://www.expasy.ch/tools/
Institut za istraživanje genoma	Zbirka baza podataka o genomu	http://www.tigr.org/
RasMol (RasMac)	Molekulska grafika proteina	http://www.umass.edu/microbio/ras/mol/
Predviđanje proteina	Predviđanje sekvence i strukture proteina	http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/
Gen-kviz	Analiza funkcije proteina na osnovu sekvence	http://www.sander.ebi.ac.uk/gqsrvc/submit

ZADATAK: Pronaći na Internetu podatke o proteinu/proteinima sa kojima ste se sreli na dosadašnjim vežbama (izbor napraviti u dogovoru sa asistentom). Ukratko prikazati/opisati u beloj svesci podatke do kojih ste došli (i po potrebi postupak koji ste koristili!).

Vežba 7 Izolovanje i spektralna karakterizacija DNK

Cilj vežbi koje slede je da se bliže upoznate sa principima izolovanja, karakterisanja i osobinama DNK.

PRIPREMA VEŽBE: Koristeći materijal sa predavanja i tamo datu literaturu naučite osnovne činjenice o strukturi nukleinskih kiselina, obraćajući naročito pažnju na strukturu (primarnu i sekundarnu) i veličinu molekula DNK i organizaciju (nalaženje) DNK u prokariotskoj i eukariotskoj ćeliji. Upoznajte se sa principima izolovanja i karakterisanja DNK koji su dati kako u ovom Praktikum, tako i u Dodatku u ovu vežbu. Predložite biološki materijal iz kojeg biste želeli da izolujete DNK. Rezimirajte i objasnite eksperimentalni postupak. Pripremite pitanja za teorijske vežbe.

UVOD: Principi izolovanja DNK

Polazni materijal za izolovanje DNK su ćelije (tkivo) ili prethodno izolovana jedra. Opšti principi izolovanja DNK su isti kao i za druge biomakromolekule. To su:

- 1) razaranje membrane, odnosno ćelijskog zida (kod bakterija i biljaka), da bi ekstrakcija makromolekula bila moguća,
- 2) rad pod uslovima pri kojima će doći do inhibicije ili denaturacije hidrolitičkih enzima, koji se oslobađaju pri razaranju ćelije,
- 3) frakcionisanje ekstrakta postupkom koji će dati željeni makromolekul.

Ukratko ćemo opisati neke od specifičnosti ove opšte šeme kada se primenjuje za izolovanje DNK.

Pri izboru polaznog materijala treba imati u vidu da svaki sistem nije podjednako pogodan za ekstrakciju DNK. Neka tkiva imaju visok sadržaj dezoksiribonukleaze, što zahteva uvođenje posebnih predostrožnosti da bi se sprečila hidroliza DNK tokom procesa izolovanja. U nekim tkivima je sadržaj proteina, RNK i polisaharida u odnosu na DNK visok, a u nekim su interakcije između proteina i DNK tako jake da je ekstrakcija DNK znatno otežana. Za mikroorganizme je karakteristično prisustvo ćelijskog zida koji treba prethodno razoriti, da bi liziranje ćelije i izolovanje ćelijskih komponenti i/ili nukleinskih kiselina uopšte bilo moguće. Za biljna tkiva je pored ćelijskog zida karakteristično i prisustvo celuloznih vlakana, što takođe komplikuje homogenizaciju. Izolovanje DNK iz biljaka otežano je i prisustvom fenolnih jedinjenja, koja reaguju i interaguju sa proteinima i DNK, te ih stoga treba, primenom specifičnih postupaka, odstraniti u najranijim fazama izolovanja. Za izolovanje DNK kao najpogodniji materijal pokazao se timus (i to goveđi koji je lako dostupan), jer ima nizak sadržaj dezoksiribonukleaze, kao i visok odnos sadržaja DNK prema drugim ćelijskim komponentama. Za izolovanje DNK iz drugih tkiva (npr. jetre pacova) najbolje je koristiti izolovana jedra (pazeći da se pri izolovanju jedara spreči dejstvo dezoksiribonukleaze).

Osnovni problem kod izolovanja DNK je veličina odn. dužina ovog molekula (setimo se kolika je i kako izgleda hromozomska DNK), koji se u postupku izolovanja, pod uticajem fizičke sile (homogenizacija tkiva, energičnije mešanje u raznim fazama izolovanja, pipetiranje i sl.), cepa na manje fragmente. Stoga je postupcima koji se uobičajeno koriste za izolovanje DNK (koje ćemo i mi koristiti), praktično nemoguće dobiti intaktni (ceo) molekul DNK, ali se pažljivim radom mogu dobiti fragmenti velike molekulske mase (oko 10^7 Da),

koji su sasvim pogodni za niz istraživanja. Posebnim postupcima, koji su opisani u literaturi, moguće je dobiti i veće fragmente. Pored toga treba imati u vidu i uslove pod kojima je ovaj molekul stabilan: sekundarna struktura DNK je stabilna u rastvoru čiji je pH u intervalu 4 - 10, a koncentracija soli najmanje 0,1 M. Fosfodiesterne veze su stabilne u intervalu pH 3 - 12. Izvan tog intervala dolazi do hidrolize.

Prva faza u izolovanju DNK je homogenizacija tkiva i liziranje ćelija (ako se prethodno ne izoluju jedra). Kod bakterija i biljaka potrebno je razoriti i ćelijski zid, što se postiže dejstvom mehaničke sile, ultrazvuka (sonifikacija), ili dejstvom specifičnih enzima (npr. lizozima, koji hidrolizuje ćelijski zid mikroorganizama). Kada je ćelijski zid razoren ("oslabljen") ćelije se lako liziraju u hipotonom rastvoru. Liziranje se dovršava (pospešuje) dodatkom SDS-a, koji razara ćelijsku membranu. SDS istovremeno denaturiše nukleaze i time ih čini neaktivnim. Aktivnost nukleaza sprečava se i dodatkom EDTA (etilendiamin-tetrasirćetne kiseline), koja se kompleksira sa dvovalentnim katjonima potrebnim za aktivnost nukleaza. Neki autori predlažu i ispiranje svih staklenih sudova sa kojima će da se radi sa 1 mM rastvorom EDTA. Aktivnost nukleaza sprečava se i radom na hladno (4° C) i visokim pH rastvora.

Hromozomska DNK nalazi se u hromatinu u obliku složenog kompleksa sa baznim proteinima (histonima), kao i drugim proteinima i RNK, koji imaju određenu funkciju u složenim procesima vezanim za DNK. Disocijacija proteina od DNK postiže se pomoću visoke koncentracije anjona (1 M NaClO₄ ili 1 M NaCl) i dodatkom SDS. Treba imati u vidu da se disocijacija proteina iz hromatina i DNK kod svih ćelija ne odvija sa podjednakom lakoćom. Proteini se potom denaturišu i koagulišu dodatkom fenola i/ili smese hloroform-izoamilalkohol i odvajaju centrifugovanjem. Hloroform vrši denaturaciju, a izoamilalkohol sprečava penušanje i omogućuje da se dobije bolji sloj denaturisanih proteina, koji se lakše odvaja centrifugovanjem. Treba imati u vidu da u ovoj fazi (zbog mućkanja i mešanja) najviše dolazi do fragmentacije DNK.

DNK se iz preostalog rastvora (posle odvajanja proteina) taloži pomoću etanola što treba naročito pažljivo (i sa ljubavlju!) izvesti, jer ako se etanol nepažljivo doda dobija se nerastvorni talog DNK i propušta se sva lepota eksperimenta. Taloženje DNK vrši se naročitom tehnikom tako što se vodeni rastvor DNK pažljivo presloji sa 2 zapremine etanola, a potom se pažljivim mešanjem pomoću staklenog štapića na međufazi izaziva namotavanje končića DNK na štapić. I u ovoj fazi može doći do fragmentacije DNK.

Ovako se dobija sirovi preparat DNK, koji se ispere u etanolu, a potom rastvori u puferu (voda je slab odn. nikakav rastvarač za DNK!), ili se čuva u etanolu. Dalje prečišćavanje DNK (odstranjivanje RNK i proteina) postiže se dejstvom ribonukleaze (koja hidrolizuje RNK) i pronaze (smesa bakterijskih nespecifičnih proteolitičkih enzima, koji hidrolizuju ostatke evt. prisutnih proteina). I pored pažljivog prečišćavanja, u preparatima ovih enzima zapaženo je i prisustvo DNK-aza. Njihovo dejstvo se sprečava (DNK-aze se deaktiviraju) tako što se rastvori ovih enzima pre dodavanja u rastvor DNK preinkubiraju pod određenim uslovima.

U literaturi postoji veći broj radova koji se odnose na izolovanje DNK. Posebno treba istaći rad J. Marmur-a iz 1961. godine (J. Mol. Biol. 3:208) u kojem je ova metodologija detaljno ispitana i opisana (na primeru mikroorganizama). Ovaj postupak je (sa raznim modifikacijama) još uvek u upotrebi i mi ćemo se na ovim vežbama sa njim upoznati. U novije vreme se na Internetu mogu naći jednostavni postupci za izolovanje DNK iz raznog biološkog materijala koji su bazirani čak na "kuhinjskoj hemiji" (videti Dodatak!)

ZADATAK: Izolovati preparat DNK iz odabranog biološkog materijala primenom “regularnog” i uprošćenog (kuhinjska hemija!) postupka; odrediti koncentraciju DNK u dobijenim preparatima, njihovu homogenost u odnosu na proteine i RNK i ispitati ponašanje dobijenih preparata DNK pri zagrevanju. Na osnovu dobijenih rezultata uporedite postupke koje ste koristili, istaknite njihove prednosti i nedostatke.

Izolovanje DNK iz biljaka

Materijal:

5 g biljnog tkiva (suvih, hemijski i termički netretiranih, pšeničnih klica),
 Pufer za homogenizaciju (0,1 M NaCl i 50 mM EDTA u 10 mM Tris-HCl, pH 7,8),
 10 mM Tris-HCl, pH 7,4,
 5 M NaClO₄,
 10 % SDS,
 Predestilovani fenol zasićen 10 mM Tris-HCl puferom pH 7,4, kome je dodato 0,2 % 8-hidroksihinolina,
 Smeša hloroforma i izoamilalkohola 24:1 (v/v),
 96 % etanol,
 Etar,
 Rastvor RNK-aze (1,5 mg/mL pufera), preinkubiran 10 minuta na 90° C,
 Rastvor pronaze (5 mg/mL pufera), preinkubiran 2 sata na 37° C,
 Tečni azot,
 Magnetna mešalica, centrifuge, avan sa tučkom, epruvete, pipete, erlenmajeri.

Postupak:

Biljno tkivo (zaleđeno u tečnom azotu) homogenizuje se u avanu sa tučkom, uz dodavanje tečnog azota u malim porcijama. Kada azot potpuno ispari dodaje se pufer za homogenizovanje (2,5 mL/g tkiva) i što brže, ali dobro, tkivo suspenduje u njemu. U suspenziju se potom dodaje rastvor za liziranje (8,2 mL/g tkiva), koji se sastoji od 7 zapremina pufera za homogenizovanje i 2 zapremine 10 % SDS-a. Zatim se dodaje rastvor pronaze (0,8 mL/g tkiva) i ova suspenzija se meša na magnetnoj mešalici 1 sat na 37° C. Ukoliko se (u dogovoru sa asistentom!) preparat radi bez dodatka rastvora pronaze suspenzija se meša na magnetnoj mešalici 1 sat u ledenom kupatilu. U suspenziju se zatim doda rastvor NaClO₄ (1/10 od ukupne zapremine) i sve se dobro promeša na magnetnoj mešalici tokom 10 minuta..

Deproteinizacija ovog rastvora vrši se mućkanjem sa jednakom zapreminom fenola zasićenog puferom tokom 15 minuta, na magnetnoj mešalici (u kapeli!). Zatim se dodaje ista zapremina smese hloroforma i izoamilalkohola, mućkanje nastavi tokom još nekoliko minuta i slojevi odvoje centrifugovanjem, tokom 5 minuta na 10.000 obr./min., ili 15 minuta na 4.000 obr./min. Gornja vodena faza odvoji se pipetom i prenese u sud u kojem se već nalazi ista zapremina rastvora hloroforma i izoamilalkohola. Postupak deproteinizacije ponavlja se, kao što je to napred opisano, najmanje 3 puta, ili dok se u međufazi više ne nalaze denaturisani proteini. Na kraju se ovaj rastvor ohladi u ledu i organski rastvarači ekstrahuju se, nekoliko puta, ohlađenim etrom.

Jedan deo rastvora (2-3 mL) odvoji se za spektralnu karakterizaciju DNK, a iz preostalog rastvora DNK se taloži pažljivim preslojavanjem sa 2 zapremine 96 % etanola i namotavanjem končića DNK na štapić u međufazi. DNK može da se čuva u obliku taloga u etanolu, ili u rastvoru nekog pogodnog pufera, uz dodatak par kapi hloroforma (u oba slučaja u frižideru).

Odvajanje prisutne RNK i proteina vrši se inkubiranjem sa RNK-azom (150 $\mu\text{g/mL}$) tokom 1 sata i pronazom (250 $\mu\text{g/mL}$) tokom 2 sata. Postupak deproteinizacije i taloženja DNK zatim se još jednom ponovi.

Izolovanje DNK iz animalnog tkiva

Materijal:

Animalno tkivo (pileća jetra, jetra pacova ili goveđa slezina),
CS pufer (9 mg NaCl/mL, 10 mM trinatrijumcitrat),
0,15 M Na-citrat, pH 7,0,
NaCl,
20 % SDS,
Smesa hloroforma i izoamilalkohola 24:1 (v/v),
96 % etanol,
Aceton,
Led, suvi led ili tečni azot,
"Waring blender", Potterov homogenizator ili avan, centrifuge, magnetna mešalica, čaše, epruvete, pipete.

Postupak:

Tkivo iz kojeg će se izolovati DNK isecka se i stavi u ohlađeni "Waring blender", doda se CS pufer (3,5 mL/g) i homogenizuje, uz prekide, 5 minuta na najvećoj brzini. Alternativno, tkivo zamrznuto u tečnom azotu ili suvom ledu, homogenizuje se u avanu, a zatim prenese u ohlađen Potterov homogenizer, u kojem se homogenizuje sa 10 "zaveslaja" tokom 5 minuta. Ceo postupak se izvodi na hladnom. Homogenat se zatim centrifuguje na 6500 o/min tokom 15 minuta, gornji lipidni sloj se ukloni pomoću špatule, a talog se ponovo prenese u mlin ili homogenizer i homogenizacija izvrši još jednom tokom 3 minute sa istom zapreminom pufera. Suspenzija se ponovo centrifuguje kao što je već opisano, a dobijeni talog se sada resuspenduje u 0,15 M Na-citratnom puferu pH 7,0 (6 mL/g početnog tkiva). Ova smeša se prenese u čašu odgovarajuće zapremine, stavi na magnetnu mešalicu i meša uz polagano dodavanje u kapima 20 % SDS-a (0,55 mL/g početnog tkiva). Suspenzija se nakon dodatka poslednje kapi SDS-a meša još 5 minuta. Za to vreme ona treba da postane veoma viskozna. Suspenzija se zatim meša na vodenom kupatilu na 55° C tokom daljih 15 minuta. U smešu se zatim doda čvrst NaCl (0,55 g NaCl/g početnog tkiva) i smeša meša dok se sav NaCl ne rastvori.

Suspenzija se ohladi u ledenom kupatilu do sobne temperature, a zatim se u nju doda ista zapremina smese hloroform-izoamilalkohol (24:1), nakon čega se nastavi sa mućkanjem tokom 10 minuta. Slojevi se odvoje centrifugovanjem na 10.000 o/min u toku 10 minuta, gornji vodeni sloj se prenese u drugu kivetu i proces deproteinizacije se ponovi. Postupak deproteinizacije se ponavlja sve dok se u međufazi javlja talog proteina, a zatim se DNK iz vodene faze taloži preslojavanjem sa 2 zapremine 96 % etanola, uz pomoć staklenog štapića,

na koji se zamotavaju končići DNK. Višak etanola odvoji se pritiskanjem o zid suda, a zatim se DNK rastvori u pogodnom puferu ili liofilizuje.

Izolovanje DNK iz crnog luka (uprošćen propis za izolovanje DNK!)

Navedeni postupak izolovanja DNK je modifikacija tzv. "Marmur" procedure, koja se koristi u svim svetskim biotehnološkim laboratorijama.

Materijal

1 M Tris pufer, pH 7,5-8,0

0,5 M rastvor EDTA

5 M rastvor NaCl

10 % rastvor SDS-a

Manja glavica crnog luka

95 % etanol (ohlađen)

Proteolitički enzimi: "Meat tenderizer" (1 g rastvoriti u 15 mL destilovane vode)

ili svež sok od ananasa ili papaje

„Blender“

Epruvete od 50 mL

Stakleni štapići, Pasterove pipete sa zakrivljenim vrhom

Postupak

Pripremiti 100 ml pufera za liziranje ćelija luka: pomešati 5 ml 1 M Tris-pufera, pH 7.5, 5 ml 0.5 M EDTA, 6 ml 5 M NaCl i 84 ml destilovane vode. Oljuštiti, iseći na manje komade pa samleti u „blenderu“ jednu manju glavicu crnog luka (da se dobije oko 50-75 ml smeše). Pomešati pripremljeni pufer za liziranje ćelija sa samlevenim lukom. Homogenizovati u blenderu oko 45 sekundi. Smešu profiltrirati kroz kvalitativni filter papir u u čašu od 250 ml.

Taloženje DNK: Odmeriti 10 ml filtrata luka u epruvetu od 50 ml i dodati 1 ml 10% SDS-a. Dodati 4 ml rastvora proteolitičkih enzima i ostaviti smešu da stoji u ledu 5 minuta. Polako, pipetom niz zidove epruvete, dodavati (preslojiti) 15-20 ml ledenog etanola. Ostaviti u ledu tokom 5 minuta, nakon čega bi trebalo da se vide mehurići i počne izdvajanje vlakana DNK. Da bi se postigli najbolji rezultati, trebalo bi ostaviti smešu da stoji u frižideru preko noći. Vlakna DNK se mogu izvaditi iz rastvora Pasterovom pipetom sa zakrivljenim vrhom ili staklenim štapićem.

Provera čistoće preparata DNK

Izmeriti apsorbancu rastvora preparata DNK na 260 nm (apsorbuju nukleinske kiseline) i na 280 nm (apsorbuju proteini) i odrediti odnos $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$. Odnos 1,8-1,9 pokazuje čistu DNK, odnos 1,9-2,0 pokazuje čistu RNK. Uzorak dobijen u eksperimentu je smeša DNK, RNK i proteina, pa se očekuje niži odnos apsorbanci.

Određivanje koncentracije DNK pomoću difenilamina

Princip metode:

Tretman molekula DNK sa kiselinama, uz zagrevanja, izaziva depurinaciju azotnih baza, hidrolizu estarskih veza između šećera i fosfata i dehidrataciju 2-dezoksi-D-riboze u ω -hidroksilevunilaldehid. Aldehid se kondenzuje sa difenilaminom, dajući plavo obojene proizvode sa apsorpcionim maksimumom na 595 nm.

Postupak:

Ispitivani uzorak DNK hidrolizovati u 10 % sirćetnoj kiselini, uz zagrevanje na 95° C, u vodenom kupatilu, 10 minuta. Alikvot (deo) uzorka se potom razblaži sa 2 dela vode, doda se 5 delova difenilaminskog reagensa (1 g difenilamina se rastvori u 100 mL glacijalne sirćetne kiseline, uz dodatak 2 mL koncentrovane sumporne kiseline) i dobro promeša. Rastvor se zagreva na ključalom vodenom kupatilu tačno 10 minuta. Apsorbanca ohlađenog rastvora meri se na 595 nm. Koncentracija DNK određuje se sa standardne prave, napravljene na osnovu apsorbaneci standarda 2-deoksi-D-riboze, u opsegu koncentracija 10 - 200 $\mu\text{g/mL}$.

Ispitivanje kontaminacije preparata DNK sa ostacima proteina

Prisustvo proteina u preparatu DNK možete da odredite primenom neke od metoda za određivanje koncentracije proteina sa kojima ste se već tokom ranijih vežbi sreli (izaberite metodu koju smatrate najpogodnijom).

Ispitivanje kontaminacije preparata DNK sa ostacima RNK

Za određivanje kontaminacije preparata DNK sa RNK preparat DNK se tretira sa 0,3 M NaOH tokom 60 minuta na 37° C. Zatim se DNK taloži dodatkom 10 % HClO_4 i talog odvoji centrifugovanjem. U supernatantu se meri apsorbanca na 260 nm ($A_{260} = 1,0$ odgovara koncentraciji RNK od 32 $\mu\text{g/mL}$). Na osnovu dobijenih rezultata izračunajte količinu RNK u rastvoru DNK i približni % RNK od prisutnih nukleinskih kiselina.

Alternativno koncentracije RNK u uzorku može da se odredi primenom orcinolnog reagensa:

Princip metode:

D-riboza iz molekula RNK daje s orcinolom obojeni kompleks (plavo-zelene boje), koji ima maksimum apsorpcije na 665 nm.

Postupak:

U 100 μL ispitivanog uzorka dodati 2 mL orcinolnog reagensa (0,3 g orcinola u 100 mL koncentrovane HCl, kojoj su dodate 4 kapi 10 % rastvora feri hlorida) i zagrevati 10 minuta na ključalom vodenom kupatilu. Uzorak se potom ohladi i nakon 15 minuta izmeri mu se apsorbanca na 665 nm. Standardi RNK (D-riboze) pripremaju se u opsegu koncentracija od 10 do 200 $\mu\text{g/mL}$.

Spektralna karakterizacija izolovane DNK

Pripremite rastvor DNK čija će apsorbanca na 260 nm biti 1,0 ili malo manja. Snimite spektar ovog rastvora, uočite njegove karakteristike i izračunajte odnos A_{260}/A_{280} . Uporedite ih sa odnosom za čistu DNK i procenite koncentraciju proteina u vašem preparatu. *Podaci na osnovu kojih ćete ovo moći da uradite nalaziće se u laboratoriji.* Pretpostavljajući da apsorbanca vašeg rastvora na 260 nm potiče samo od native DNK, izračunajte koncentraciju

DNK u Vašem rastvoru. Pretpostavljajući da se u polaznom tkivu nalazi 80 % vode (i da je prinos DNK koju ste izolovali kvantitativan) izračunajte % DNK u polaznom materijalu (na suhu težinu).

Zagrijte Vaš rastvor DNK na ključalom vodenom kupatilu tokom 15 minuta, naglo ga ohladite i ponovo izmerite A_{260} . Opišite i objasnite rezultate ovog eksperimenta, polazeći od strukturnih osobina DNK. Alternativno (u dogovoru sa asistentom) uradićete krive topljenja za sve izolovane preparate DNK, dobijene rezultate opisati, uporediti i uz pomoć asistenta izvući iz njih što više zaključaka o strukturi i osobinama izolovanih DNK.