

МЕТОДИ ЗА КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ПРОТЕИНИ

КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ПРОТЕИНИ

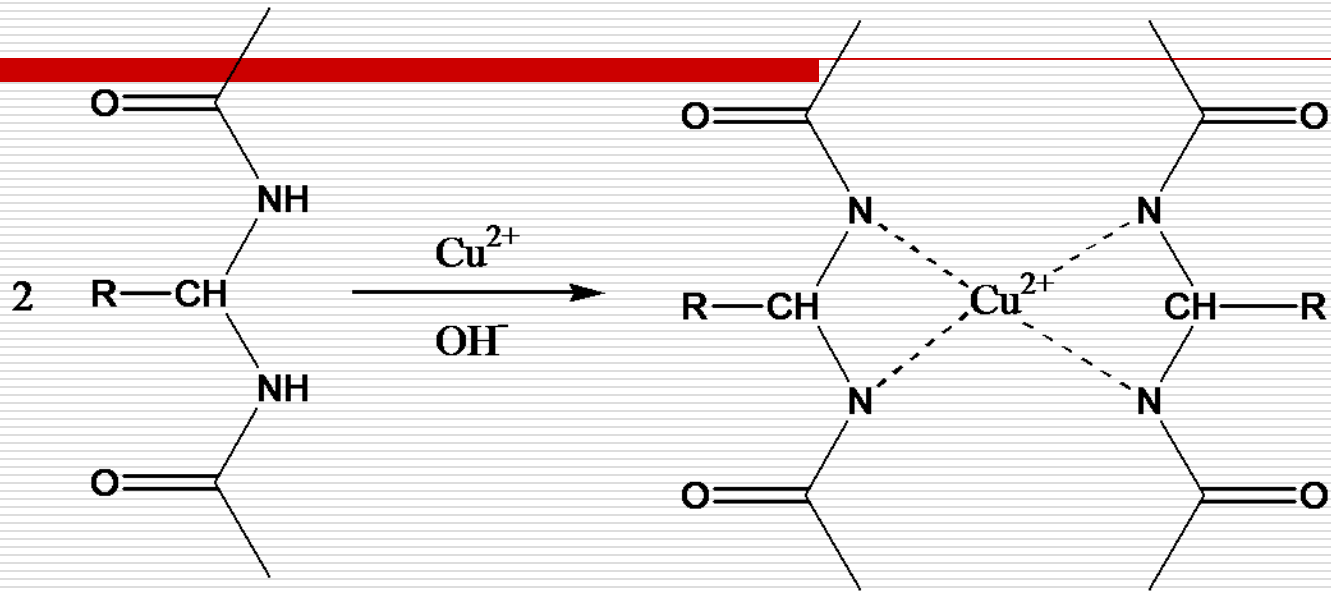
- Не постои единствена метода за квантитативно определување на протеини која дава задоволителни резултати во различни примероци.

 - Изборот на методата зависи од:
 - природата на протеинот,
 - природата на останатите компоненти во пробата со протеин,
 - бараната брзина,
 - точност и
 - репродуцибилност на методата.
-

Методи за определување на протеини

- ☐ Biuret-ски тест
 - ☐ Lowry-ева метода (Folin-Ciocalteu)
 - ☐ BCA (**B**icinchoninic **A**cid) метода
 - ☐ Bradford-ова метода преку образување врска со индикатор
 - ☐ Апсорпција на ултравиолетово зрачење
-

Biuret-ски тест



Пептидна низа

биуретски комплекс (пурпурна боја)

- ☐ Gornall, AG, CS Bardawill, and MM David. *J. Biol. Chem.* 177: 751. 1949.
- ☐ Layne, E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology* 10: 447-455. 1957.
- ☐ Robinson, HW and CG Hogden. *J. Biol. Chem.* 135: 707. 1940.
- ☐ Slater, RJ (ed.). *Experiments in Molecular Biology*. Clifton, New Jersey: Humana Press, 1986. P. 269.
- ☐ Weichselbaum, TE. *Am. J. Clin. Pathol. Suppl.* 10: 40. 1946.

Biuret-ски тест

Предности

- ☐ Репродуцибилност на методата
- ☐ Мал број компоненти покажуваат интерференција (пример се амониумовите соли)
- ☐ Отстапувањата се помалубројни одколку при Lowry-евата метода или методата на апсорпција на УВ зрачење

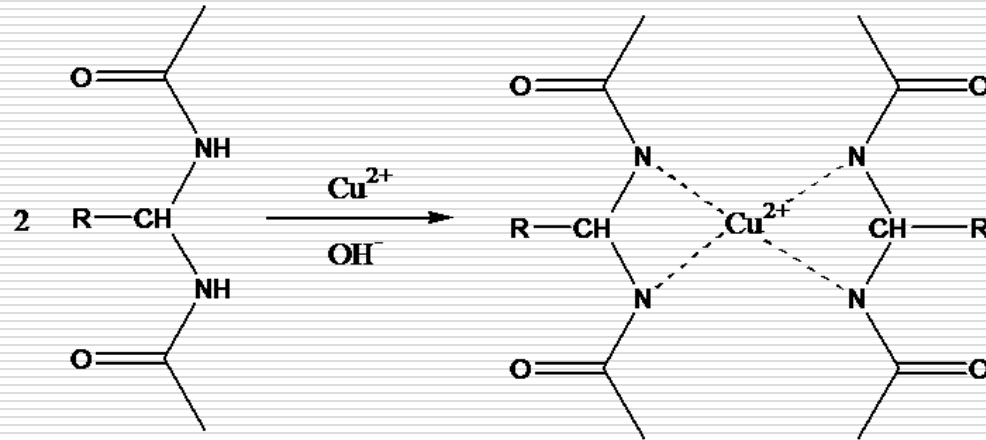
Недостатоци

- ☐ За анализата се неопходни примероци со поголемо количество протеин (1-20 mg)
 - ☐ Мала сензитивност
-

Biuret-ски тест

- ❑ Спектрофотометарот пред употреба се загрева 15 минути.
- ❑ Се приготвуваат разредувања на примерокот во пуфер, така што концентрацијата на протеинот да изнесува од 1 до 10 mg/mL. Се става 1 mL од пробата во секоја епрувета.
- ❑ Се приготвува серија стандардни раствори на bovine serum albumin, така што концентрацијата на протеинот да изнесува од 1 до 10 mg/mL. Со отчитување на апсорбанцата на бранова должина од 280 nm се конструира калибрациона крива. Се става 1 mL од стандардните раствори во секоја епрувета.
- ❑ Инструментот се калибрира со слепа проба пуфер.
- ❑ Кон секоја од епруветите се додаават 9 mL Biuret-ски реагенс, содржината веднаш се промешува и се остава да стои на собна температура во текот на 20 минути.
- ❑ Се отчитува апсорбанцата на бранова должина од 550 nm.

Lowry-ева метода



Tyrosine, Tryptophan & Cysteine
 —————→ Molybdenum/Tungsten blue
 Folin-Ciocalteu reagent
 (phosphomolybdate and phosphotungstate)

- ❑ Lowry, OH, NJ Rosbrough, AL Farr, and RJ Randall. *J. Biol. Chem.* 193: 265. 1951.
- ❑ Oostra, GM, NS Mathewson, and GN Catravas. *Anal. Biochem.* 89: 31. 1978.
- ❑ Stoscheck, CM. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69 (1990).
- ❑ Hartree, EF. *Anal Biochem* 48: 422-427 (1972).

Lowry-ева метода

Предности

- ☐ Анализите се изведуваат на собна температура.
- ☐ Методата се карактеризира со сензитивност во целото испитувано подрачје.
- ☐ Сензитивноста е 10 до 20 пати поголема од УВ детекцијата.
- ☐ Може да се изведува со микроколичества.

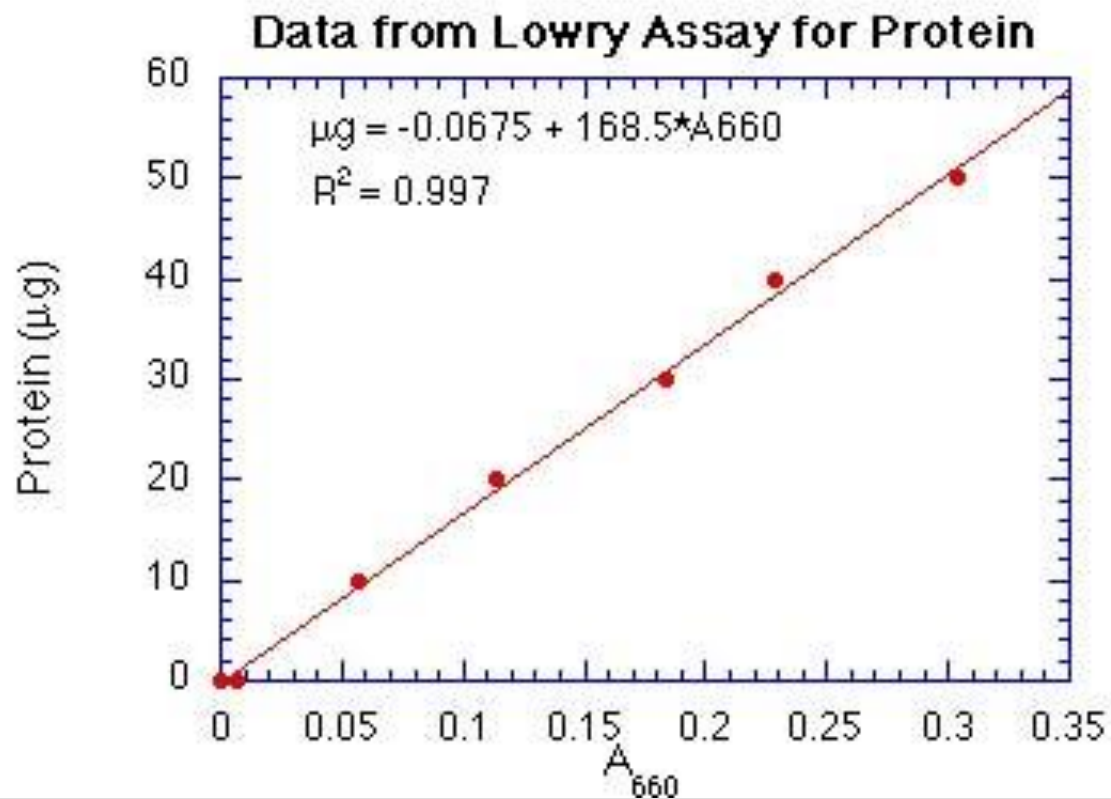
Недостатоци

- ☐ Многу супстанции присутни во примерокот интерферираат со реагенсот (пример: силни киселини, амониум сулфат).
- ☐ Потребно е значително време за изведување на анализата.
- ☐ Методата е фотосензитивна, поради што мора да се води сметка сите примероци да бидат подеднакво изложени на светлина.
- ☐ Количеството боја (интензитетот) е различно кај различни протеини.

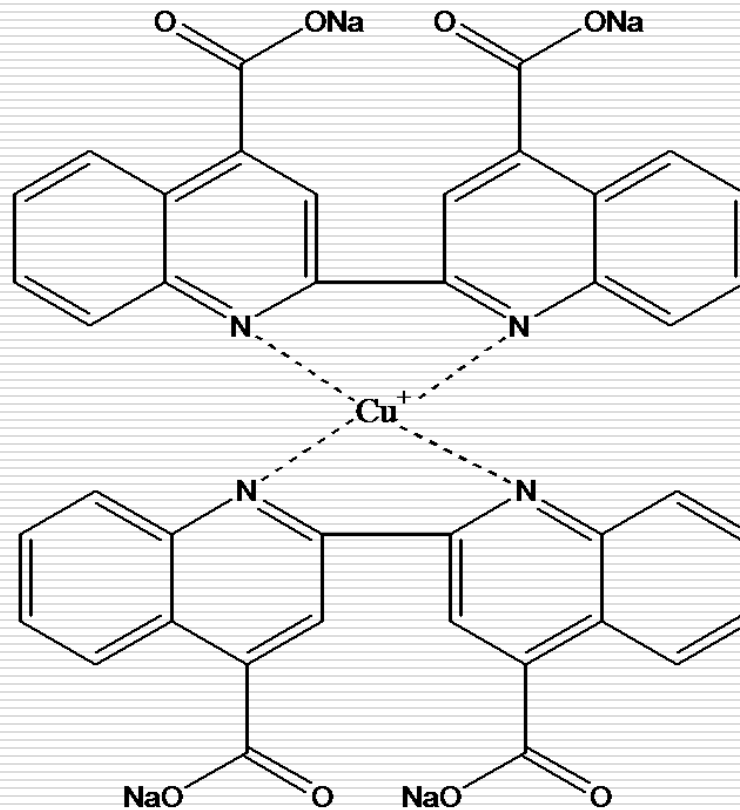
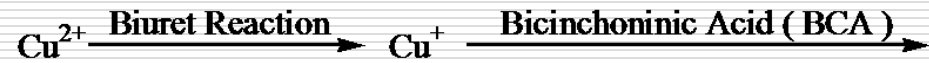
Lowry-ева метода

- ❑ Примерокот треба да содржи до 100 μg протеини.
 - ❑ Епруветите се дополнуваат со вода до вкупен волумен 1 mL.
 - ❑ Се приготвува смесата за анализа и соодветно разредување од Folin-Ciocalteu-ов реагенс.
 - ❑ Во секоја од епруветите се додава по 5 mL од биуретската смеса за анализа и содржината внимателно се промешува.
 - ❑ Епруветите се оставаат на собна температура 10 минути.
 - ❑ Се додава 0,5 mL разреден Folin-Ciocalteu-ов реагенс и содржината во епруветите веднаш се меша.
 - ❑ Растворот се инкубира 30 минути на собна температура.
 - ❑ Содржината во епруветите се меша, спектрофотометарот се калибрира со слепа проба, после што се мери апсорбанцата на бранова должина од 500-750 nm.
-

Lowry-ева метода



BCA анализа



- ❑ P.K. Smith et al. (1985) *Anal. Biochem.* **150**: 76.
- ❑ K. J. Wiechelman et al. (1988) *Anal. Biochem.* **175**: 231

ВСА анализа

Предности

- ☐ Извонредно сензитивна метода и брза доколку анализата се изведува при повисоки температури.
- ☐ Постои сличност со бројни детергенти (површинско активни супстанции)
- ☐ Работниот раствор е стабилен
- ☐ При анализа на различни примероци протеини разликите се мали.
- ☐ Линеарност постои во широк опсег на работни концентрации.

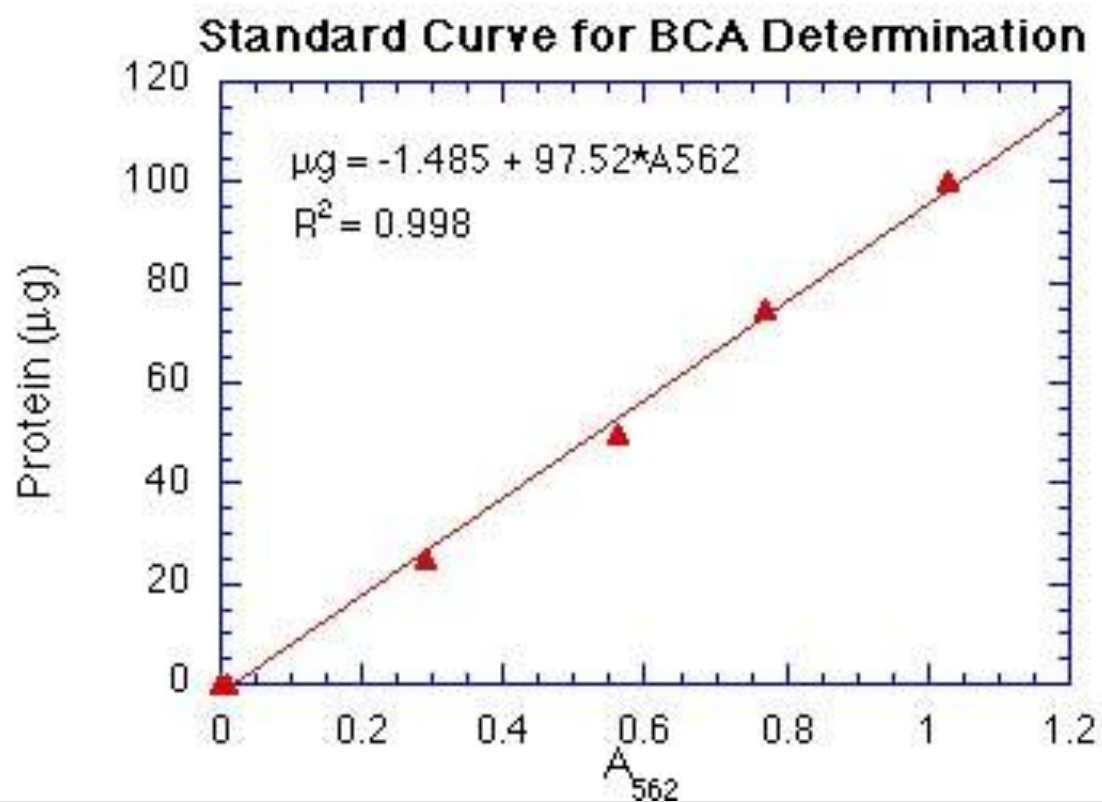
Недостатоци

- ☐ Реакцијата не се одвива во целост при собна температура

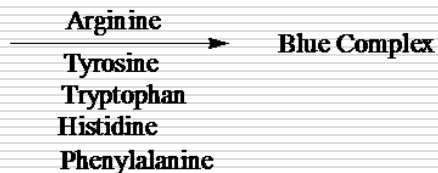
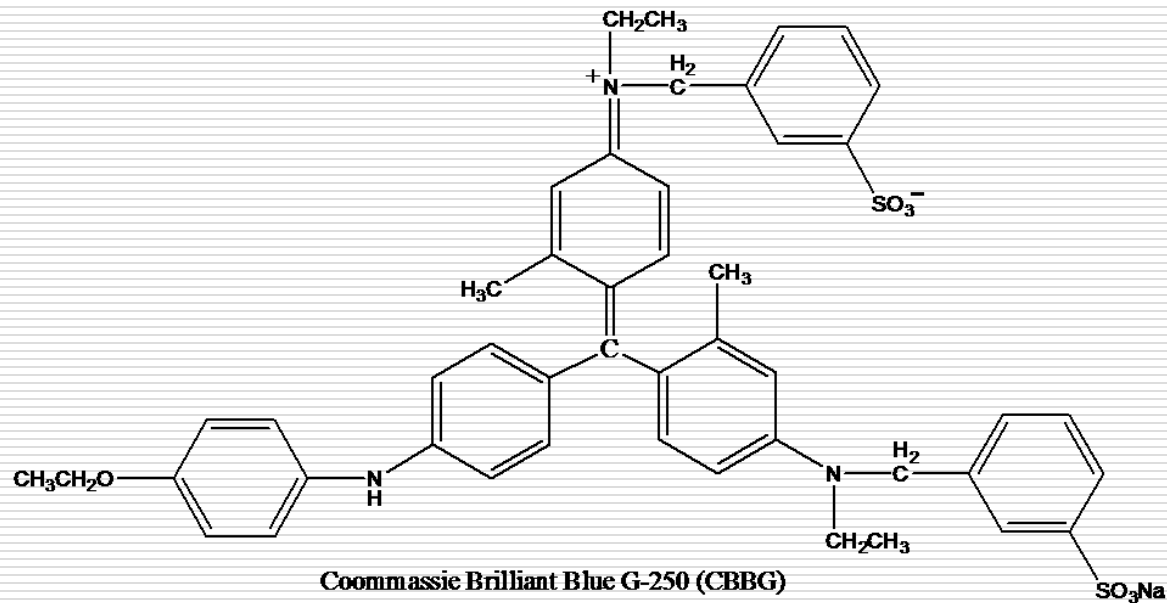
BCA анализа

- ❑ Се приготвува потребното количество реагенс за BCA анализа, така што кон еден волуменски дел раствор од бакар сулфат се додаваат 50 волуменски делови раствор од бицинхонинска киселина.
 - ❑ Во епруветите се ставаат примероците со протеин и познати количества од bovine serum albumin во опсег од 1 до 100 μg . Вкупниот волумен во секоја од епруветите треба да изнесува 0,1 mL.
 - ❑ Во секоја од епруветите се додава 2 mL реагенс за анализа на протеините, и содржината веднаш се промешува.
 - ❑ Епруветите се термостатираат на 60°C во текот на 15 минути.
 - ❑ Содржината од епруветите се лади до собна температура, после што се определува апсорбанцата на бранова должина од 562 nm.
-

BCA анализа



Bradford-ова анализа



- Bradford, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.
- Stoscheck, CM. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69 (1990).

Bradford-ова анализа

Предности

- ☐ Брза и ефтина постапка
- ☐ Специфична за протеини
- ☐ Многу сензитивна (микроанализа 1-20 μg и макроанализа 20-200 μg)
- ☐ Компатибилна со голем број супстанции
- ☐ Екстинцискиот коефициент за комплексот боја-протеин е 10 пати постабилен од магнитудата за протеинот.
- ☐ Обоениот комплекс е стабилен околу 1 час.

Недостатоци

- ☐ Стандардната крива не покажува линеарност во широк интервал на концентрации.
- ☐ За различни протеини се добиваат различни резултати, па многу важен е изборот на стандардот.

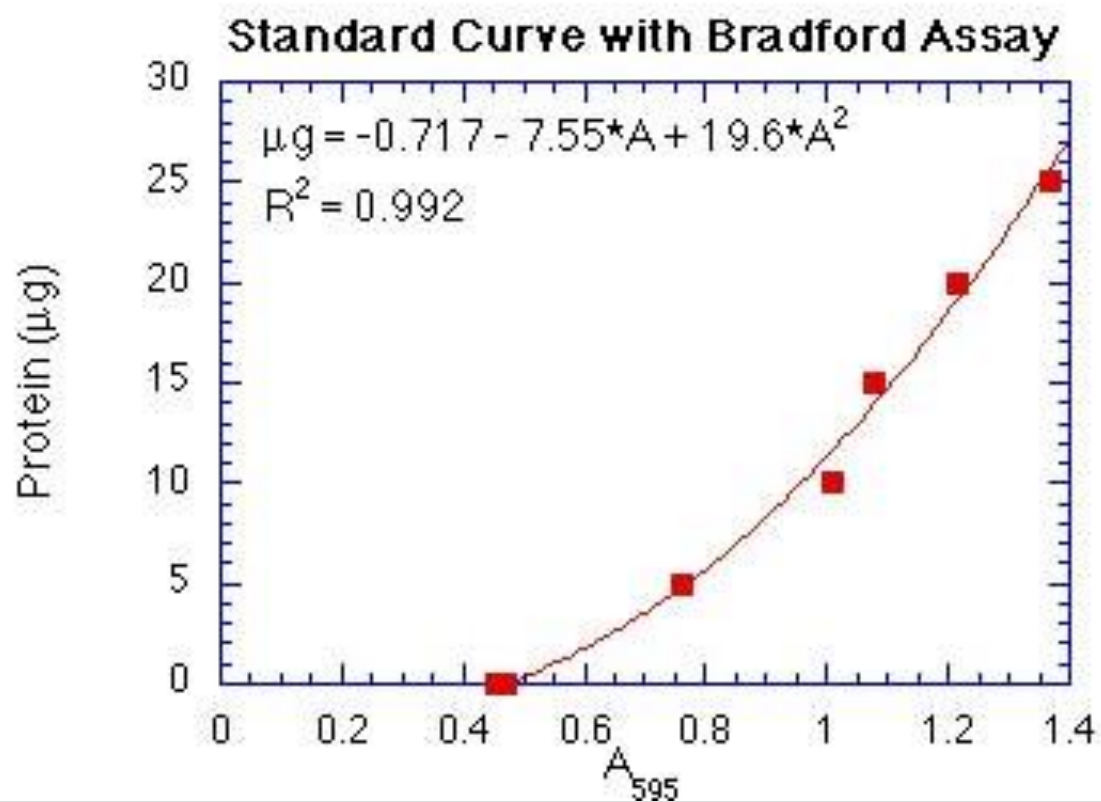
Bradford-ова анализа

- ❑ Coomassie-Brilliant Blue G-250 (CBBG) првенствено стапува во реакција со остатоците аргинин (8 пати повеќе од останатите аминокиселински остатоци).
 - ❑ Доколку примерокот за анализа е протеин богат со аргинин, треба да се најде стандард кој ќе содржи голем удел аргинински остатоци.
 - ❑ CBBG се врзува со овие остатоци во анјонска форма (апсорпционен максимум на 595 nm – сина боја)
 - ❑ Несврзаната индикаторска боја во растворот се наоѓа во катјонска форма со апсорпционен максимум на 470 nm (црвена боја)
-

Bradford-ова анализа

- ❑ Апсорпционите спектри на анјонската и катјонска форма на индикаторот се препокриваат.
 - ❑ Поради тоа, стандардната крива на Bradford-овата анализа не е линеарна како што производителите тврдат.
 - ❑ Анализта покажува линеарност во сосема тесно концентрациско подрачје.
 - ❑ Доколку примерокот содржи повеќе од 20 μg протеин, многу попрецизна е кривата од втор ред, одошто линеарната.
-

Bradford-ова анализа



Bradford-ова анализа

- ❑ Спектрофотометарот се загрева 15 минути пред употребата.
 - ❑ Примероците се разредуваат со пуфер до бараната концентрација од 1-20 $\mu\text{g/mL}$.
 - ❑ Се приготвува серија од стандардни раствори со 1-20 μg албумин или гама-глобулин во волумен од 200 μL , а доколку се дополнува со 1 M NaOH, се додаваат 100 μL .
 - ❑ Од непознатите примероци во епрувета се става содржина што одговара на 1-20 μg протеин во волумен од 200 μL .
 - ❑ Во секоја од пробите се додава 100 μL 1 M NaOH и содржината се меша.
 - ❑ Се додаваат 800 μL боен реагенс (индикатор) и примероците се термостатираат 5 минути.
 - ❑ Се отчитува апсорбанцата на 595 nm.
-

Апсорпција на ултравиолетово зрачење

- ❑ Доколку не е позната концентрацијата на протеинот во некој примерок, добра појдовна точка е методот на апсорпција на УВ зрачење.
 - ❑ Ова е често применуван метод, особено пред да се употреби некој посензитивен.
 - ❑ Апсорпциониот спектар се должи на присутните ароматични аминокиселини, тирозин и триптофан.
 - ❑ Повисоките протеински структури, клеточните компоненти особено нуклеинските киселини, исто така апсорбираат УВ зрачење.
 - ❑ Овој метод е најмалку сензитивен од претходно споменатите.
 - ❑ Вистинска предност на методот е што примерокот не е уништен, а постапката е брза.
-

Апсорпција на ултравиолетово зрачење

Предности

- ☐ Брза метода
- ☐ Примерокот се обновува
- ☐ Корисна метода за првични приближни испитувања, пред да се примени софистицирана сензитивна метода.

Недостатоци

- ☐ Силно осетлива кон пуфери, биолошки материјали и соли.
 - ☐ Важен е аминокиселинскиот состав на протеинот, па изборот на стандард е мошне тежок, особено за пречистени протеини.
 - ☐ pH и јонската сила на растворот силно влијаат врз апсорбанцата на протеините.
-

Апсорпција на ултравиолетово зрачење

- ☐ Спектрофотометарот се калибрира со слепа проба вода или пуфер.
- ☐ Се отчитува апсорбанцата на 280 nm, на раствор во кварцна кивета.
- ☐ Повторно се калибрира инструментот со вода или пуфер.
- ☐ Се отчитува апсорбанцата на 260 nm.
- ☐ Се прави проценка за концентрацијата на протеинот според равенството

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