

Vježba br. 3. Upoznavanje sa proteinima

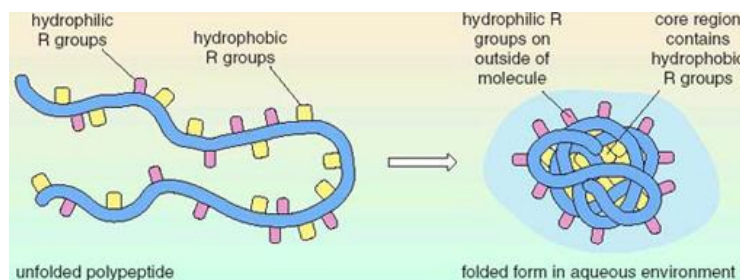
2.1 Principi izolovanja proteina: ekstrakcija i taloženje

U bilo kojem biološkom materijalu nalazi se veliki broj različitih proteina, koji su naravno i različito zastupljeni. Problem koji se obično postavlja je izolovanje jednog određenog 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, mikroorganizam) prva faza je dezintegracija i homogenizacija, a potom se proteini iz homogenizata ekstrahuju pomoću odgovarajućih pufera. Kako se i ovdje dobija smješa proteina, dalje slijedi njihovo frakcionisanje, takođe taloženjem. Taloženjem, proteini koji su bili u rastvoru prelaze u agregate, koji su dovoljno veliki da se mogu lako odvojiti centrifugovanjem.

Proteini koji se rastvaraju u vodi nazvani su albumini, a proteini koji se ne rastvaraju u vodi, već u razblaženim rastvorima soli, globulini.

Proteini iz rastvora mogu da se talože podešavanjem pH, dodatkom soli ili organskih rastvarača. Kada je pH rastvora blisko pH vrijednosti koja predstavlja izoelektričnu tačku proteina – pI , rastvorljivost proteina je najmanja. 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 smješe.

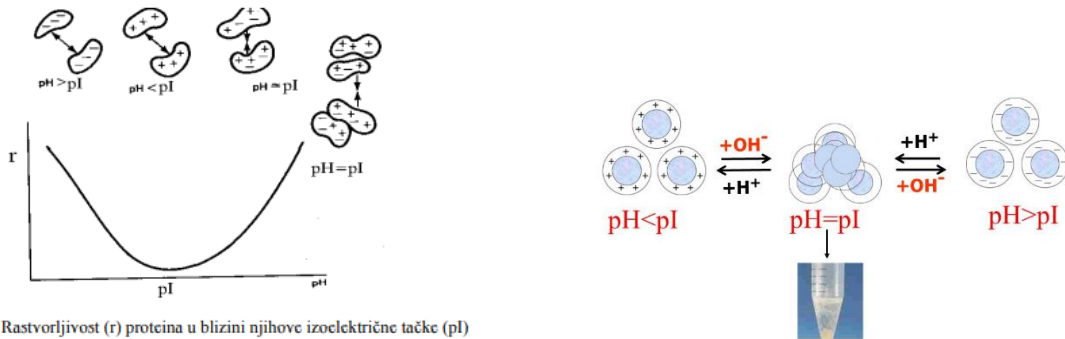
Rastvorljivost nativnog proteina zavisi od prisustva i rasporeda hidrofилnih (polarnih) i hidrofobnih (nepolarnih) djelova na površini molekula proteina. Na površini molekula proteina se nalazi većina polarnih ostataka, od kojih su pojedini + ili – naelektrisani na određenom pH. Većina nepolarnih ostataka AK se nalazi u unutrašnjosti proteina.



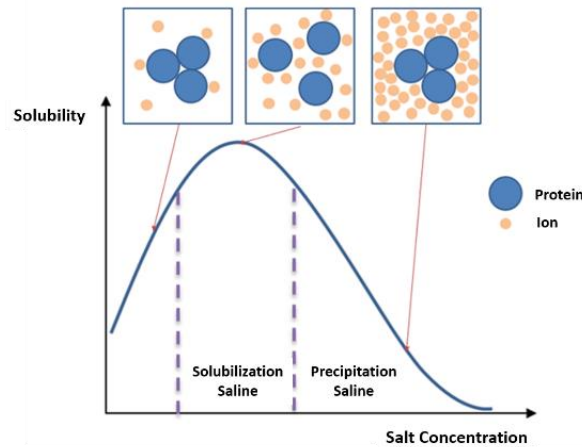
Molekuli proteina se nalaze u rastvoru jer njihovi bočni ostaci grade vodonične veze sa molekulima vode i elektrostatičke interakcije sa jonima soli iz rastvora, kao i što se molekuli proteina, usled istoimenog naelektrisanja koja nose, međusobno odbijaju.

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

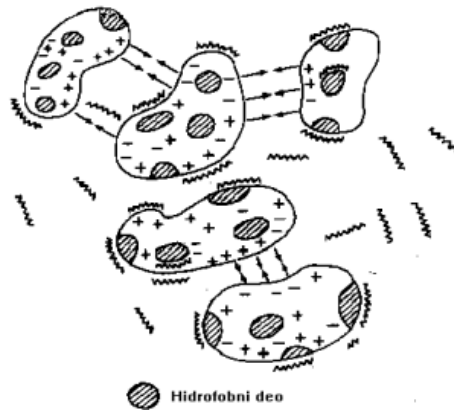
do interakcija (privlačenja) među molekulima proteina i nastajanja agregata koji se talože. Ovaj efekat se povećava pri smanjenju jonske sile rastvora.



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 djelovima susjednih molekula proteina. Najpodesnija so (osim ako treba da se koristi u alkalnoj sredini) za taloženje proteina je amonijum-sulfat (AS). Amonijum-sulfat 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 mijenja mnogo sa temperaturom i što je takođe važno koncentrovani rastvor AS (2 - 3 M) stabilizuje proteine. Taloženje proteina iz rastvora amonijum-sulfatom vrši se dodavanjem čvrstog (sprašenog) AS, ili dodavanjem zasićenog rastvora AS.



Taloženje proteina iz rastvora organskim rastvaračima (na primjer 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.



Na višim temperaturama organski rastvarači izazivaju denaturaciju proteina, što se izbjegava ako se radi na hladno. Denaturacija proteina može se, kao što ćemo vidjeti, izazvati i na druge načine: toplotom, drastičnim promjenama 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.

Albumin iz bjelanceta (ovalbumin)

Ovalbumin čini 64 % od proteina bjelanceta 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.

Kojoj grupi proteina pripadaju albumini? Opišite strukturu ovalbumina. Objasnite koja je razlika između albumina i ovalbumina. Dodajte sliku njegove strukture. Koja je izoelektrična tačka albumina?

Postupak: Stavite jedno bjelance u 500 mL destilovane (dejonizovane) vode i energično promiješajte. Procijedite rastvor kroz više slojeva gaze da biste odvojili membrane. Energično miješajte staklenim štapićem da biste ubrzali prolazak bjelanceta kroz gazu. Vodeni rastvor sačuvajte za sledeće oglede.

Zabilježite šta ste zapazili i pokušajte vaša zapažanja da objasnite.

Kazein iz mlijeka

U mlijeku se nalaze tri vrste proteina: kazein, albumin i globulin. Pored njih nalaze se u malim količinama i proteoze-peptoni, fermenti i još neidentifikovani proteini pri čemu kazein učestvuje sa oko 80 % u ukupnim proteinima, dok ostali čine oko 20 %.

Kazein je složeni protein, fosfoproteid. Sadrži 15,65 % azota. Sastoji se od tri frakcije: α -, β - i γ -kazeina, od kojih α -kazein učestvuje sa 75 %, β -kazein sa 22 %, a γ -kazein sa 3 % u ukupnom kazeinu. Prema najnovijim ispitivanjima, α -kazein se sastoji od više frakcija proteina. Molekulska težina α -kazeina iznosi 121 800, β -kazeina 24 100 i γ -kazeina 30 600. Kazein se nalazi u mlijeku kao kompleks kalcijum-kazeinata u obliku micela, molekulske težine od nekoliko miliona. Ove micelle su okrugle, sa prečnikom od 30 do 300 m μ (najčešće 40—160 m μ).

Kazein se taloži iz mlijeka pod dejstvom kiselina ili fermenta himozina. Ako se dodaju kiseline ili se stvara mliječna kiselina u mleku, kalcijum postepeno prelazi iz koloidnog u rastvorljivi oblik i taloži se kazein. To se odvija po ovoj reakciji: $\text{Ca} - \text{H} - \text{kazeinat} + \text{kiselina} = \text{kiseli kazein} + \text{kalcijum-laktat}$. Kazein se optimalno taloži pri izoelektričnoj tački pH 4,6. Istovremeno s tom reakcijom, pretvara se pod uticajem kiselina koloidni trikalcijum-fosfat vezan za kazein u rastvorljivi monokalcijum-fosfat i kalcijum-laktat. To taloženje kazeina ne zavisi samo od sadržaja kiseline, već i od temperature mlijeka. Optimalna temperatura za zgrušavanje kazeina je oko 40 °C.

Postupak: 100 mL mlijeka zagrijati do 40 °C (vodeno kupatilo) uz miješanje. Nakon zagrijavanja sa površine ukloniti kremasti dio špatulicom i u rastvor dodati 10 % CH₃COOH, kap po kap, miješati staklenim štapićem. Ako kazein nije počeo da se taloži dodati još kiseline, opet promiješati. Rastvor u čaši ostaviti dok se talog u potpunosti ne slegne. Kad se kazein istaloži, odlije se što je moguće više bistrog rastvora iznad taloga, a zatim se sadržaj čaše filtrira preko navlaženog grubog naboranog filter-papira. Talog se sa filter-papira prenese na Büchnerov lijevak i što bolje procijedi i filtrat se spoji sa prethodnim. Filtrat sadrži albumin i laktozu te služi za drugi dio vježbe.

Dobijeni kazein se prebaci u čašu od 50 mL, doda se 15 mL acetona, dobro promiješa i ponovno procijedi preko Büchnerovog lijevka. Ispiranje taloga acetonom ponovi se još jednom na isti način. Svrha ovog ispiranja acetonom jeste uklanjanje vode i male količine masti iz kazeina. Vlažni kazein stavi se u avan i suši uz povremeno mrvljenje tučkom kako bi se dobio praškasti produkt. Najbolje je sušiti preko noći (do sljedećeg termina vježbi), ali nikako ne ostaviti na filter-papiru. Dobijeni protein čuvati u eksikatoru. Snimiti FTIR spektar a zatim napraviti rastvor koncentracije 1 mg/mL i snimiti UV-Vis spektar.

Dodati spektre u rezultate vježbe. Dodati sliku strukture kazeina.

Albumin iz mlijeka

U filtrat odvojen od kazeina doda se 3 g praškastog kalcijum-karbonata kako bi se neutralisao višak sirćetne kiseline. Promiješa se i zagrijava 15 minuta pri temperaturi vrenja, pri čemu se gotovo sav albumin istaloži (koagulacija proteina temperaturom!). Vruć rastvor se filtrira preko zagrijanog Büchnerova lijevka. Snimiti FTIR spektar a zatim napraviti rastvor koncentracije 1 mg/mL i snimiti UV-Vis spektar.

U rezultate dodati snimljene spektre i uporediti ih sa spektrima ovalbumina dobijenim iz jajeta.

2.2. Određivanje koncentracije proteina

Postoji više metoda i postupaka za određivanje koncentracije proteina. Izbor metode, između ostalog, zavisi od prirode materijala, količine uzorka i koncentracije proteina u njemu. Metode za određivanje koncentracije proteina obuhvataju: gravimetrijske metode, određivanje azota po Kjeldalu, aminoanalizu, spektrofotometrijske i kolorimetrijske metode. U ovoj vježbi ćemo detaljnije opisati:

spektrofotometrijske metode: određivanje se zasniva na specifičnoj apsorpciji svjetlosti proteina u UV oblasti. Većina proteina ima apsorpcioni max na 280 nm koji potiče od tirozina i triptofana. Ukoliko apsortivnost (ekst. koeficijent) proteina koji određujemo nije poznat, uzima se srednja vrijednost $A_{280}^{mg/ml} = 0.91$. 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 mjerenjem apsorbance rastvora na 260 i 280 nm i primjenom tablica ili iz jednačine:

$$\text{koncentracija proteina (mg/ml)} = 1.55 \cdot A_{280} - 0.76 \cdot A_{260}$$

koncentracija uzorka ovalbumina iz jajeta:

2.3. Ispitivanje rastvorljivosti kazeina i ovalbumina

Taloženje proteina amonijumsulfatom: U 3 mL ispitivanog rastvora proteina dodajte iz pipete zasićeni rastvor amonijum-sulfata. Ukoliko ne dolazi do taloženja dodajte čvrsti (sprašeni) amonijum-sulfat do zasićenog rastvora.

Zaključak:

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). Taloge odvojite centrifugovanjem i sačuvajte ih za ispitivanje rastvorljivosti i snimanje IR spektra.

Zaključak:

Taloženje proteina promjenom 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. Izmjerite pH.

Zaključak:

Taloženje (koagulacija/denaturacija) proteina zagrijavanjem: 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.

Zaključak:

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,

- 0,05 M HgCl₂

Zaključak:

Rastvaranje dobijenih taloga proteina: Dobijene taloge pokušajte da rastvorite (ne zaboravite blago miješanje) u destilovanoj vodi. Ako se proteini ne rastvaraju pokušajte sa pažljivom promjenom pH (dodavanjem 0,1 M HCl i 0,1 M NaOH).

Zaključak:

Kazeinsko ljepilo:

U digestoru se u avanu pomiješa 1 g praškastog kazeina, 3 g kalcijum-hidroksida i 0,14 g bezvodnog natrijum-karbonata i sve se zajedno dobro izmrviti. Dobijeno suvo ljepilo stavi se u bočicu s čepom, a mokro se ljepilo pripremi tako što se postupno i uz miješanje dodaje 1 g suvog ljepila u 2,5 mL vode.