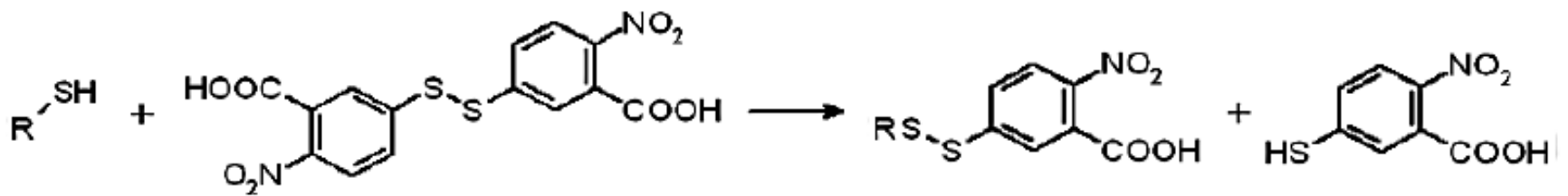
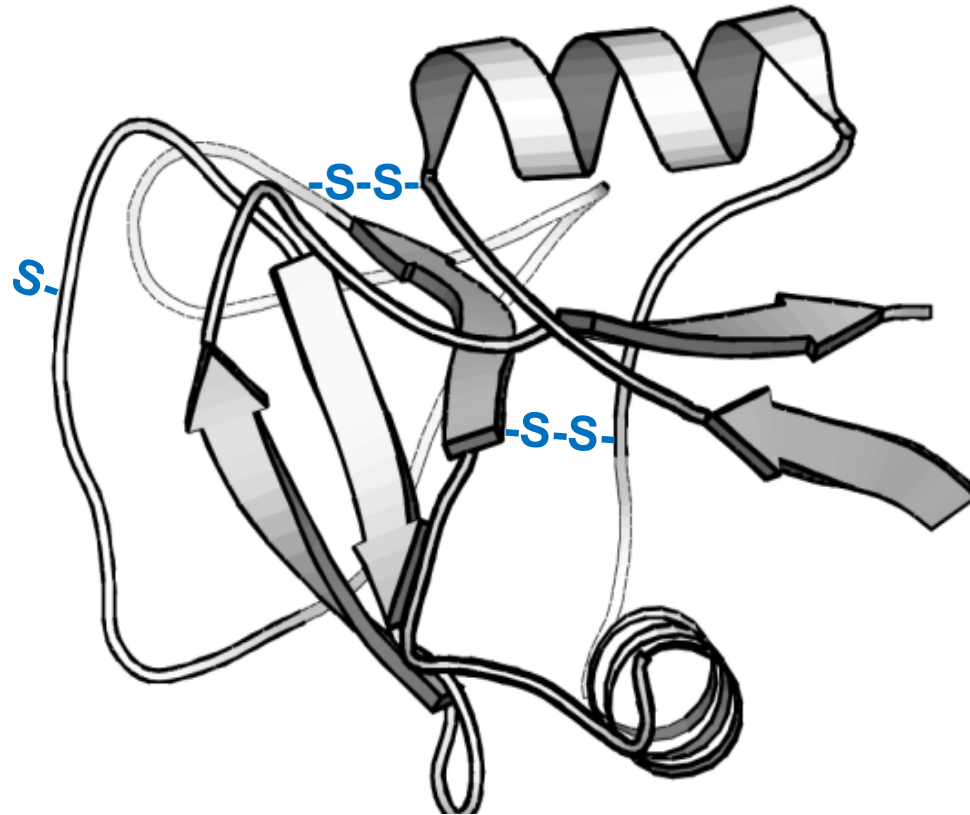


# CISTINI & CISTEINI

**9. vaja – Določevanje števila cisteinov v  
protienu**



Slika 1: Reakcija Ellmanovega reagenta s tiolno skupino cisteina.

## Namen vaje:

Na vajah boste dobili neznan protein, kateremu bo potrebno določiti število vseh cisteinov, število prostih cisteinov in iz tega sklepati, koliko disulfidnih vezi ima protein.

Metoda za določanje števila z Ellmanovim reagentom je relativna in zato potrebujemo umeritveno krivuljo.

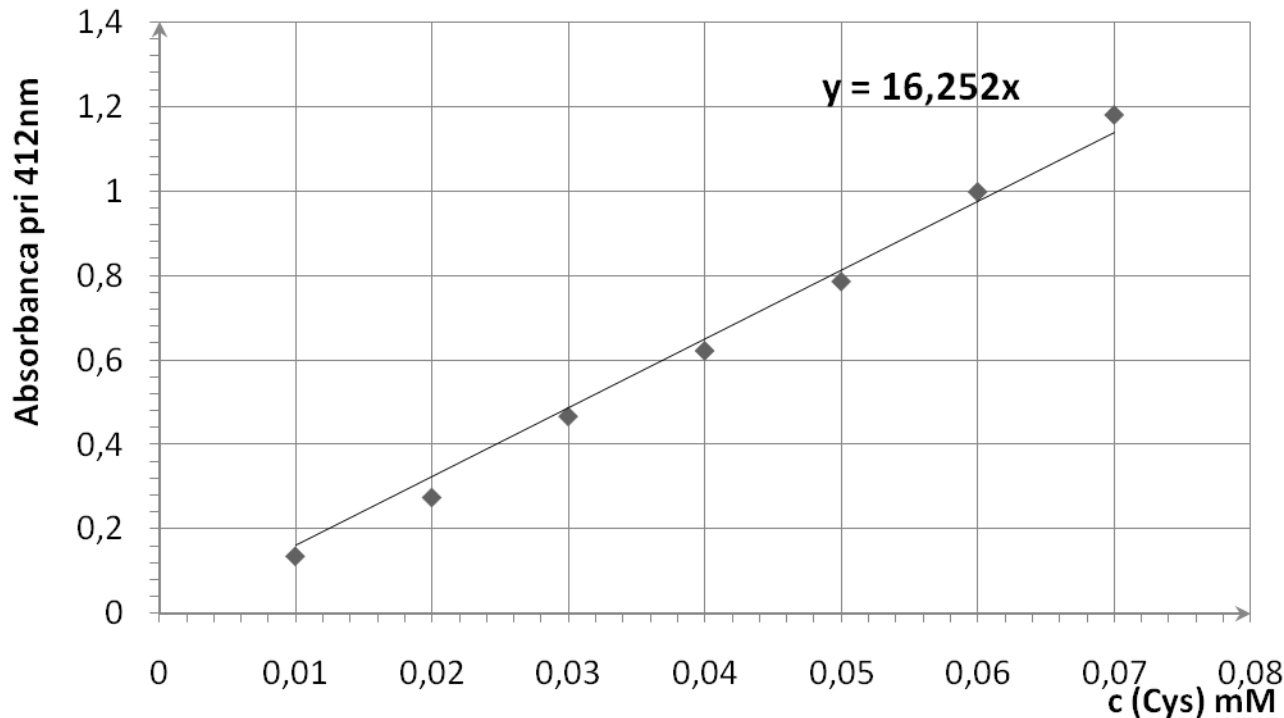
Molska masa proteina BSA; **66 400 g/mol**

# Namen vaje:

I: Umeritvena krivulja za kvantitativno določanje cisteinov

Koncentracija cisteinov v 3mL (mM)	A <sub>412</sub>
0,01	0,136
0,02	0,275
0,03	0,467
0,04	0,622
0,05	0,786
0,06	0,998
0,07	1,18
	0,103 (vzorec II)
	0,203 (vzorec III)

Umeritvena krivulja za določanje cisteinov



# Namen vaje:

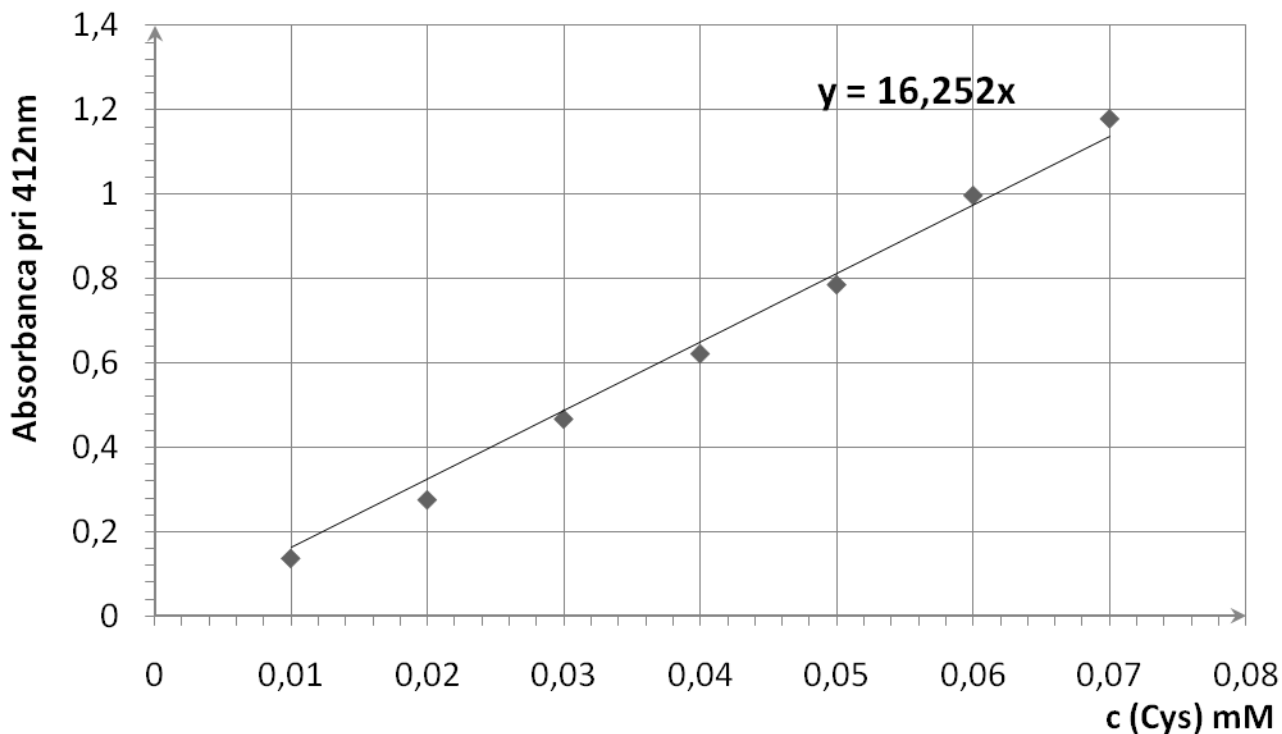
**II:** Določitev števila prostih cisteinov  
v denaturiranem proteinu

Primer:

	<b>0,103 (vzorec II)</b>
--	--------------------------

Vzorec II:  $y = 0,053 \rightarrow x = (0,103 / 16,252) = 6,33 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$

### Umeritvena krivulja za določanje cisteinov



# Namen vaje:

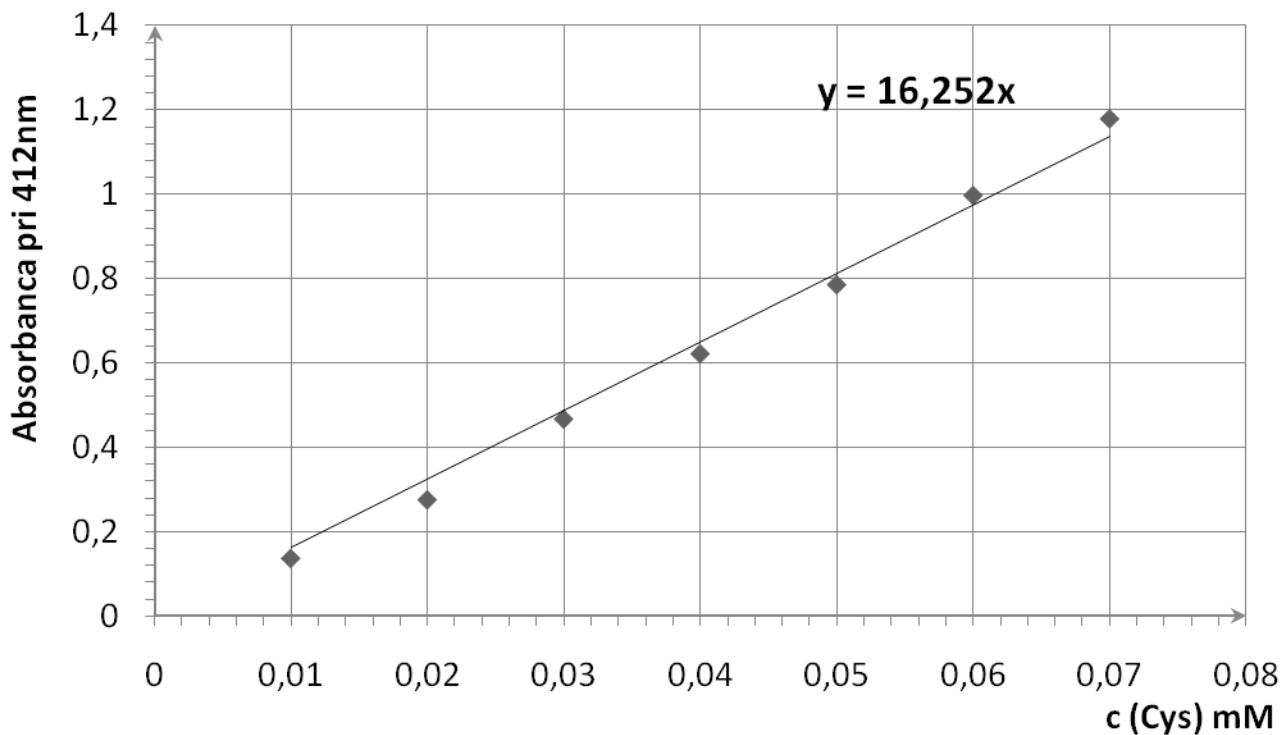
**III:** Določitev števila VSEH cisteinov  
v proteinu

Primer:

	<b>0,203 (vzorec III)</b>
--	---------------------------

Vzorec III:  $y = 0,203 \rightarrow x = (0,203 / 16,252) = 12,5 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$

**Umeritvena krivulja za določanje cisteinov**



## Računanje II:

Sedaj ste dobili koncentracijo prostih cisteinov ( $6,33 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$ ) in koncentracijo vseh cisteinov v vzorcu ( $12,5 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$ ).

Za ustrezno določitev števila cisteinov je potrebno primerjati množine snovi »cisteinov« dobljenih z merjenjem absorbance pri 412 nm z množino proteina, ki ste ga obravnavali.

## Računanje II:

Če pogledamo izhodne podatke pri **točki II**, lahko preberemo volumen

$$V = 0,6 \text{ ml} = 6 \cdot 10^{-4} \text{ l} \quad \text{in koncentracijo izhodnega proteina: } c = 10 \text{ mg/ml} = 10 \text{ g/l}$$

Iz teh dveh podatkov izračunamo izhodno maso proteina:

$$m = V \cdot c = (6 \cdot 10^{-4} \text{ l}) \cdot (10 \text{ g/l}) = 6 \cdot 10^{-3} \text{ g}$$

Molska masa proteina je **66 400 g/mol**.

Iz teh dveh podatkov izračunamo **množino proteina**:

$$n = m/M = (6 \cdot 10^{-3} \text{ g}) / (66\,400 \text{ g/mol}) = \underline{9 \cdot 10^{-8} \text{ mol}}$$



## Računanje II:

izračunamo **množino proteina:**

$$n = m/M = (6 \cdot 10^{-3} \text{ g}) / (66\,400 \text{ g/mol}) = \underline{9 \cdot 10^{-8} \text{ mol}}.$$

Iz umeritvene krivulje preberemo koncentracijo prostih cisteinov, ki je  $6,33 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Končni volumen je bil 3 ml, torej  $3 \cdot 10^{-3} \text{ l}$ .

Iz teh dveh podatkov izračunamo **množino cisteinov:**

$$n = c \cdot V = (6,33 \cdot 10^{-6} \text{ M}) \cdot (3 \cdot 10^{-3} \text{ l}) = \underline{1,8 \cdot 10^{-8} \text{ mol}}$$

Za ustrezno določitev števila cisteinov je potrebno primerjati množine »cisteinov«  
dobljenih z merjenjem absorbance pri 412 nm z množino proteina, ki ste ga  
obravnavali.

Na 1 mol proteina pride  $(1,8 \cdot 10^{-8} \text{ mol} / 9 \cdot 10^{-8} \text{ mol})$  0,2 molov cisteina, kar pomeni, da smo po naših izračunih dobili 1 prost cistein.

## Računanje III (denaturacija in redukcija):

Koncentracija vseh cisteinov v vzorcu ( $12,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ).

Če pogledamo izhodne podatke pri **točki III**, lahko preberemo:  $V = 3 \text{ ml} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ l}$   
Koncentracija izhodnega proteina:  $c = 0,1 \text{ mg/ml} = 0,1 \text{ g/l}$

Iz teh dveh podatkov izračunamo **izhodno maso proteina**

$$m = V \cdot c = (3 \cdot 10^{-3} \text{ l}) \cdot (0,1 \text{ g/l}) = 3 \cdot 10^{-4} \text{ g}$$

Na vajah ste dobili podatek, da je molska masa proteina **66 400 g/mol**.

Iz teh dveh podatkov izračunamo **množino proteina**:

$$n = m/M = (3 \cdot 10^{-4} \text{ g}) / (66\,400 \text{ g/mol}) = \underline{4,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol}}$$

## Računanje III:(denaturacija in redukcija):

Izračunamo **množino proteina**:

$$n = m/M = (3 \cdot 10^{-4} \text{ g}) / (66\,400 \text{ g/mol}) = \underline{4,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.}}$$

Koncentracija vseh cisteinov v vzorcu =  $12,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Končni volumen je bil 3 ml, torej  $3 \cdot 10^{-3} \text{ l}$ .

Iz teh dveh podatkov izračunamo **množino VSEH cisteinov**:

$$n = c \cdot V = (12,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}) \cdot (3 \cdot 10^{-3} \text{ l}) = \underline{37,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol}}$$

Na 1 mol proteina pride  $(37,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} / 4,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol})$  8 molov cisteina, kar pomeni, da smo po naših izračunih dobili 4 sparjene in 1 prost cistein.

4 disulfidni mostički in en prost cistein

## Rezultat:

**Pravilen** rezultat pa je:

**Analizirani protein je BSA ima 35 cisteinov. Ti so povezani v 17 disulfidnih mostičkov, eden pa je prost.**

Določitev števila PROSTIH cisteinov v denaturiranem proteinu: **dejansko število je 1, dobi se vrednosti od 0,2 do 1,2.**

Določitev števila VSEH cisteinov v proteinu: **dejansko število je 35, dobljena vrednost pa je odvisna od pravilnega dela in natančnosti pipet (10-100).**