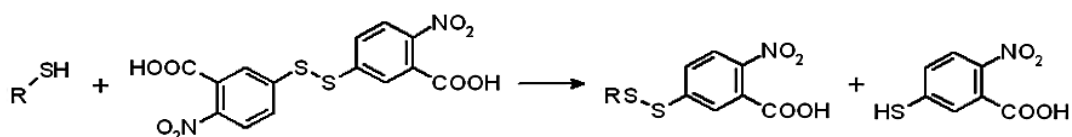


## Določanje števila cisteinov v proteinu

**Namen vaje:** Naučili se boste določati število prostih in disulfidno vezanih cisteinov v proteinu z Ellmanovim reagentom.

**Uvod:** Aminokislina cisteini s svojo tiolno skupino  $-SH$  lahko tvorijo disulfidne vezi ( $-S-S-$ ) v proteinu in tako stabilizirajo njegovo strukturo. Poznavanje števila cisteinov je pomembno pri določanju aminokislinskega zaporedja proteinov, pri pridobivanju rekombinantnih proteinov, še posebno iz bakterijskih celic, ter drugih strukturnih in funkcionalnih analizah proteinov. Pri določanju aminokislinskega zaporedja polipeptidne verige prisotnost cisteinov zahteva posebno pripravo vzorca. Protein najprej denaturiramo in nato z alkiliranjem zaščitimo reaktivne  $-SH$  skupine, da se ponovno ne oksidirajo. Poleg tega alkilirani cisteini predstavljajo derivate, ki jih lahko detektiramo pri določanju aminokislinskega zaporedja.

Število cisteinov bomo določali s pomočjo Ellmanovega reagenta (5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzojska kislina ali DTNB). Tiolna skupina ( $-SH$ ) v substratu cepi disulfidno vez v Ellmanovem reagentu (Slika 1). Kot produkt nastane 2-nitro-5-tiobenzoat ( $NTB^-$ ), ki v nevtralnem ali alkalnem pH ionizira v dianion ( $NTB^{2-}$ ).  $NTB^{2-}$  je rumene barve, zato ga spektrofotometrično določamo z absorbanco pri valovni dolžini 412 nm.



Slika 1: Reakcija Ellmanovega reagenta s tiolno skupino cisteina.

Najprej pripravimo umeritveno krivuljo iz raztopin z znanimi koncentracijami cisteina (Cys). Nato določimo število prostih cisteinov v denaturiranem neznanem proteinu in še število vseh cisteinov v tem proteinu. V zadnjem primeru protein denaturiramo in reduciramo – porušimo disulfidne mostičke, da dobimo vse cisteine proste za reakcijo z Ellmanovim reagentom.

**Potek dela:** Delate v paru. En študent izvede vaji I in II, drugi študent pa vajo III.

### I: Umeritvena krivulja za kvantitativno določitev cisteinov

1. Iz izhodne raztopine 10 mM cisteina z destilirano vodo pripravi po 150  $\mu$ L standardnih raztopin koncentracij: 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 in 2,1 mM v mikrocentrifugirkah.
2. V 8 epruvet, eno za slep vzorec, ostalih sedem pa za standardne raztopine cisteina odmeri po 2,3 mL 10 M uree v 0,5 M Tris/HCl, pH 8 in dodaj 0,1 mL 6 mM Ellmanovega reagenta v etanolu ter 0,5 mL destilirane vode. Nato v vsako epruveto dodaj 0,1 mL standardne raztopine cisteina z določeno koncentracijo. V epruveto s slepim vzorcem daj 0,1 mL destilirane vode namesto raztopine cisteina.
3. Po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi izmeri absorbanco vzorcev pri 412 nm ( $A_{412}$ ) proti slepemu vzorcu. Na osnovi rezultatov meritev izdelaj umeritveno krivuljo.

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

1. Zmešaj 0,6 mL raztopine neznanega proteina s koncentracijo 10 mg/mL in 2,3 mL 10 M uree v 0,5 M Tris/HCl, pH 8. V slepi vzorec namesto proteina dodaj destilirano vodo in 2,3 mL 10 M uree v 0,5 M Tris/HCl, pH 8.
2. Vzorec inkubiraj na sobni temperaturi 15 minut, da se protein denaturira.
3. Dodaj 0,1 mL 6 mM Ellmanovega reagenta.
4. Epruveti inkubiraj na sobni temperaturi 10 minut, nato pa pomeri  $A_{412}$  proteinskega vzorca proti slepemu vzorcu. S pomočjo umeritvene krivulje določi število prostih cisteinov v neznanem denaturiranem proteinu.

### III: Določitev števila vseh cisteinov v proteinu

*Denaturacija in redukcija proteina:*

1. V mikrocentrifugirki k 0,2 mL raztopine neznanega proteina s koncentracijo 10 mg/mL dodaj 0,4 mL 10 M uree v 0,5 M Tris/HCl, pH 8, in 0,04 mL 0,5 M reducenta ditiotreitola (DTT).
2. Raztopino inkubiraj 20 minut na sobni temperaturi, da se protein denaturira in prekinejo disulfidne vezi.
3. Denaturiranemu in reduciranemu proteinu dodaj 0,6 mL 20% (v/v) trikloroacetne kisline (TCA) in dobro premešaj. Protein se takoj po dodatku TCA obori.

- Vzorec pusti na sobni temperaturi približno 5 minut, da se kosmiči začnejo posedati, nato pa ga centrifugiraj v namizni centrifugi za mikrocentrifugirke (14000 vrt./min, 3 minute). Reducent, ki tudi ima tiolne skupine, ostane v raztopini in nadalje ne moti pri določanju števila cisteinov z Ellmanovim reagentom.
- Supernatant odlij v odpad. Preostanek tekočine odstrani s pivnanjem na filter papirju ali s pipeto. Oborina je trdno prilepljena na dno mikrocentrifugirke.
- Oborino sperj z 1 mL 10% (v/v) TCA med intenzivnim mešanjem na vibracijskem mešalu. Nato centrifugiraj in odstrani supernatant, kot je opisano zgoraj.
- Še enkrat sperj oborino z 1 mL 10% TCA, centrifugiraj in odstrani supernatant.
- Oborino raztopi v 1 mL 8 M uree v 0,15 M NaOAc pufru, pH 3 pri 37°C. Vmes večkrat intenzivno premešaj na vibracijskem mešalu. Oborina se počasi raztaplja.
- Po 15-30 minutah občasnega intenzivnega mešanja je večina oborine raztopljena. Neraztopljeno odstrani s centrifugiranjem na namizni centrifugi (14000 vrt./min, 3 minute).
- 0,1 mL supernatanta razredči z 0,9 mL 8 M uree v NaOAc pufru, pH 3. Tako pripravljenemu vzorcu izmeri  $A_{280}$  proti 8 M urei v NaOAc pufru, pH 3.  $A_{280}$  mora biti večja od 0,035, da imate dovolj proteina za nadaljnje delo. Na osnovi izmerjene absorbanse in podatka, da je  $A_{280}$  raztopine analiziranega proteina s koncentracijo 1mg/mL 0,67, izračunaj, kakšen volumen raztopine proteina ( $V_x$ ) moraš dodati v epruveto, kjer boš določal koncentracijo cisteinov z Ellmanovim reagentom, da bo koncentracija proteina med meritvijo 0,1 mg/mL (končni volumen je 3 mL; pozor: absorbanco si izmeril 10x redčenemu vzorcu)

#### Določitev cisteinov v reduciranem proteinu:

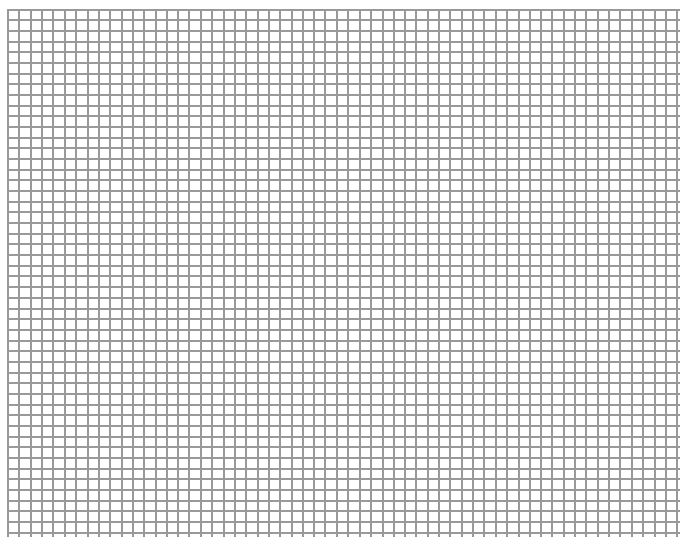
Ker v alkalnem, kjer poteka reakcija z Ellmanovim reagentom, lahko pride do ponovne tvorbe disulfidnih vezi, dodamo pri tej meritvi vzorec nazadnje.

- V 2 epruveti dodaj po 2,3 mL 10 M uree v 0,5 M Tris/HCl, pH 8 in 0,1 mL 6 mM Ellmanovega reagenta.
- V eno epruveto dodaj toliko 8 M uree ( $V_y$ ), da bo vsota njenega volumna in volumna raztopine reduciranega proteina ( $V_x$ ) 0,6 mL ( $V_y = 0,6 - V_x$ ). Nato dodaj še raztopino reduciranega proteina ( $V_x$ ).
- Slepi vzorec pripravi tako, da namesto proteinske raztopine dodaš 8 M ureo v 0,15 M NaOAc pufru, pH 3 – torej v raztopino 10 M uree in Ellmanovega reagenta dejansko dodaš 0,6 mL 8 M uree v 0,15 M NaOAc pufru, pH 3.
- Raztopino dobro premešaj in jo inkubiraj na sobni temperaturi 10 minut, nato pa pomeri njeno  $A_{412}$  proti slepem vzorcu. S pomočjo umeritvene krivulje določi število vseh cisteinov v neznanem proteinu.

#### Rezultati:

- V tabelo vpiši absorbance standardnih raztopin cisteinov in nariši umeritveno krivuljo tako, da bo na x osi koncentracija raztopin v 3 mL, na y pa njihove  $A$  pri 412 nm. Osi označi!
- V tabelo vpiši absorbance za proste cisteine v neznanem proteinu (vzorec II) in absorbance za vse cisteine v neznanem proteinu (vzorec III). Iz umeritvene krivulje odčitaj koncentraciji vzorcev in ju vpiši v tabelo.

c (Cys) (mM)	c (Cys) (mM) v 3 mL	$A_{412}$	Vzorec
0,3			/
0,6			/
0,9			/
1,2			/
1,5			/
1,8			/
2,1			/
/			Vzorec II
/			Vzorec III



### Odgovori na vprašanja:

1. V mojem neznanem proteinu je ..... prostih cisteinov in ..... vseh cisteinov.  
To pomeni, da ima protein ..... disulfidnih vezi.
2. Kaj je disulfidna vez?
3. Kateri reagent si uporabil/a za redukcijo disulfidnih vezi? Ali poznaš še druge reducente?
4. Zakaj moramo pri določanju aminokislinskega zaporedja vedeti, če protein vsebuje cisteine oz. disulfidne vezi?
5. Zakaj moramo pri določanju vseh cisteinov dodati proteinski vzorec na koncu? Ali ga moramo vedno dodati na koncu?