





POROČILO: 1. vaja – ANALIZA OSNOVNIH LASTNOSTI PROTEINA

Vaje iz predmeta: Struktura proteinov

Namen dela:

- določitev molekulske mase proteina B
- določitev izoelktrične točke proteina B

Kolona z gelom

S-300

Odstrani pufer

Dodaj 200µl vzorca

Dodaj 200µl pufra

Počasi dodaj pufer

Zbiranje vzorcev

1. 5ml ostali na 3,5 min

določitev števila podenot in načina povezave med njimi

Metode in delo:

- Gelska kromatografija:

V pripravljen gel nanesi standard in po 5µl za reducirske in 10µl za nereducirske pog.

Nalij pufer v katodni in
anodni del
Priklopi na napetost
(I = 30mA)
Ko pride frontna črta do
konca prekini

Gel barvaj z CBB R250

Gel barvaj z Schiffovim
reagentom

- NaDS-PAGE

Rezultati:

Barvanje z CBB R250

Barvanje z Schiffovim reagentom

Izoelektrični fokus (pI proteina B ~ 9)

Meritve pri gelski kromatografiji

Zap.št.	m _{vzorca}	A ₂₈₀
.		
1	4,8	0
2	0,7	0
3	0,8	0
4	0,7	0
5	0,9	0
6	0,8	0
7	0,9	0
8	0,9	0
9	0,6	0,103
10	0,9	0,452

Zap.št.	m _{vzorca}	A ₂₈₀
11	0,8	0,579
12	0,7	0,352
13	0,8	0,140
14	0,8	0
15	0,9	0
16	X	X
17	X	X
18	X	X
19	X	X
20	X	X

Največjo absorbanco ima 11 meritev.

$$y = -0,3929x + 10,071$$

$$x = 12,8 \text{ mL}$$

$$y = \log M_r = 5,04188$$

$$M_r = 110123 \text{ Da}$$

Diskusija:

Iz gela, ki je bil obarvan z CBB R250 opazimo, da ima protein B molekulsko maso 58kDa. To je enako pod reducijskimi in nereducijskimi pogoji. Z gelsko kromatografijo smo dobili molekulsko maso proteina B 110kDa. Iz teh dveh podatkov lahko sklepamo, da je protein zgrajen iz dveh enakih podenot. Kako so povezane, izvemo glede na to, da ima protein enako molekulsko maso pod reducijskimi in nereducijskimi pogoji. Ker dobimo liso v obeh primerih na enaki višini, lahko sklepamo, da so podenoti povezani z hidrofobnimi interakcijami.

Iz gela barvanega z Schiffovim reagentom izvemo, da sta obe podenoti glikozilirani.

Odgovori na vprašanja:

1. Navidezna masa našega proteina analiziranega na NaDS poliakrilamidni gelski elektroforezi je 58kDa po reducijskimi in nereducijskimi pogoji.
2. Protein je homodimer.
3. Sestavlja ga dve enaki polipeptidni verigi.
4. Polipeptidne verige v proteinu so med seboj povezane s hidrofobno interakcijo.
5. Sestava ločitvenega gela (10%) (10 mL)

- dH ₂ O	4,85 mL
- 1,5M Tris/HCl, pH 8,8	2,5 mL
- 10 % (m/v) NaDS	100 µL
- 40 % (m/v) akrilamid/bisakrilamid	2,50 mL
- 10 % (m/v) APS	50 µL
- TEMED	5 µL