**POROČILO: 2. vaja – Določitev števila prostih in disulfidno vezanih Cys v proteinu**

Vaje iz predmeta: Struktura proteinov

Namen dela:

* izdelava umeritvene krivulje za kvantitativno določitev Cys
* določitev števila prostih Cys v nativnem in denaturiranem proteinu
* določitev števila vseh Cys v denaturiranem in reduciranem proteinu

Pripravi raztopine Cys z c= 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1 mM

8 epruvet, v vsako:

2,3 ml 10M uree v 0,5M Tis/HCl (pH=8)

0,1 mL Ellmanovega reagenta v etanolu

0,5mL vode in po 0,1mL standardnih raztopin Cys, v slepi vzorec vodo

10 min inkubacije pri sobni T in merjenje A412 proti slepemu vzorcu

Nariši umeritveno krivuljo

Metode in delo:

- umeritvena krivulja:

- določitev števila prostih Cys v nativnem proteinu

0,6 mL proteina z c=10mg/mL (v slepo probo damo vodo)

2,3 mL 0,5M Tris/HCl (pH=8)

0,1 mL Ellmanovega reagenta

Inkubiramo 10min pri sobni T in merimo A412 proti slepemu vzorcu

Iz umerivene krivulje določi število prostih Cys

0,6 mL proteina z c=10mg/mL (v slepo probo damo vodo)

2,3 mL 10M uree v 0,5M Tris/HCl (pH=8)

Inkubiraj na sobni T 15 min in dodamo 0,1mL 6mM Ellmanovega reagenta

Inkubiramo 10min, merimo A412

Iz umeritvene krivulje določimo število prostih Cys v denaturiranem proteinu

- določitev števila prostih Cys v denaturiranem proteinu

- določitev števila vseh Cys v proteinu

K 0,2mL proteina dodamo 0,4mL 10M

uree v 0,5M Tris/HCl (pH=8) in 0,04mL 0,5M DTT

Inkubiraj 20 min pri sobni temperaturi

Dodaj 0,6 ml 20% TCA, premešamo

Pustimo 5 min pri sobni temperaturi

Centrifugiramo (14000min-1) 3min

Supernatant zavržemo

Oborino popovnamo, speremo z 1mL

10%TCA,mešamo, centrifugiramo

Supernatant zavržemo

Ponovimo spiranje še enkrat

Oborino raztopimo v 1ml 8M uree v 0,15M

acetatnem pufru (pH=3) pri T=37Cº

Raztapljamo 15min,občasnom mešamo

Preostanek odcentrifugiramo

0,1ml supernatanta razredči z 0,9 mL 8M uree

v acetatnem pufru (pH=3)

Izmeri A280 proti 8M urei v acetatnem pufru pH=3

V 2,3mL 10M uree v 0,5M Tris/HCl (pH=8)

Dodaj 0,1mL 6mM Ellmanovega reagenta

In toliko 8M uree, da bo cproteina)=0,1mg/mL Na koncu dodamo protein

Slepi probi namesto proteina damo 8M ureo v 0,15M acetatnem pufru (pH=3) in merimo A412 proti slepi probi

Rezultati:

- umeritvena krivulja

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **c(mM)** | **A412 A** | **A412 B** | **A412 C** | **Povprečje** | **n(Cys) [mol]** |
| 0,3 | 0,150 | 0,139 | 0,135 | 0,141 | 3,0.10-8 |
| 0,6 | 0,368 | 0,371 | 0,285 | 0,341 | 6,0.10-8 |
| 0,9 | 0,470 | 0,479 | 0,447 | 0,465 | 9,0.10-8 |
| 1,2 | 0,578 | 0,628 | 0,600 | 0,602 | 12,0.10-8 |
| 1,5 | 0,797 | 0,770 | 0,780 | 0,782 | 15,0.10-8 |
| 1,8 | 0,895 | 0,962 | 0,939 | 0,932 | 18,0.10-8 |
| 2,1 | 1,045 | 1,090 | 1,151 | 1,090 | 21,0.10-8 |



- množina proteina pri določitvi prostih Cys

c(proteina) = 10mg/mL

Mr = 66400g/mol

V(proteina) = 0,6mL



- število prostih Cys v nativnem proteinu

A412 = 0,180



število Cys v nativnem proteinu = 

- število Cys v denaturiranem proteinu

A412 = 0,163



število Cys v denaturiranem proteinu = 

- množina proteina za določitev vseh Cys

c(proteina) = 0,1mg/mL

V(končni) = 3ml

Mr = 66400g/mol



- množina vseh Cys

A412 = 0,905



število Cys v denaturiranem proteinu = 

Diskusija:

Pri določevanju Cys v nativnem in denaturiranem proteinu smo določili v obeh primerih manj kot polovica Cys na protein. Ta rezultat bi lahko vzeli, kakor da ni nevezanih Cys v našem proteinu. Ker pa smo pri določevanju vseh Cys določili ravno 38,5 Cys na protein, bi rekel, da je v proteinu 38 Cys, ki so povezani z disulfidnimi vezmi in en Cys, ki ni vezan. To pa zaradi ~0,4 nevezanega Cys na protein. Če nevezani Cys nebi bilo, potem bi moral biti rezultat bližje ničli.

Rezultati:

Število nevezanih Cys v proteinu je 1. Število vseh Cys v proteinu je 39, izmed katerih je 38 povezanih z disulfidnimi vezmi.

Odgovori na vprašanja:

1. Rezultati pri denaturiranim in nativnim proteinom niso enaki. Pri nativnem proteinu imamo na površini nevezane Cys, medtem ko so v notranjosti večinoma vezani Cys. Ko mi protein denaturiramo, se notranji nevezani Cys, katerih je običajno manj, obrnejo navzven, tisti, ki so bili zunaj pa se lahko zakrijejo v notranjost. To potem povzroči zmanjšanje števila Cys v denaturiranem proteinu.
2. Po rezultatih gledano, naj bi nebi bilo prostih Cys, medtem ko je vseh Cys ravno 38,5 iz česar pa lahko sklepamo, da ker pri prostih Cys dobimo nekaj manj kot 0,5 Cys in pri vseh 38,5, da je en Cys prost, medtem ko je disulfidno vezanih 38. Disulfidnih vezi je torej 19.