

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 epruvel, 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 A_{412} proti slepemu vzorcu

 Nariši umeritveno krivuljo

Metode in delo:

- umeritvena krivulja:

0,6 mL proteina z $c=10\text{mg/mL}$ (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 A_{412} proti slepemu vzorcu
Iz umerivene krivulje določimo število prostih Cys
- določitev števila prostih Cys v nativnem proteinu

0,6 mL proteina z $c=10\text{mg/mL}$ (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 A_{412}
Iz umeritvene krivulje določimo število prostih Cys v
denaturiranem proteinu

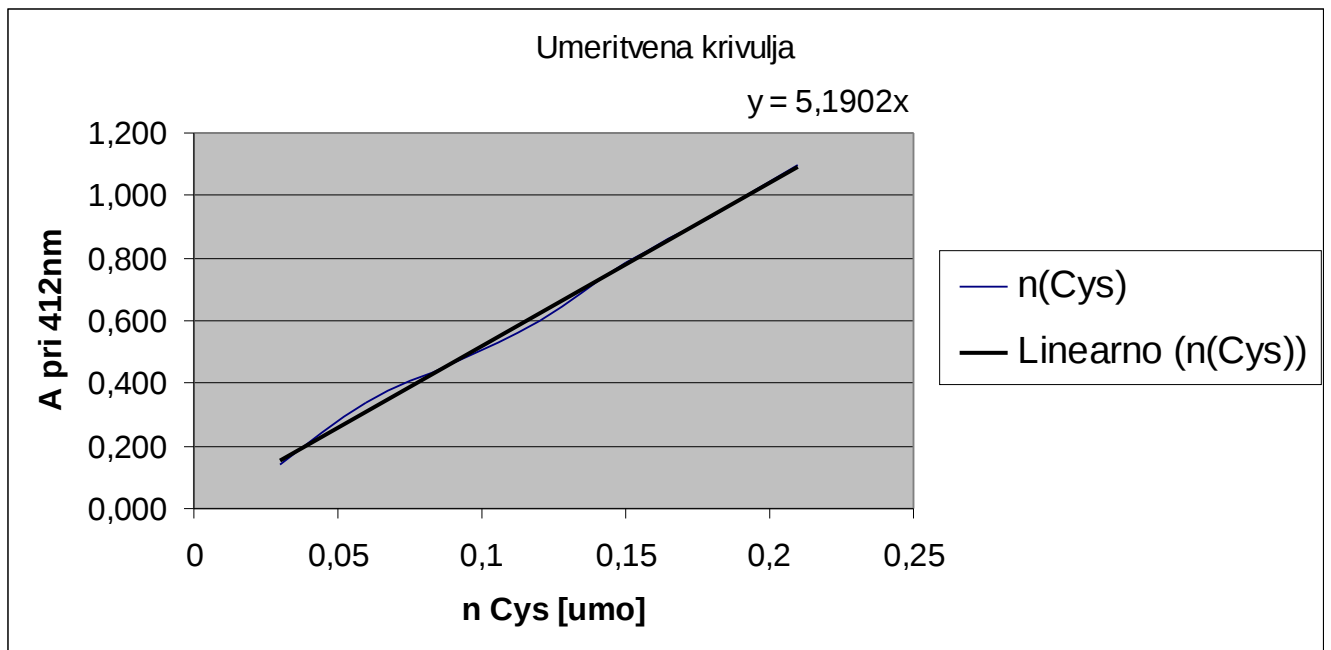
- določitev števila prostih Cys v denaturiranem proteinu

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 pufri (pH=3) pri $T=37\text{C}^{\circ}$
Raztapljamo 15min, občasno mešamo
Preostanek odcentrifugiramo
0,1ml supernatanta razredči z 0,9 mL 8M uree
v acetatnem pufri (pH=3)
Izmeri A_{280} proti 8M urei v acetatnem pufri pH=3
- določitev števila vseh Cys v proteinu

V 2,3mL 10M uree v 0,5M Tris/HCl (pH=8)
 Dodaj 0,1mL 6mM Ellmanovega reagenta
 In toliko 8M uree, da bo $c_{\text{proteina}}=0,1\text{mg/mL}$ Na koncu dodamo protein
 Slepí probi namesto proteina damo 8M ureo v 0,15M acetatnem pufru (pH=3) in merimo A_{412}
 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	$3,0 \cdot 10^{-8}$
0,6	0,368	0,371	0,285	0,341	$6,0 \cdot 10^{-8}$
0,9	0,470	0,479	0,447	0,465	$9,0 \cdot 10^{-8}$
1,2	0,578	0,628	0,600	0,602	$12,0 \cdot 10^{-8}$
1,5	0,797	0,770	0,780	0,782	$15,0 \cdot 10^{-8}$
1,8	0,895	0,962	0,939	0,932	$18,0 \cdot 10^{-8}$
2,1	1,045	1,090	1,151	1,090	$21,0 \cdot 10^{-8}$



- množina proteina pri določitvi prostih Cys

$$c_{(\text{proteina})} = 10 \text{ mg/mL}$$

$$M_r = 66400 \text{ g/mol}$$

$$V_{(\text{proteina})} = 0,6 \text{ mL}$$

$$n_{(\text{proteina})} = \frac{c \cdot V}{M_r} = \frac{0,01 \text{ g/ml} \cdot 0,6 \text{ mL}}{66400 \text{ g/mol}} = 0,0903 \mu\text{mol}$$

- število prostih Cys v nativnem proteinu

$$A_{412} = 0,180$$

$$n(\text{Cys}) = \frac{A_{412}}{5,1902} = \frac{0,180}{5,1902} = 0,0347 \mu\text{mol}$$

$$\text{število Cys v nativnem proteinu} = \frac{n_{(\text{Cys})}}{n_{(\text{proteina})}} = \frac{0,0347 \mu\text{mol}}{0,0903 \mu\text{mol}} = 0,384$$

- število Cys v denaturiranem proteinu

$$A_{412} = 0,163$$

$$n(\text{Cys}) = \frac{A_{412}}{5,1902} = \frac{0,163}{5,1902} = 0,0314 \mu\text{mol}$$

$$\text{število Cys v denaturiranem proteinu} = \frac{n_{(\text{Cys})}}{n_{(\text{proteina})}} = \frac{0,0314 \mu\text{mol}}{0,0903 \mu\text{mol}} = 0,348$$

- množina proteina za določitev vseh Cys

$$c_{(\text{proteina})} = 0,1 \text{ mg/mL}$$

$$V_{(\text{končni})} = 3 \text{ ml}$$

$$M_r = 66400 \text{ g/mol}$$

$$n_{(\text{proteina})} = \frac{c_{(\text{proteina})} \cdot V_{(\text{proteina})}}{M_r} = \frac{0,0001 \text{ g/ml} \cdot 3 \text{ ml}}{66400 \text{ g/mol}} = 4,518 \text{ nmol}$$

- množina vseh Cys

$$A_{412} = 0,905$$

$$n(\text{Cys}) = \frac{A_{412}}{5,1902} = \frac{0,905}{5,1902} = 0,174 \mu\text{mol}$$

$$\text{število Cys v denaturiranem proteinu} = \frac{n_{(\text{Cys})}}{n_{(\text{proteina})}} = \frac{0,174 \mu\text{mol}}{0,004518 \mu\text{mol}} = 38,51$$

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:

6. 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.
7. 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.