

Bílkoviny

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Martin Vejražka, Jan Pláteník, Lenka Fialová



2021/22

Obsah

ÚLOHA 1 – NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA BÍLKOVIN SÉRA	3
1. PRINCIP ÚLOHY	3
2. PROVEDENÍ ÚLOHY	4
3. VYHODNOCENÍ	9
ÚLOHA 2 – SROVNÁNÍ NATPAGE A SDS-PAGE	10
ÚLOHA 3 – VYBRANÉ REAKCE AMINOKYSELIN A BÍLKOVIN	10
1. NINHYDRINOVÁ REAKCE	11
2. XANTOPROTEINOVÁ REAKCE	13
3. REAKCE NA CYSTEIN – PRŮKAZ SÍRY V MOLEKULÁCH BÍLKOVIN	14
4. BIURETOVÁ REAKCE	14
ÚLOHA 4 - REVERZIBILNÍ SRÁŽENÍ PROTEINŮ	16
SRÁŽENÍ PROTEINŮ ALKOHOLEM	17
SRÁŽENÍ VAJEČNÉHO PROTEINU CHLORIDEM SODNÝM A JEHO OPĚTNÉ ROZPUŠTĚNÍ	17
ÚLOHA 5 - SRÁŽENÍ PROTEINŮ SPOJENÉ S DENATURACÍ	17
SRÁŽENÍ SOLEMI TĚŽKÝCH KOVŮ	18
SRÁŽENÍ MINERÁLNÍMI KYSELINAMI	18
SRÁŽENÍ ORGANICKÝMI KYSELINAMI	18
SRÁŽENÍ BÍLKOVIN VYSOKOU TEPLOTOU (VAREM)	18

Úloha 1 – Nativní elektroforéza bílkovin séra

1. Princip úlohy

Nativní elektroforéza sérových bílkovin je stále jedním ze základních vyšetření v klinické biochemii. V tomto praktickém cvičení ji použijeme jako obecný příklad elektroforetického dělení proteinů.

V tomto uspořádání se dělí nativní, tedy nedenaturované bílkoviny séra v zásaditém prostředí. Téměř všechny sérové proteiny mají za těchto podmínek záporný náboj, takže v elektrickém poli putují od záporné ke kladné elektrodě. Elektroforézu je možné provádět na různých nosičích; v tomto praktiku použijeme relativně řídký polyakrylamidový gel. Je dostatečně pevný pro zpracování, současně jsou ale jeho póry natolik velké, že podstatnou měrou neomezují ani pohyb makromolekul. Rychlost, kterou bílkoviny v elektrickém poli putují, tak závisí především na hustotě náboje v jejich molekule.

Krevní sérum obsahuje několik set různých bílkovin. Hustota náboje v jejich molekulách je různá, takže je pomocí nativní elektroforézy můžeme rozdělit na řadu frakcí.

Aby byly jednotlivé frakce ostré, je třeba, aby se začaly všechny bílkoviny vzorku dělit současně. Proto vlastnímu elektroforetickému dělení na separačním polyakrylamidovém gelu předchází koncentrace vzorku na jeho začátku. Použijeme tedy tzv. diskontinuální systém: Vzorky nejprve projdou *koncentračním gelem*, který má odlišné vlastnosti (mírně kyselé pH, nižší koncentrace složek pufru) a pak teprve vstupují do separačního gelu. V elektrickém poli se v koncentračním gelu pohybují jak složky pufru, který tak postupně v různých částech gelu mění své vlastnosti, tak i bílkoviny, které zde mají relativně malý náboj. Kombinací těchto dějů a vzájemnou interakcí částic dojde k tomu, že se na rozhraní koncentračního a separačního gelu dostanou všechny bílkoviny do jedné úrovně a do separačního gelu díky tomu vstoupí současně.


Celý pokus se skládá z několika kroků:




1. Nejprve se připraví separační polyakrylamidový gel. Vzniká polymerací akrylamidu. Aby polymer nevytvářel jen nevětvená vlákna, přidává se k monomerům akrylamidu ještě bisakrylamid, který během polymerace vytvoří mezi vlákny příčné můstky, takže vznikne trojrozměrná síťovitá struktura. Akrylamid polymeruje mezi dvěma deskami (v našem případě mezi sklem a eloxovanou hliníkovou deskou) bez přístupu vzduchu. Pro účely praktického cvičení je tento krok již hotový.
2. Před „začátek“ separačního gelu se připraví koncentrační gel. Jde rovněž o polyakrylamidový gel, má však jinou hustotu a obsahuje jiný pufr. Do koncentračního gelu se pomocí tzv. hřebínku vytvoří jamky, do nichž se později nanesou vzorky.
3. Vzorky séra se ředí stejným pufrům, jaký byl použit pro koncentrační gel, a aby se usnadnilo jejich nanášení, přidává se k nim barvivo a glycerol. Glycerol má velkou hustotu, takže vzorky při nanášení na gel klesají ke dnu jamek.
4. Připravenými vzorky se naplní jamky v gelu a proběhne vlastní elektroforetické dělení.
5. Rozdělené bílkoviny se denaturují, díky čemuž se v gelu přestanou pohybovat a v následujících krocích je již není možné z gelu vymýt, a obarví se vhodným organickým barvivem.
6. Nakonec se získaný elektroforeogram hodnotí. Plocha a intenzita zbarvení jednotlivých frakcí je přibližně úměrná hmotnostní koncentraci bílkoviny. V tomto cvičení demonstrujeme především vizuální hodnocení; v praxi se gely fotografují nebo skenují, získaný obraz se měří a kvantitativně vyhodnocuje.




2. Provedení úlohy

Příprava separačního gelu

Chemikálie a pomůcky

Pufr pro separační gel (Tris-HCl 375 mmol·l⁻¹, pH 8,8) 

Směs akrylamid-bisakrylamid 30 % : 0,8 % v čištěné vodě   

APS – peroxidisíran amonný 10%   

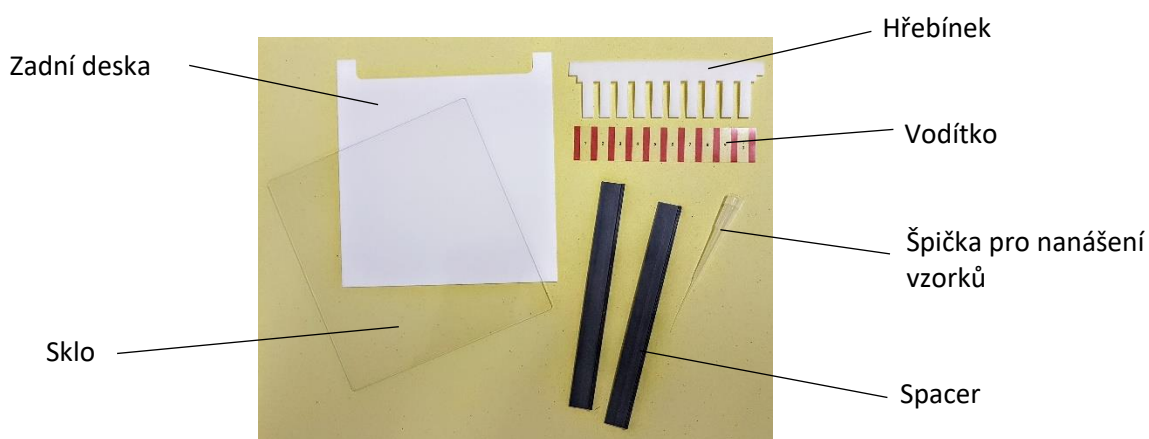
TEMED - N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin     

1-butanol   

Sklo a zadní deska pro gel 10 × 10,5 cm

Spacery 0,75 mm

Držák a kolébka pro nalévání gelů



Postup

Demonstrace postupu: <https://www.medicalmedia.eu/cs/Detail/1452>



Pro praktická cvičení jsou separační gely již připravené. Postup zde uvádíme jen pro informaci. Vlastní praktická úloha začíná následujícím krokem – přípravou koncentračního gelu.

Sklo, zadní deska a spacery musejí být dokonale čisté, bez zaschlých kapek vody a otisků prstů. Pracujeme v rukavicích.

1. Na sklo nakreslete lihovým fixem čáru 3 cm od okraje. Tato čára označuje, do jaké výšky se bude nalévat separační gel.

- Sestavte „sendvič“ pro nalití gelu – mezi sklo a zadní desku vložte spacers. Čára je na vnější straně skla nahoře, výřez v zadní desce je také nahoře.
 - Sendvič vložte do držáku na nalévání gelu. Dolní konec skla, zadní desky a spacerů zarovnejte o desku stolu tak, aby držák přesahovaly asi o 1 mm.
 - Postupně dotáhněte šrouby na držáku. Je třeba je utáhnout pevně, ale rovnoměrně tak, aby sklo neprasklo.
 - Do kolébky vložte těsnění – dospod šedé pěnové, na něj černé pryžové. Gumové těsnění musí být čisté, bez zaschlých kapek vody.
 - Držák se sendvičem vložte do kolébky (šrouby směřují ven) a zajistěte dotahovací páčkami. Sendvič zatím nedotahujte proti těsnění v kolébce – delší část rukojeti páček směřuje dolů.
7. V odsávací baňce připravte gel:


Počet gelů	2	4	6
Pufr pro separační gel 1x	7,89 ml	15,8 ml	23,7 ml
Akrylamid – Bis 30 % : 0,8 % 	2,00 ml	4,0 ml	6,0 ml
Odsávací baňku uzavřít, připojit k vývěvě a roztok 2 minuty odvětrávat			
APS 10%	100 µl	200 µl	300 µl
Promíchat opakovaným protažením špičkou a pak opatrným kroužením baňkou – při pipetování i promíchávání zabránit vzniku bublin.			
TEMED	10 µl	20 µl	30 µl
Promíchat opakovaným protažením špičkou a pak kroužením baňkou, zabránit vzniku bublin. Materiál okamžitě dále zpracovávat – gel začíná polymerovat.			


- Dotáhněte držák se sendvičem proti těsnění v kolébce – otočte páčky delší částí rukojeti nahoru. Pak 5ml automatickou pipetou nalijte gel mezi sklo a zadní desku tak, aby hladina dosahovala k čáře. Pracujte rychle, ale tak, aby v gelu neuvázly bubliny vzduchu.
- Ihned poté opatrně převrstvěte gel přibližně 0,5 ml 1-butanolu .
- Nechejte gel polymerovat alespoň 1 hodinu při pokojové teplotě. Zbytek gelu z odsávací baňky vylijte do plastové zkumavky – slouží pro kontrolu, že gel polymeruje. Odsávací baňku vypláchněte.
- Po ztuhnutí gelu vyjměte držák z kolébky, povolte šrouby a vyjměte sendvič s nalitým gelem. Slijte butanol.
- Připravený gel je možné skladovat ve vlhku při 4 °C, např. zabalený do papírového ručníku navlhčeného vodou.

Příprava koncentračního gelu

Chemikálie a pomůcky

Pufr pro koncentrační gel (Tris-HCl 150 mmol·l⁻¹, pH 6,8) 

Směs akrylamid-bisakrylamid 30 % : 0,8 % v čištěné vodě 

APS – peroxodisíran amonný 10% 

TEMED - N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin 

Sendvič s nalitým separačním gelem

Hřebínek 0,75 mm pro 10 jamek

Elektroforetická vana – spodní díl a katodový blok, svorky





Silnější filtrační papír nastříhaný na proužky asi 7 × 4 cm


Postup

Demonstrace postupu: <https://www.medicalmedia.eu/cs/Detail/1453>



1. Sendvič se separačním gelem zbavte zbytku butanolu – stříčkou pečlivě opláchněte horní hranu gelu čištěnou vodou. Zbytky vody odsajte pruhem filtračního papíru.
2. Do elektroforetické vany zasuňte katodový blok s vloženým pěnovým těsněním. K němu přiložte sendvič s gelem. Zadní deska je výřezem nahoře a dotýká se pěnového těsnění.
3. Sendvič upevněte ke katodovému bloku pomocí svorek. Horní okraj sendviče by měl být v úrovni horního okraje katodového bloku. Delší část svorky se dotýká skla, kratší katodového bloku.
4. Uvedeným způsobem upevněte do elektroforetické vany dva gely. Pokud se má pracovat jen s jedním gelem, upevněte místo druhého prázdnou skleněnou desku.
5. V odsávací baňce připravte koncentrační gel:


Pro 4 gely	
Pufr pro koncentrační gel 1x 	4,32 ml
Akrylamid – Bis 30 % : 0,8 % 	625 µl
Odsávací baňku uzavřít, připojit k vývěvě a roztok 2 minuty odvzdušňovat	
APS 10% 	50 µl
Promíchat opakovaným protažením špičkou a pak opatrným kroužením baňkou – při pipetování i promíchávání zabránit vzniku bublin.	
TEMED 	5 µl
Promíchat opakovaným protažením špičkou a pak kroužením baňkou, zabránit vzniku bublin. Materiál okamžitě dále zpracovávat – gel začíná polymerovat.	

6. 1 ml koncentračního gelu  převrstvěte na separační gel. Poté mezi sklo a zadní desku zasuňte hřebínek. Jeho zuby v koncentračním gelu vytvoří jamky pro nanášení vzorků.
7. Nechejte koncentrační gel polymerovat 30 minut při pokojové teplotě. Zbytek gelu z odsávací baňky vylijte do plastové zkumavky – slouží ke kontrole, že gel polymeruje. Odsávací baňku a pomůcky očistěte.

Nanášení vzorků a spuštění elektroforézy

Chemikálie a pomůcky

Vzorky séra ředěné 12× směsí pufru pro koncentrační gel, bromfenolové modři a glycerolu 

Tris-glycinový pufr (Tris 25 mmol·l⁻¹, glycin 192 mmol·l⁻¹, pH asi 8,3) 

Elektroforetická vana s upevněným gelem, víko, zdroj pro elektroforézu



Vodítko pro nanášení vzorků

Špičky pro nanášení vzorků do gelu („gel-load“)




Postup

Demonstrace postupu: <https://www.medicalmedia.eu/cs/Detail/1454>

1. Do katodového prostoru nalijte kádinkou vychlazený elektroforetický pufr  tak, aby sahal asi 2 mm nad zářez v zadní desce. Stejný pufr nalijte i do elektroforetické vany tak, aby byly dosahoval k kraji výlisku (pro naplnění vany je třeba 250 ml pufru).
2. Navlhčete vodítko pro nanášení vzorků a „přilepte“ jej na sklo tak, aby červené plochy byly přesně mezi zuby hřebínku. Bezbarvé plochy s čísly označují jednotlivé jamky v gelu.
3. Opatrně vyjměte hřebínek.
4. Do jamek nanášejte pomocí tenkých špiček po 10 µl připravených (ředěných a obarvených) vzorků séra .
5. Připojte hadice chlazení a nechejte protékat chladicí vodu.
6. Elektroforetickou vanu uzavřete víkem. Dbejte na správnou polaritu – konektory jsou barevně označené.
7. Zapojte kabely do zdroje. Nastavte napětí 400 V. Elektroforéza probíhá přibližně 20 minut. Bromfenolová modř, kterou jsou vzorky obarvené, putuje přibližně s nejrychlejší frakcí (albuminem).

Barvení gelu

Chemikálie a pomůcky




Barvicí roztok – Coomassie brilliantní modř G250, kyselina trichloroctová, pomocné látky (kyselina sírová, hydroxid draselný) 

Plastová krabička s víkem
Špachtle pro sejmutí gelu
Vývěva se sběrnou lahví
Mikrovlnná trouba



Postup

Demonstrace postupu: <https://www.medicalmedia.eu/cs/Detail/1455>

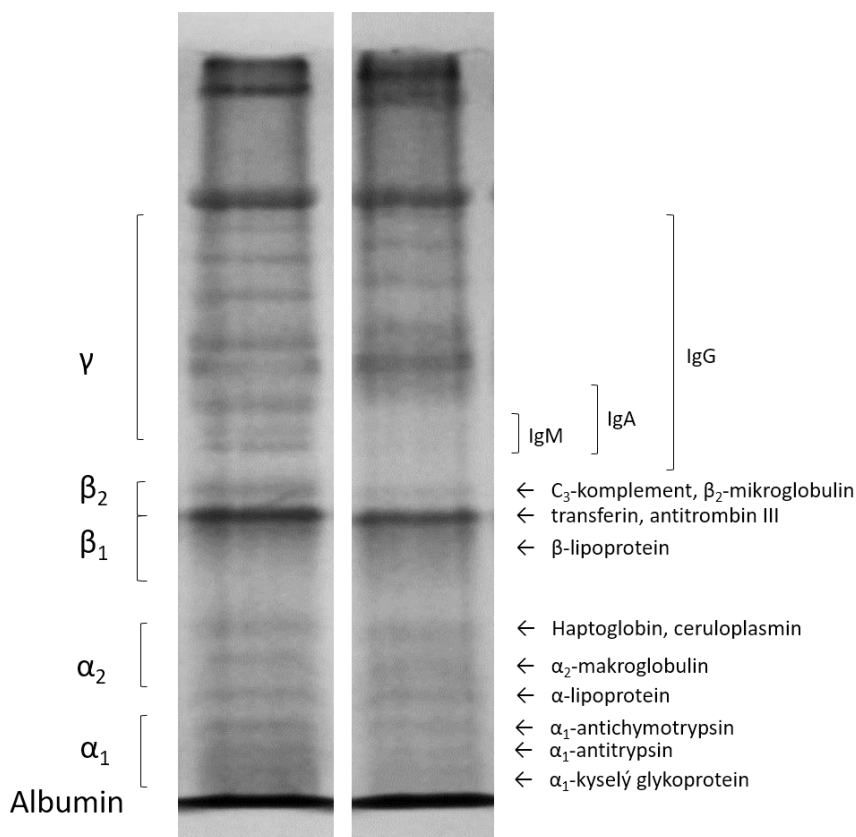
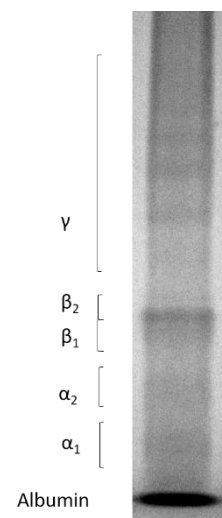
1. Vypněte elektroforetický zdroj a odpojte kabely. Pak teprve otevřete víko elektroforézy.
2. Vypněte chlazení a odpojte hadice.
3. Vyjměte katodový blok i s gely a slijte katodový pufr  do elektroforetické vany. Dejte pozor, abyste do pufru nenalili chladicí vodu, která zůstala v bloku – trubičky pro připojení chladicího okruhu zacpěte prstem. Poté z bloku sundejte sendviče s gelem.
4. Ze sendviče opatrně vyjměte spacersy.
5. Opatrně „rozlepte“ sendvič tak, aby gel zůstal jen na zadní desce nebo jen na skle. Plastovou špachtlí odřízněte a odstraňte koncentrační gel.
6. Desku s gelem vložte do krabičky s 2-3 cm čišťené vody. Pomocí špachtle gel jemně sejmete z desky; dávejte pozor, aby se gel neroztrhnul. Desku vyjměte.
7. Vylijte destilovanou vodu (popřípadě její zbytky odsajte vývěvou) a gel převrstvěte asi 3 mm barvicího roztoku . Nakláněním krabičky gel rozbalte do plochy a zcela smočte barvicím roztokem.
8. Krabičku přikryjte víkem (ale víko neuzavírejte po celém obvodu) a barvicí roztok s gelem ohřejte k varu v mikrovlnné troubě (asi 40 s při 700 W). Gel nechejte v horkém barvicím roztoku asi 1 minutu, obsah krabičky opatrně promíchejte pomalým nakláněním. Bílkoviny se v tomto kroku barví světle hnědě nebo nazelenale.
Varování: Může dojít k utajenému varu. Vroucí barvicí roztok je silně žíravý.
9. Opatrně odsajte barvicí roztok  pomocí vývěvy. Je třeba dávat pozor, aby se při odsávání nepoškodil gel.
10. Gel opakovaně opláchněte nadbytkem čišťené vody. Vodu je možné odsát nebo slít do dřezu. Po posledním opláchnutí nechejte gel v čišťené vodě. Bílkovinné frakce budou obarvené jasně modře.
11. Pro hodnocení je možné gel fotografovat nebo skenovat.
12. Pro uchování lze gel přenést na silnější filtrační papír, překrýt průhlednou fólií a usušit mezi vrstvami savého materiálu. Po úplném usušení je nožné průhlednou fólií sejmut.

3. Vyhodnocení

Cílem tohoto praktického cvičení je především demonstrovat elektroforézu jako separační techniku; elektroforetickým frakcím lidského séra se budeme věnovat v letním semestru. Přesný popis výsledného elektroforeogramu tedy přesahuje záměr tohoto textu a na tomto místě uvádíme základní údaje spíše pro zajímavost.

Při nativní elektroforéze sérových bílkovin nejrychleji putuje albumin. Pomaleji migrují globuliny, které lze podle pohyblivosti uspořádat do několika skupin označovaných řeckými písmeny α , β a γ . V závislosti na přesném uspořádání experimentu se tyto frakce dále dělí – běžně se α -globuliny dělí na α_1 a α_2 a podobně β -globuliny se dělí na β_1 a β_2 .

Lidské sérum ovšem obsahuje velké množství bílkovin, takže každá z takto klasicky popisovaných frakcí obsahuje řadu specifických proteinů. Mnoho bílkovin, byť v nižších koncentracích, je i mezi intenzivněji zbarvenými poli, která jsou vidět na první pohled. Uspořádání experimentu, které jsme pro nativní elektroforézu použili v našem pokusu, je dosti citlivé a pokud bychom použili nižší napětí, našli bychom podstatně větší počet frakcí, než se obvykle popisuje.



Výsledek nativní elektroforézy dvou vzorků séra. Uspořádání bylo podobné, jako v prováděném experimentu, dělení ale probíhalo při nižším napětí (100 V). Každá z obvykle popisovaných frakcí (popis vlevo) se rozpadá do několika ostrých pruhů. Vpravo je vyznačena pozice vybraných bílkovin.

Úloha 2 – Srovnání natPAGE a SDS-PAGE

Diskontinuální elektroforéza bílkovin v polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek v přítomnosti aniontového detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) představuje jiný typ elektroforézy proteinů, dnes velice rozšířený především ve výzkumných laboratořích. Technika je podrobněji popsána v samostatné stati o elektroforéze. Hlavní rozdíly mezi nativní elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (natPAGE), kterou jsme prováděli v předchozí úloze, a SDS-PAGE lze shrnout takto:

	natPAGE	SDS-PAGE
Funkce gelu jako molekulového síta	NE	ANO
Rozlišovací schopnost	Menší	Vysoká
Stav dělených proteinů	Nativní - 3D struktura včetně vazeb mezi podjednotkami a biologická aktivita v zásadě zachována.	Denaturované - bez 3D struktury a obalené záporně nabitým SDS. Vazby mezi podjednotkami přerušeny.
Dělení proteinů probíhá na základě	Povrchové hustoty náboje	Velikosti polypeptidových řetězců
Příklad použití	Vyšetření spektra bílkovin lidského séra	Detekce specifické bílkoviny ve vzorku tkáně (spolu s Western immunoblotem)

Provedení

K dispozici je hotový a obarvený gel z SDS-PAGE, se vzorkem séra a několika čistými bílkovinami. Porovnejte výsledek dělení oběma typy elektroforézy a pokuste se nalezené rozdíly vysvětlit.

Úloha 3 – Vybrané reakce aminokyselin a bílkovin

Pro aminokyseliny je charakteristická současná přítomnost karboxylové skupiny $-\text{COOH}$ a aminoskupiny $-\text{NH}_2$. Některé aminokyseliny v postranním řetězci obsahují další funkční skupiny jako např. $-\text{SH}$, $-\text{OH}$, guanidinovou skupinu nebo aromatické jádro. Přítomnost těchto struktur podmiňuje různé barevné reakce, které lze použít k orientačnímu stanovení aminokyselin. Pro volnou α -aminoskupinu všech aminokyselin je společná **ninhydrinová reakce**. Aromatické jádro ve struktuře tyrosinu, fenylalaninu nebo tryptofanu poskytuje **xantoproteinovou reakci**. Fenolová (tyrosin) a imidazolová (histidin) skupina mohou reagovat s **diazoniovými solemi**. Sulfhydrylovou ($-\text{SH}$) skupinu cysteinu lze prokázat reakcí s **Pb^{2+} ionty**.

Aminokyseliny se spojují peptidovou vazbou a vytvářejí peptidy a bílkoviny. Průkaz peptidové vazby **biuretovou reakcí** s Cu^{2+} ionty se využívá pro stanovení koncentrace celkové bílkoviny ve vzorku.

Funkční skupiny v postranních řetězcích aminokyselin v polypeptidovém řetězci reagují obdobně jako volné aminokyseliny. Reakce specifické pouze pro určité aminokyseliny lze tedy využít i k orientačnímu zjištění, zda určitý peptid nebo protein danou specifickou aminokyselinu obsahuje či nikoliv. V našem praktickém cvičení budeme takto srovnávat reaktivitu dvou bílkovin: **vaječného albuminu a želatiny**. Vaječný albumin je příkladem plnohodnotné bílkoviny, obsahující všechny aminokyseliny. Želatina je produkt denaturace a částečné hydrolýzy kolagenu, z aminokyselin převažuje glycin, prolin, hydroxyprolin a kyselina glutamová, zatímco obsah aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu je nízký, a tryptofan stejně jako cystein prakticky chybí.


1. Ninhydrinová reakce

S ninhydrinem reaguje amoniak a primární alifatické aminy, tedy i všechny aminokyseliny, které obsahují volnou aminoskupinu. V závislosti na testované aminokyselině vzniká při reakci s ninhydrinem modrofialový až hnědý produkt. Ninhydrinovou reakci poskytují i iminokyseliny – prolin a hydroxyprolin, vzniklý produkt má však žluté zbarvení. V peptidech a proteinech jsou aminoskupiny vázány v peptidové vazbě, ale mohou reagovat ϵ -aminoskupiny lysinu nebo koncové $-\text{NH}_2$ skupiny.

Ninhydrinová reakce se často využívá při stanovení aminokyselin. V lékařství našla uplatnění při vyšetřování poruch jejich metabolismu, jako je např. fenylketonurie. Ninhydrinové reakce lze například použít jako detekční reakce při kvalitativním průkazu aminokyselin v krvi nebo moči metodou papírové nebo tenkovrstevné chromatografie. Jiným příkladem využití je kvantitativní analýza obsahu jednotlivých aminokyselin v polypeptidech. Při ní se analyzovaný polypeptid nejprve hydrolyzuje (tj. rozštěpí se všechny peptidové vazby), výsledná směs aminokyselin se dělí ionexovou chromatografií, následnou detekci jednotlivých aminokyselin opět usnadňuje jejich reakce s ninhydrinem.

Chemikálie

Testované vzorky: alanin $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, tyrosin $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (rozpuštěn s kys. octovou), prolin $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, roztok vaječného albuminu $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, roztok želatiny $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

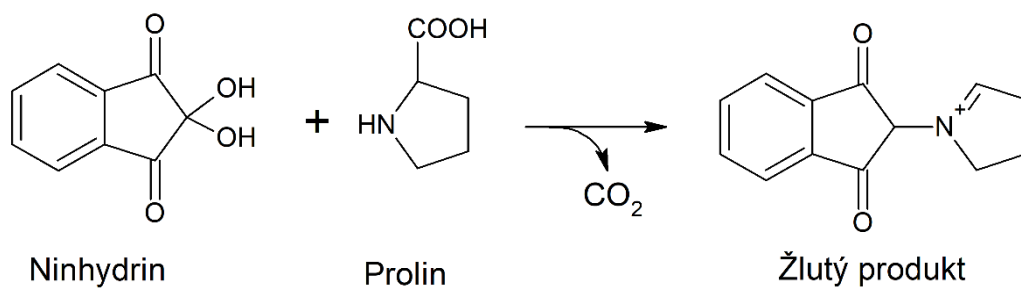
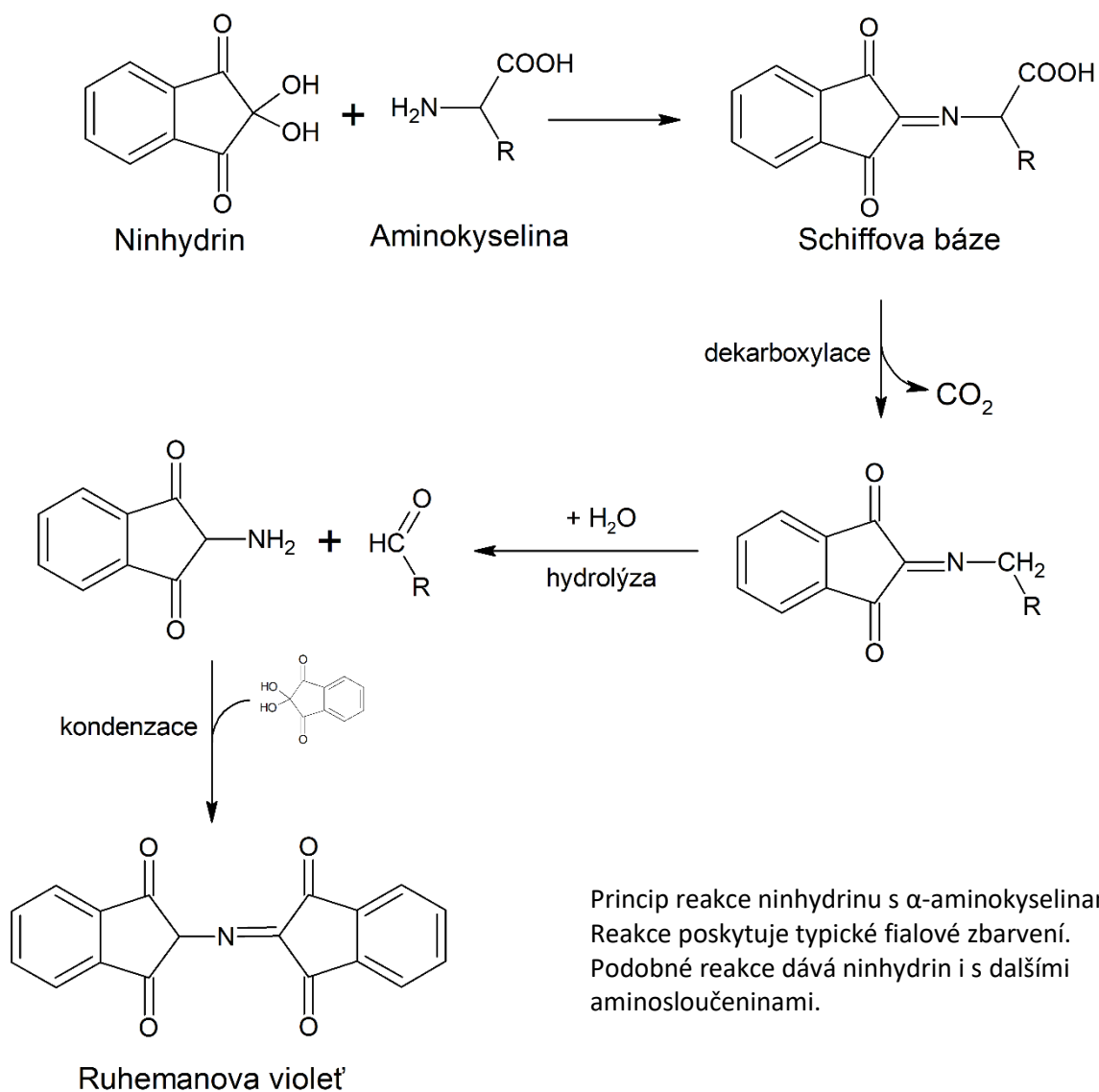
Ninhydrin $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v etanolu 

Provedení

Do pěti zkumavek podle tabulky připravte následující reakční směsi:

	1 Alanin	2 Tyrosin	3 Prolin	4 Albumin	5 Želatina
Alanin	asi 0,5 ml	–	–	–	–
Tyrosin	–	asi 0,5 ml	–	–	–
Prolin	–	–	asi 0,5 ml	–	–
Vaječný albumin	–	–	–	asi 0,5 ml	–
Želatina	–	–	–	–	asi 0,5 ml
Ninhydrin 	několik kapek	několik kapek	několik kapek	několik kapek	několik kapek

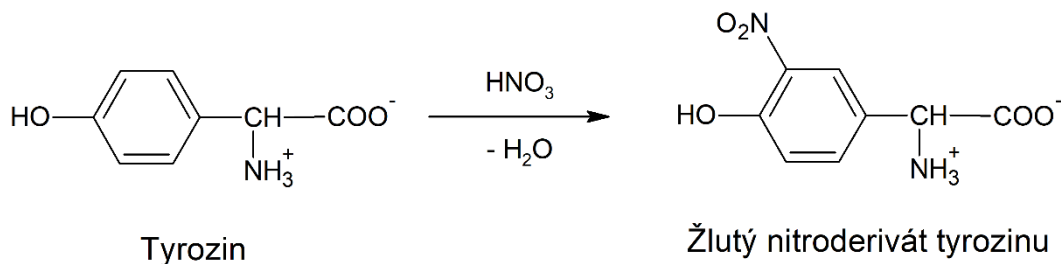
Obsah ve zkumavkách promíchejte, zahřívajte ve vroucí vodní lázni a zaznamenejte změny zbarvení.



Princip reakce ninhydrinu s iminokyselinou prolinem. Výsledkem je produkt, který se strukturou liší od Ruhemanovy violeti a má žluté zbarvení.

2. Xantoproteinová reakce

Pro aromatické jádro je typická nitrace koncentrovanou kyselinou dusičnou. Vzniklé nitroderiváty se vyznačují intenzivně žlutým zbarvením (řecky ξανθός = žlutý). Podobnou reakci poskytují i aminokyseliny, které obsahují aromatické jádro – tyrosin, tryptofan a v menší míře i fenylalanin. Většina bílkovin obsahuje aromatické aminokyseliny, takže s kyselinou dusičnou také reaguje – mluvíme o xantoproteinové reakci. Po přidání koncentrované kyseliny dusičné k roztoku bílkoviny se nejprve vyloučí bílá sraženina denaturovaného proteinu, která po povaření zežloutne.



Žluté zbarvení kůže, které se vyvine po potřísnění kyselinou dusičnou, je výsledkem xantoproteinové reakce s aromatickými aminokyselinami bílkovin obsaženými v epidermis.

Chemikálie

Testované vzorky: alanin 20 g·l⁻¹, tyrosin 1 g·l⁻¹ (rozpuštěn s kys. octovou), roztok vaječného albuminu 20 g·l⁻¹, roztok želatiny 20 g·l⁻¹

Kyselina dusičná koncentrovaná

Provedení

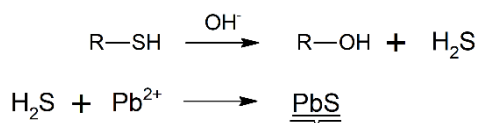
Do čtyř zkumavek podle tabulky připravte následující reakční směsi:

	1 Alanin	2 Tyrosin	3 Albumin	4 Želatina
Alanin	asi 0,5 ml	–	–	–
Tyrosin	–	asi 0,5 ml	–	–
Vaječný albumin	–	–	asi 0,5 ml	–
Želatina	–	–	–	asi 0,5 ml
Kyselina dusičná 	asi 0,5 ml	asi 0,5 ml	asi 0,5 ml	asi 0,5 ml

Obsah ve zkumavkách promíchejte, zkumavku s albuminem opatrně zahřejte. Zaznamenejte všechny změny zbarvení.



3. Reakce na cystein – průkaz síry v molekulách bílkovin


Cystein, stejně tak i bílkoviny obsahující tuto aminokyselinu ve větším množství, uvolňují v silně zásaditém prostředí sulfan, který můžeme následně prokázat reakcí s octanem olovnatým. Vytváří se černohnědá sraženina sulfidu olovnatého:



Chemikálie




Testované vzorky: alanin 20 g·l⁻¹, cystein 1 g·l⁻¹, roztok vaječného albuminu 20 g·l⁻¹, roztok želatiny 20 g·l⁻¹

Octan olovnatý 50 g·l⁻¹  

Hydroxid sodný 2 mol·l⁻¹ (ze základní sady) 

Provedení

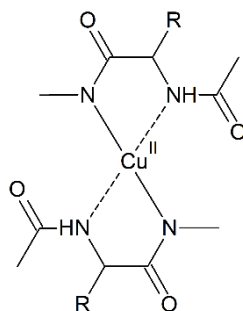
Do čtyř zkumavek podle tabulky připravte následující reakční směsi:

	1 Alanin	2 Cystein	3 Albumin	4 Želatina
Alanin	asi 0,5 ml	–	–	–
Cystein	–	asi 0,5 ml	–	–
Vaječný albumin	–	–	asi 0,5 ml	–
Želatina	–	–	–	asi 0,5 ml
Hydroxid sodný 	asi 1 ml	asi 1 ml	asi 1 ml	asi 1 ml
Octan olovnatý  	2–3 kapky	2–3 kapky	2–3 kapky	2–3 kapky

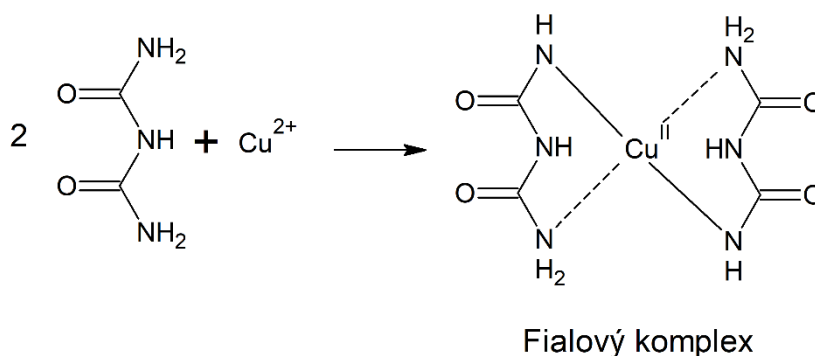
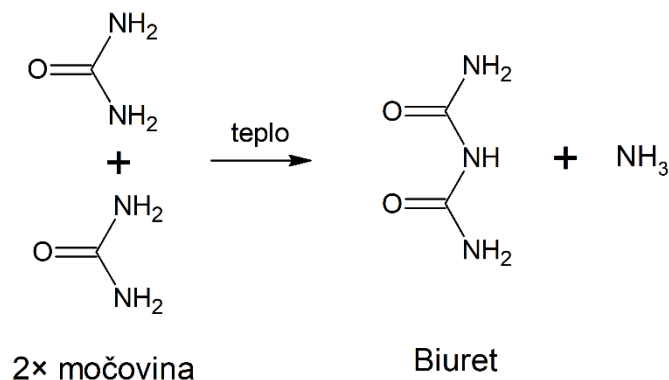
Obsah ve zkumavkách promíchejte a asi 5 minut povařte. Zaznamenejte všechny změny zbarvení.

4. Biuretová reakce

Všechny bílkoviny dávají s měďnatými ionty v alkalickém prostředí fialové zbarvení. Příčinou této barevné změny je vznik komplexu měďnatých iontů s dusíky sousedních peptidových vazeb:





Tato reakce závisí na přítomnosti peptidových vazeb, nikoliv na vlastnostech postranních aminokyselinových zbytků, a poskytují ji tedy všechny proteiny bez rozdílu. Obecně takto reagují všechny látky, které mají v molekule alespoň dvě sousedící amidové skupiny $-\text{CO}-\text{NH}_2$ anebo alespoň dvě peptidové vazby $-\text{CO}-\text{NH}-$. Nejjednodušší sloučeniny, které mohou reagovat, jsou tedy oxamid $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$ a biuret (bis-urea, dimer močoviny), po němž je tato reakce pojmenována:



Biuretová reakce se stále používá pro fotometrické stanovení proteinů v biologickém materiálu, např. v séru.

Pozn.: Tato reakce se nazývá biuretová, protože biuret je látka, která ji též poskytuje. Pokud se ale biuretová reakce použije pro měření proteinu, což je zdaleka nejčastěji, biuret jako takový není vůbec přítomen, není ani ve vzorku, ani se nepoužívá jako reagens.

Chemikálie



1. Močovina (pevná substance)
2. Testované vzorky: alanin $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, vaječný albumin $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, želatina $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
3. Hydroxid sodný, $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (ze základní sady) 
4. Síran měďnatý $70 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (ze základní sady) 

Provedení

a. Příprava biuretu: Do dlouhé skleněné zkumavky vpravte asi 0,1 g (jednu odměrku) močoviny a opatrně zahřejte přímým kontaktem dna zkumavky s ploténkou elektrického vařiče (lze držet v ruce). Močovina teplem taje a mění se na biuret. Jakmile tavenina ztuhne v bílou hmotu, zahřívání ukončete. Nechte vychladnout a rozpustíte biuret v 1 ml deionizované vody.

b. Vlastní biuretová reakce:

Do čtyř zkumavek podle tabulky připravte následující reakční směsi:

	1 Alanin	2 Biuret	3 Albumin	4 Želatina
Alanin	asi 1 ml	–	–	–
Biuret	–	asi 1 ml	–	–
Vaječný albumin	–	–	asi 1 ml	–
Želatina	–	–	–	asi 1 ml
Hydroxid sodný 	asi 1 ml	asi 1 ml	asi 1 ml	asi 1 ml
Síran měďnatý 	1 kapka	1 kapka	1 kapka	1 kapka

Obsah ve zkumavkách promíchejte a zaznamenejte všechny změny zbarvení. Pozitivní reakce se projeví vznikem fialového zbarvení, lépe patrného proti bílému pozadí. Pozor na nadbytek síranu měďnatého - vytváří se pak modrá sraženina hydroxidu měďnatého, která znesnadňuje správné hodnocení.

Úloha 4 - Reverzibilní srážení proteinů

Zastoupení polárních aminokyselinových zbytků v primární struktuře bílkoviny určuje její rozpustnost ve vodě. Některé proteiny jsou ve vodě rozpustné výborně (např. albumin), jiné vůbec (např. kolagen). U bílkovin, které v zásadě ve vodě rozpustné jsou, je stabilita vodného roztoku závislá na intenzitě povrchového náboje proteinu. Ten mimo jiné závisí na pH. V izoelektrickém bodu se povrchový náboj ztrácí a rozpustnost proteinů při tomto pH je nejmenší (podrobněji o náboji proteinů a izoelektrickém bodu v samostatné stati o elektroforéze).

Vyšší koncentrace anorganických solí (hlavně amonných, alkalických kovů a kovů alkalických zemin) vedou k vysrážení bílkovin z roztoku. Vysvětluje se to jednak tím, že anorganické ionty neutralizují povrchový náboj proteinu, jednak tím, že soli soutěží s bílkovinou o molekuly rozpouštědla a odnímají bílkovinám hydratační plášť, nutný pro jejich udržení v roztoku. Obdobně etanol v přítomnosti malého množství solí proteiny sráží, protože je dehydratuje a zároveň snižuje dielektrickou konstantu prostředí (dipóly se více přitahují). Etanol může ale proteiny i denaturovat (viz dále) a k vyloučení tohoto vlivu je třeba snížit teplotu pod 0 °C.

Protože bílkoviny se liší v náchylnosti k precipitaci solemi, změnami pH či alkoholem, lze vhodnou kombinací těchto vlivů směs proteinů rozdělit na více frakcí. Klasickým příkladem je frakcionace bílkovin séra síranem amonným: globuliny se srážejí při poloviční saturaci $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, zatímco albumin až při úplném nasycení roztoku. Frakcionací etanolem za nízkých teplot dle Cohna se bílkoviny lidské krevní plazmy dají rozdělit až do 5 frakcí. Ve všech těchto případech jde o reverzibilní srážení, tedy po



odstranění precipitujícího faktoru se proteiny opět rozpouštějí a jejich biologická aktivita zůstává zachována.


Chemikálie

Roztok vaječné bílkoviny (stejný jako pro úlohu 3)

Krystalický chlorid sodný, s odměrkou

Etanol 


Kyselina octová ředěná 12 g·l⁻¹ (ze základní sady)  

Hydroxid sodný 2 mol·l⁻¹ (ze základní sady) 

Srážení proteinů alkoholem



Provedení


K 1–2 ml vaječné bílkoviny ve zkumavce přidejte několik krystalků chloridu sodného a protřepejte.

Následně přidejte asi 0,5 ml etanolu . Během několika minut se protein vysráží.

Srážení vaječného proteinu chloridem sodným a jeho opětné rozpuštění

Provedení

K asi 2 ml vaječné bílkoviny ve zkumavce přidejte tři odměrky chloridu sodného a 5 kapek zředěné kyseliny octové   a protřepejte. Objeví se bílá sraženina proteinu.




V dalším kroku se pokuste dokázat, že precipitace proteinu je reversibilní: přidejte asi 2 ml deionizované vody ze stříčky a několik kapek hydroxidu sodného . Uzavřete parafilmem, důkladně protřepejte a počkejte, až vyprchají bubliny a opadne pěna. Je nyní roztok vaječné bílkoviny opět čirý?



Úloha 5 - Srážení proteinů spojené s denaturací


Různá chemická činidla stejně jako fyzikální faktory (vysoká teplota) mohou narušit konformaci proteinů. Vedlejší vazebné interakce, které drží pohromadě sekundární, terciární, případně kvartérní strukturu bílkoviny, jsou porušeny, zatímco mnohem pevnější peptidové vazby (a tedy primární struktura proteinu) zůstávají zachovány. Tomuto procesu říkáme denaturace a ve většině případů je nevratný. Biologická aktivita proteinu je závislá na jeho nativní konformaci a s denaturací mizí. Denaturace je zpravidla (ale ne vždy) doprovázena i změnou rozpustnosti proteinu, tedy jeho precipitací.

Chemikálie

Roztok vaječné bílkoviny (stejný jako pro úlohu 3)



Dusičnan olovnatý 5 g·l⁻¹   



Síran měďnatý 70 g·l⁻¹ (ze základní sady)  

Koncentrovaná kyselina dusičná   

Kyselina trichloroctová 30 g·l⁻¹   

Kyselina sulfosalicylová (2-hydroxy-5-sulfobenzoová) 200 g·l⁻¹ 



Kyselina octová 12 g·l⁻¹ (ze základní sady)  

Kyselina octová 100 g·l⁻¹  

Srážení solemi těžkých kovů

Ionty těžkých kovů (olovo, měď, stříbro, rtuť) s proteiny reagují za vzniku komplexních solí a již v malém množství vedou k jejich denaturaci a precipitaci. Přebytek těžkého kovu bílkovinně propůjčí náboj a precipitát se může znovu rozpustit, protein ale zůstává denaturovaný. Vazba těžkých kovů na bílkoviny je důvodem, proč mohou bílkoviny při otravách těžkými kovy působit jako antidota (například mléko při otravách chloridem rtuťnatým – sublimátem).

Provedení


Do dvou zkumavek odlijte po asi 1 ml roztoku vaječné bílkoviny. Do první zkumavky přidejte 1 kapku dusičnanu olovnatého , do druhé 1 kapku síranu měďnatého . Pozorujte, zdali se proteiny srážejí.

Přidáním nadbytku solí těžkých kovů zkuste precipitované bílkoviny zase rozpustit.

Srážení minerálními kyselinami

Koncentrované minerální (anorganické) kyseliny proteiny denaturují a precipitují, protože je dehydratují a tvoří s nimi nerozpustné soli. Precipitace proteinů kyselinou dusičnou se dříve používala jako test na bílkovinu v moči (Hellerova zkouška).



Provedení:

1 ml koncentrované kyseliny dusičné  ve zkumavce se opatrně (kapátkem, po stěně zkumavky) převrství roztokem vaječné bílkoviny tak, aby se oba roztoky nesměsily. Srážení proteinů se projeví jako bílý prstenec na rozhraní obou roztoků.

Srážení organickými kyselinami

Účinek organických kyselin na bílkoviny je analogický působení kyselin minerálních. V klinické biochemii se kyselina trichloroctová používá k deproteinaci séra před analýzami, kde by proteiny rušily. Kyselina sulfosalicylová je klasické činidlo pro průkaz bílkoviny v moči.



Provedení:

Do dvou zkumavek dejte po 1–2 ml vaječné bílkoviny. Do první zkumavky přidejte několik kapek kyseliny trichloroctové  a do druhé několik kapek kyseliny sulfosalicylové . Pozorujte, zdali se proteiny srážejí.

Srážení bílkovin vysokou teplotou (varem)

Ačkoliv známe i extremofilní bakterie prospívající v hlubokomořských pramenech při teplotách nad 100 °C, obecně platí, že většina běžných proteinů za vyšších teplot snadno podléhá denaturaci. V odolnosti jednotlivých proteinů k vyšším teplotám jsou značné rozdíly – zatímco některé ztrácejí nativní konformaci a precipitují již při 50–60 °C, u jiných je třeba kratší či delší povaření. Ne vždy je denaturace následována precipitací – srovnajte například výsledek vaření vejce a mléka. Bude-li se protein denaturovaný varem srážet nebo ne, záleží na řadě faktorů, mimo jiné na koncentraci solí a pH roztoku. Obecně čím je pH blíže k isoelektrickému bodu daného proteinu, tím snadněji bude protein precipitovat.

Provedení:

1. Odlijte asi 2 ml roztoku vaječné bílkoviny a ve vodní lázni zahřejte k varu. Protein se srazí.
2. Do jiné zkumavky dejte 2 ml roztoku vaječné bílkoviny, přidejte jednu kapku kyseliny octové $12 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (ze základní sady) a opět zahřejte k varu. Srovnajte průběh precipitace s předchozí zkumavkou – slabě kyselé pH je blíže isoelektrickému bodu vaječné bílkoviny a protein by se měl srážet rychleji.
3. Do třetí zkumavky dejte opět 2 ml roztoku vaječné bílkoviny a tentokrát přidejte asi 0,5 ml kyseliny octové $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Opět zahřejte k varu. Nyní je prostředí silně kyselé, dá se čekat, že protein i po denaturaci zůstane ionizovaný a srážet se nebude.