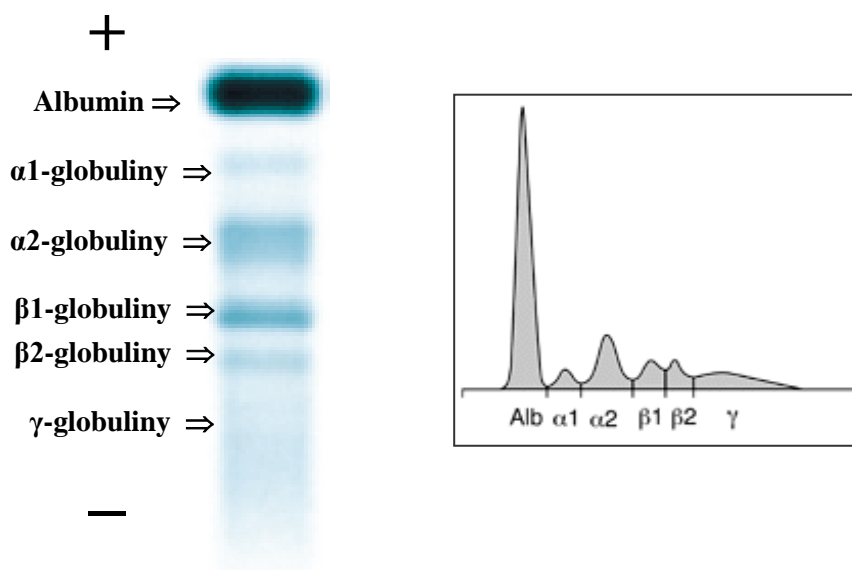


## Elektroforesa proteinů séra v 0,5% agarose

Nativní elektroforesa sérových bílkovin v agarosovém gelu je stále jedním ze základních vyšetření v klinické biochemii a v tomto praktickém cvičení slouží i jako obecný příklad elektroforetického dělení proteinů. Proteiny jsou v tomto uspořádání elektroforesy nativní (tedy nedenanurované), v alkalickém pufru (pH 8,5-9) získávají záporný náboj a putují od záporné elektrody ke kladné. Nosičem je agarosový gel, jehož póry jsou poměrně velké a pohyb molekul proteinů podstatně neomezují, takže dělení proteinů probíhá podle jejich povrchové hustoty náboje. Bílkoviny lidského séra se takto rozdělí do několika klasických frakcí: nejrychleji putuje albumin, za ním pak následují globulinové frakce označené postupně jako  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  (zpravidla rozdělené na  $\beta_1$  a  $\beta_2$ ) a konečně  $\gamma$  globuliny.



**Typický výsledek nativní elektroforesy bílkovin fyziologického lidského séra na agarose, včetně densitometrického vyhodnocení (sestaveno z obrázků dostupných na [www.sebia.com](http://www.sebia.com)).**

Celý experiment sestává z několika kroků:

- Odlévání agarosového gelu: agarosa je polysacharid galaktan získávaný z mořských řas. Pro rozpuštění agarosy ve vodě je třeba směs zahřívát až k varu, během chladnutí roztoku se rozpuštěná vlákna agarosy nekovalentně splétají dohromady a vytvoří gel. Práci s agarosou usnadňuje zajímavý fenomén hystereze – teplota při které se roztok stává gelem je výrazně nižší než teplota nutná k rozpuštění gelu.
- Sérum, které chceme dělit se ředí 10x, zároveň se k němu přidává glycerol pro zvýšení hustoty, což usnadňuje aplikaci vzorku, a bromfenolová modř, což je anionické barvivo, které putuje při elektroforese před proteiny a s její pomocí se postup elektroforesy zviditelňuje.
- Aplikace vzorků séra do jamek v agarose pod hladinu elektroforetického pufru a vlastní elektroforetické dělení.
- Fixace ve směsi metanolu a kyseliny octové denaturuje bílkovinné molekuly a zabrání difuzi proteinových frakcí po elektroforese.
- Barvení: proteinové frakce v gelu se zviditelní pomocí vhodného organického barviva, které se na proteiny nekovalentně váže. Nejčastěji se používá Coomassie Brilliant Blue anebo (jako v našem experimentu) amidočern.
- Odbarvení: odmyje se přebytek barviva z gelu k získání bezbarvého pozadí, na kterém jsou proužky obarvených proteinů dobře vidět.
- Vyhodnocení výsledného elektroforeogramu může být buď vizuální (kvalitativní) anebo též densitometrické (kvantitativní). V našem pokuse budeme výsledek hodnotit pouze vizuálně. Pokud se ale tato elektroforesa provádí v klinické biochemii, intenzita získaných proteinových frakcí se

měří pomocí densitometru. Jde v podstatě o fotometrii, přístroj kontinuálně proměří absorbanci v dráze vzorku. Plocha pod vrcholy densitometrické křivky je úměrná množství proteinů v jednotlivých frakcích (viz obr. výše).

## **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.

## **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.

### ***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 bílkovině 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).

### ***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).

### ***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.

### ***Srážení bílkovin vysokou teplotou (varem)***

Ačkoliv známe i extrémofilní 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.