INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Určení koncentrace celkových proteinů v krevním séru za využití různých metod

Teoretická část: krátký úvod k metodám pro stanovení, analýzu a separaci proteinů.

Praktická část: test tří různých technik pro stanovení koncentrace celkových proteinů v krevním séru. K analýze bude použito automatického analyzátoru a UV-Vis spektrometrie.

I. ÚVOD

1. Proteiny

Proteiny (bílkoviny) jsou z aminokyselin složené vysokomolekulární přírodní látky s relativní molekulární hmotností 103 až 106. Proteiny jsou podstatou všech živých organismů. Jejich základní povahu rozpoznal Braconnot již v r. 1819 při zahřívání klihu s kyselinou sírovou. Za podrobnější znalost struktury bílkovin vděčíme E. Fischerovi a L. Paulingovi. V proteinech jsou aminokyseliny vzájemně vázány aminoskupinami $–NH_2$ a karboxylovými skupinami –COOH amidovou vazbou –NH–CO– (amidy), která se v případě proteinů nazývá peptidická vazba. Podle počtu aminokyselin v molekule rozlišujeme oligopeptidy (2–10 aminokyselin), polypeptidy (11–100) a proteiny (více než 100 aminokyselin). Pořadí aminokyselin v řetězci proteinu označujeme jako primární strukturu nebo také sekvenci. Struktura mnoha proteinů je již známá, např. myoglobinu a hemoglobinu; u blízce příbuzných živočišných druhů jsou si struktury velmi podobné.

Molekuly proteinů mohou vytvářet protáhlé, vláknité, ve vodě nerozpustné struktury, skleroproteiny (též fibrilární), a kulovité nebo elipsoidní, ve vodě rozpustné sferoproteiny (též globulární). V protikladu ke skleroproteinům (kolagen, keratin, fibroin – tvořící vlasy, rohovinu, chrupavky) lze skoro u všech sferoproteinů (např. enzymy, svalová tkáň) varem nebo působením

NanoBioMetalNet CZ.1.07/2.4.00/31.0023
Tento projekt je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

kyselin a louhů (změnou hodnoty pH) rozrušit jejich terciární a sekundární strukturu (koagulace, denaturace). Přitom se ztrácejí některé biologické vlastnosti proteinů, např. schopnost enzymů štěpit potravu nebo svalová kontraktivita.

2. Studium proteinů

V polovině 80. let minulého století vznikl nápad zjistit sekvenci genomu našeho vlastního druhu. O několik let později, v roce 1990, se projekt pro sekvenaci lidského genomu nesoucí název Human Genome Project rozběhl. V roce 2003 bylo ohlášeno úplné sekvenování lidského genomu. Velmi překvapivým závěrem projektu byl zjištěný počet genů, kterých je podle nejnovějších informací 20 488. Je to skutečně výrazný posun, když se ještě v roce 2000 věřilo, že člověk disponuje více než 100 tisíci geny. Proto se pozornost vědců obrací směrem ke studiu proteinové výbavy jednotlivých organismů. Vědní obor věnovaný tomuto tématu se nazývá proteomika. Pro účely proteomiky jsou hledány nové postupy a technologie.

Pro studium proteinů se dnes využívá široká baterie analytických nástrojů. Pro studium sekundárních, terciárních a kvartérních struktur se dnes využívá rentgeno-strukturní analýzy, nukleární magnetické rezonance, moderních výpočetních systémů a dalších technik. Analýzou primární struktury a senzitivní detekce proteinů se dnes velmi intenzivně zabývá hmotnostní spektrometrie s různými typy ionizace. Přes nesporné výhody výše zmínění techniky jsou ovšem náročné na instrumentaci, kvalifikovanost obsluhy a čas. Mezi levnější alternativy, které jsou použitelné pro studium proteinů, patří elektrochemické a spektrofotometrické metody.

Tento projekt je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3. Stanovení proteinu Biuretovou reakcí

3.1 Princip

Měďnaté ionty v alkalickém prostředí reagují s peptidickými vazbami v proteinech za tvorby fialovo-modrého komplexu. Pro zvýšení stability Cu^{2+} iontů se do činidla přidává tatrát (vínan) draselno-sodný a jodidové ionty. U zdravého jedince jsou hodnoty celkových proteinů:

Novorozenec……5,2 – 9,1 g/dl

Dítě……5,4 – 8,7 g/dl

Dospělí……6,7 – 8,7 g/dl

3.2 Složení Biuretova roztoku

Tatrát draselno-sodný…… 15 mmol/l

Jodid sodný……100 mmol/l

Jodid draselný…… 15 mmol/l

Síran měďnatý…… 5 mmol/l

3.3 Pipetujeme

	Blank	Standard	Vzorek
Standard (µl)	-	25	-
Vzorek (µl)	-	-	25
Biuretův roztok (ml)	1	1	1

3.4 Stanovení

Po pipetování roztok mícháme a inkubujeme 15 min při 30 – 37 °C a poté jej necháme stát 5 min při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby měříme oproti blanku při 540 nm. Zbarvení je stabilní 30 min.

Tento projekt je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

3.5 Výpočty:

$$celkový\ protein\left[g/dl\right] = \frac{A_{vzorek}}{A_{st.}} \times konc.st.\left[g/dl\right]$$

$$1\,g/dl = 10\,g/l$$

Tento projekt je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

4. Kolorimetrické stanovení proteinů pyrogalovou červení

4.1 Princip

Protein reaguje v kyselém prostředí s pyrogalolovou červení a molybdenem na barevný komplex. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci proteinu ve vzorku.

4.2 Klinické hodnoty

U zdravého jedince moč neobsahuje žádný protein, nebo jen stopové množství. Zdravý ledvinný glomerulus zabraňuje průchodu proteinů z krve do glomerulárního filtrátu. Příznakem poranění ledvinného glomeluru je zvyšování propustnosti plazmatických proteinů, z toho vyplývá proteinurie, kterou popisuje přítomnost proteinu v moči. Dlouhodobé zjištění proteinu v moči je nejvýznamnější indikací ledvinové nemoci. Zdravý jedinec má hodnotu proteinu v moči ‹100 mg / 24 h a u těhotných ‹150 mg / 24 h.

4.3 Vzorky

Moč – stabilní 8 dnů, je-li uchována při 2-8 °C.

4.4 Měření

A. Podmínky měření:

Měří se při vlnové délce 598 nm, v 1 cm kyvetě, při 37°C (15-25 °C)

B. Přístroj

Před započetím analýzy přístroj vynuluji pomocí destilované vody

C. Pipetování

	Blank	Kalibrátor	Vzorek
Pyrogalová červeň (ml)	1	1	1
Kalibrace (µl)	-	20	-
Vzorek (µl)	-	-	20

Tento projekt je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

4.5 Stanovení

Po napipetování roztok mícháme a inkubujeme 5 min při 37°C nebo 10 min při laboratorní teplotě (15-25°C). Poté odečteme absorbanci oproti blanku. Barva je stálá minimálně 30 min.

4.6 Výpočty

$$množství\ proteinu\ v\ moč\left[mg/l\right] = \frac{A_{vzorek}}{A_{kalibrátor}} \times konc.kalibrátoru \times objem\ moč\left[l\right]$$

Tento projekt je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

5. Stanovení celkového množství proteinů podle Bradfordové

5.1 Princip

Princip této kolorimetrické techniky spočívá posunu absorbance barviva Coomassie Blue, které se váže na arginin a hydrofobní aminokyselinové zbytky přítomné v proteinu.

5.2 Chemikálie

Činidlo Bradfordové:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G250

50 ml 96% ethanolu a 100 ml 85 %

kyseliny fosforečné

doplnit destilovanou vodou na 1 l

0,1M fosfátový pufr pH 7,6:

13 ml 0,2M dihydrogenfosforečnanu sodného

87 ml 0,2 M hydrogenfosforečnanu sodného

doplnit na 200 ml destilovanou vodou

5.3 Postup

K 10 µl vzorku přidáme 190 µl činidla Bradfordové. Po pětiminutové inkubaci při pokojové teplotě měříme absorbanci při 595 nm proti slepému vzorku (10 µl fosfátového pufru a 190 µl činidla Bradfordové). Celkovou koncentraci proteinů odečteme z kalibrační křivky připravené ředěním roztoku BSA fosfátovým fufrem v rozmezí koncentrací od 1 mg/ml po 0,05 mg/ml.

Tento projekt je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.