

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Michal Buša

VAZBA NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LIGANDŮ
NA SÉROVÝ ALBUMIN

Binding of low molecular weight ligands to serum albumin

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Bakalářská práce

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Prof. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 1.6.2011

.....

Michal Buša

Poděkování

Tímto děkuji svému školiteli Prof. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za vedení mé práce, za cenné rady, vstřícný přístup a pomoc při vypracování. Dále děkuji rodině za veškerou poskytnutou podporu po dobu studia.

Abstrakt

V předložené bakalářské práci byla experimentálně ověřena možnost rozšíření úlohy pro pokročilé biochemické praktikum, tematicky zaměřené na studium vazby nízkomolekulární látky (barviva) na makromolekulu albuminu.

Úloha s názvem: „Vazba bromfenolové modři na sérový albumin“ má pomoci studentům v pochopení základních metod pro studium vazby ligandů na protein a stechiometrie komplexu. Vazba barviva na protein je zkoumána pomocí Jobova a nově i Scatchardova výnosu.

Po optimalizaci podmínek byl vytvořen nový návod, který je přílohou této práce.

Klíčová slova: Bromfenolová modř, sérový albumin, interakce ligandů s proteiny, laboratorní úlohy z biochemie

Abstract

In this Thesis, we studied the possibilities of an enlargement of the existing practical task in the Advanced practical course in biochemistry I, dealing with interaction of a dye (bromophenol blue) with serum albumin. Experimental protocol was proposed and tested, allowing the inclusion of Scatchard plot (in addition to the previously used Job plot).

As part of the Thesis, the new protocol for students is presented, which may help them to understand the most used approaches for studying the stoichiometry of protein-ligand complexes.

Key words: Bromophenol blue, serum albumin, protein-ligand interactions, practical course in biochemistry

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt | 4 |
| Abstract | 4 |
| Obsah | 5 |
| Seznam zkratek | 7 |
| Úvod | 8 |
| 1. Úvod do problematiky | 9 |
| 1.1. Albumin | 9 |
| 1.1.1. Struktura albuminu | 10 |
| 1.1.1.1. Primární struktura albuminu | 10 |
| 1.1.1.2. Sekundární struktura albuminu | 11 |
| 1.1.1.3. Terciární struktura albuminu | 12 |
| 1.1.2. Spektroskopické vlastnosti albuminu | 14 |
| 1.1.3. Změny molekuly albuminu v závislosti na pH | 14 |
| 1.1.4. Vazba ligandů na albumin | 15 |
| 1.2. Barviva | 16 |
| 1.2.1. Bromfenolová modř | 17 |
| 1.2.1.1. Vazba BPB na BSA | 20 |
| 1.2.2. Proteinová chyba acidobazických indikátorů | 20 |
| 1.3. Studium vazby ligandu na protein | 21 |
| 1.3.1. Spektroskopie směsi dvou absorbujících látek | 23 |
| 1.3.2. Grafické znázornění výsledků | 25 |
| 1.3.2.1. Přímý výnos | 25 |
| 1.3.2.2. Semilogaritmický výnos | 26 |
| 1.3.2.3. Scatchardův výnos | 27 |
| 1.3.2.4. Jobův výnos | 29 |
| 2. Materiál a metody | 31 |
| 2.1. Použité chemikálie a přístroje | 31 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.2. | Příprava vzorků a roztoků | 31 |
| 2.2.1. | Citrátový pufr | 31 |
| 2.2.2. | Zásobní roztok BSA | 32 |
| 2.2.3. | Zásobní roztok BPB | 32 |
| 2.2.4. | Příprava vzorků pro metodu kontinuálních variací | 33 |
| 2.2.5. | Příprava vzorků pro Scatchardův výnos | 34 |
| 2.2.6. | Spektrofotometrické vyhodnocování vzorků | 35 |
| 3. | Výsledky | 36 |
| 3.1. | Vyhodnocení vazby BPB na BSA pomocí Jobova výnosu | 36 |
| 3.2. | Vyhodnocení vazby BPB na BSA pomocí Scatchardova výnosu | 38 |
| 4. | Diskuze | 42 |
| 4.1. | Vyhodnocení vazby BPB na BSA pomocí Jobova výnosu | 42 |
| 4.2. | Vyhodnocení vazby BPB na BSA pomocí Scatchardova výnosu | 42 |
| 4.3. | Porovnání výsledků Jobova a Scatchardova výnosu | 43 |
| 5. | Závěr | 45 |
| 6. | Seznam použité literatury a internetových zdrojů | 46 |

Seznam použitých zkratk

- ASA - Aspirin
- BPB - Bromfenolová modř
- BSA - Hovězí sérový albumin
- CD - Cirkulární dichroismus
- cDNA - Deoxyribonukleová kyselina DNA získaná umělým přepisem mRNA reverzní transkripcí
- DFP - Diisopropylfluorofosfát
- DNA - Deoxyribonukleová kyselina
- FA - Mastné kyseliny
- HSA - Lidský sérový albumin
- IR - Infračervená spektroskopie
- NMR - Nukleární magnetická resonance
- ORD - Optická rotační disperse
- RNA - Ribonukleová kyselina
- UV - Ultrafialová spektroskopie

Úvod

Tato bakalářská práce vznikla za účelem rozšíření stávající úlohy v pokročilém biochemickém praktiku. Úloha s názvem vazba bromfenolové modři na sérový albumin byla příliš jednoduchá a časově nenáročná, bylo tedy rozhodnuto o jejím přepracování.

Původní úloha obsahovala pouze vyhodnocení vazby ligandu na protein pomocí Jobova výnosu, navíc s nepříliš šťastně zvolenými koncentracemi bromfenolové modři v jednotlivých roztocích. Naším hlavním úkolem tedy bylo optimalizovat postup pro vyhodnocování vazby bromfenolové modři na sérové albuminy.

Další vadou stávající úlohy byla malá časová náročnost. Bylo rozhodnuto přidat do úlohy další metodu, která se používá pro vyhodnocování vazby ligandu na protein. Touto metodou byl výnos podle Scatcharda, který je pro potřeby praktika ideální, jelikož jej lze vyhodnocovat spektrofotometricky a jako reaktanty lze použít sloučeniny používané pro Jobův výnos.

Literární přehled sumarizuje důležité informace o sérovém albuminu, o bromfenolové modři a o metodách vyhodnocování vazby ligandu na protein.

Experimentální část práce je zaměřena na stanovení ideálních podmínek pokusů a vytvoření přehledného návodu pro rozšířenou úlohu „Vazba bromfenolové modři na sérový albumin“ pro pokročilé praktikum z biochemie.

1. Úvod do problematiky

1.1. Albumin

Albumin bez diskuzí patří mezi proteiny, které jsou lidstvu známy nejdéle, i díky tomu je jeden z nejvíce prozkoumaných proteinů. Tento protein se používá především v základním výzkumu a klinické praxi. Albumin je nejhojnější rozpustný protein v tělech všech obratlovců a mezi proteiny krevní plazmy má vedoucí úlohu. Je záporně nabitý a není glykosylován ani neobsahuje žádnou prosthetickou skupinu. Čistý albumin je bílý prášek. Jeho vodný roztok je bezbarvý. Roztoky albuminu bývají však často jemně nažloutlé. Tento jev je zapříčiněn nedostatečnou purifikací albuminu. Bohužel stoprocentního očištění albuminu od bilirubinu, karotenu či FA se dosahuje velmi těžce díky vysoké afinitě k výše zmíněným látkám. Dále může albumin neenzymaticky vázat jednoduché cukry (obvykle glukósu), tento jev se nazývá glykace. [1]

V organismu mu přísluší více funkcí, nejdůležitější je jeho funkce při transportu FA, léčiv a vitamínů. Částečně se účastní transportu steroidních a thyroïdních hormonů (ovšem pro tyto hormony existují specifitější přenašeče než sérový albumin) a váže nekonjugovaný bilirubin. Dále je nezbytný pro udržování osmotického tlaku uvnitř organismů. Biosyntéza albuminu probíhá v játrech a je velmi úzce svázána s obsahem aminokyselin v těle, proto po každém jídle biosyntéza albuminu prudce stoupá. [1]

Albumin je velmi často volen jako model pro různá studia proteinů. Za jeho oblibu v laboratorní praxi vděčí skutečnosti, že za druhé světové války se vědci z Harvardu snažili pro transfuze nahradit krev plazmou, protože skladování krve bylo velmi obtížné. Díky válečným pokrokům ve frakcionaci krve byl vytvořen postup, jak připravovat značná množství velmi čistého proteinu. Díky tomu se sérový albumin stal oblíbeným modelem pro studium chemie proteinů. [1]

1.1.1 Struktura albuminu

1.1.1.1 Primární struktura albuminu

Primární struktura hovězího a lidského albuminu byla rozluštěna v roce 1975. Strukturu lidského albuminu rozluštily nezávisle na sobě dva týmy, prvním byl tým vedený J. R. Brownem ^[2] (ten rozluštil ve stejném roce i strukturu hovězího sérového albuminu ^[3]), druhým byl tým vedený Melounem.^[4] Struktura cDNA pro albumin byla pro hovězí i lidský sérový albumin rozluštěna později, než sekvence samotného proteinu.^[1]

Molekula HSA je tvořena 585 aminokyselinami a má celkovou molekulovou hmotnost 65 200 Da, molekula BSA je tvořena 583 zbytky aminokyselin a má celkovou molekulovou hmotnost 66 700 Da.^[1]

Samotná struktura má několik význačných rysů. Prvním z nich je velmi malý obsah tryptofanu, který se v savčích albuminech nachází většinou pouze jednou či dvakrát. Ve srovnání s „průměrným“ proteinem má albumin také velmi malý obsah glycinu, metioninu a isoleucinu. Dále obsahuje vysoký počet nabitých aminokyselin, díky kterým má molekula výrazný celkový náboj. Při neutrálním pH je počet ionizovaných skupin na jedné molekule albuminu typicky 185, isoionický bod má pro hovězí sérový albumin hodnotu 5,16 ^[1], isoelektrický bod má hodnotu 4,82. ^[5]

Tento fakt je příčinou velmi dobré rozpustnosti albuminu ve vodě. Počty kyselých aminokyselin převyšují počty aminokyselin bazických, celkový náboj molekuly je tedy záporný a jeho hodnoty bývají v rozmezí -12 až -17. ^[1]

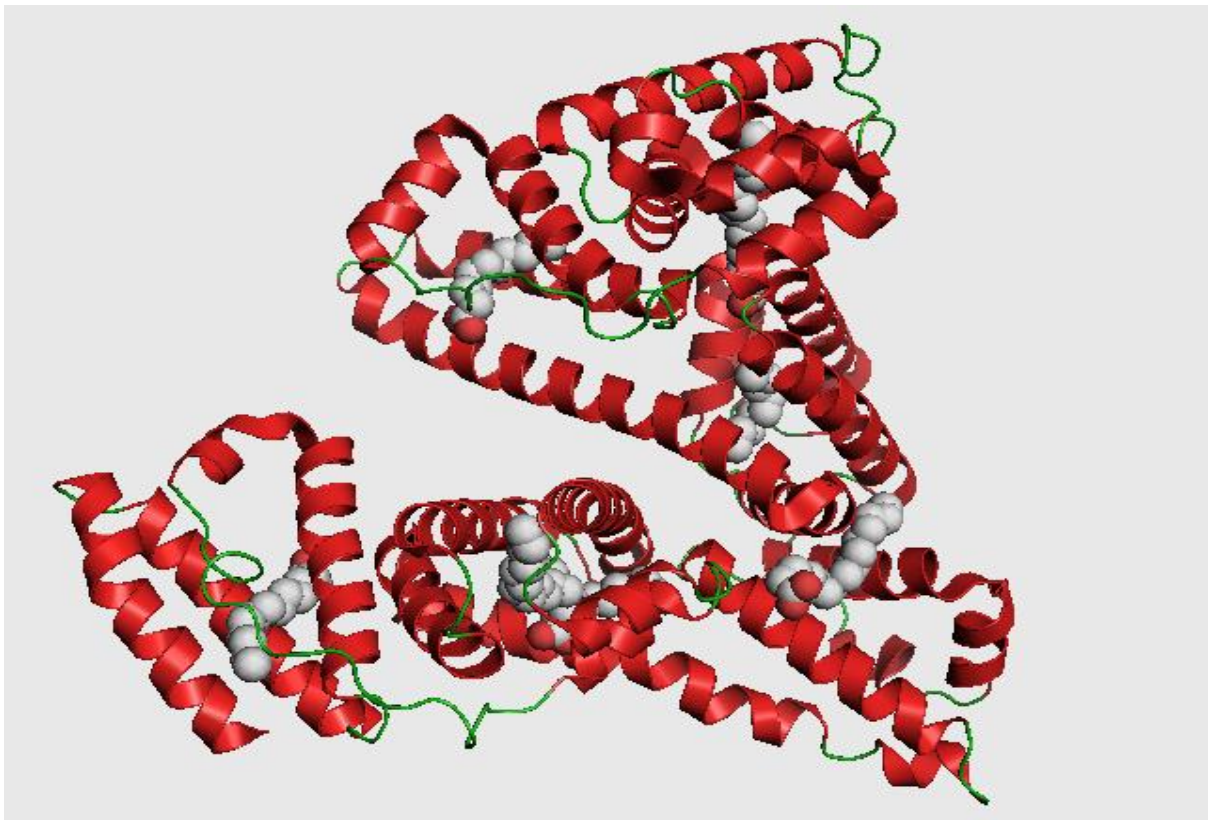
1.1.1.2 Sekundární struktura albuminu

Albuminu byl předpovídán vysoký obsah α -helixů a nakonec rentgenová krystalografie tuto domněnku potvrdila, jak je vidět na obrázku č. 1. Dnes již víme, že krystal albuminu je tvořen 28 α -helixy, na kterých se podílí 67 % všech aminokyselinových zbytků v krystalu molekuly albuminu.^[1]

Oproti tomu struktura β -skládaného listu zaujímá pouhých 10 % aminokyselinových zbytků v molekule albuminu.^[1]

Ze studií provedených pomocí rentgenově strukturní analýzy vyplývá, že molekula albuminu má tvar podobný srdci. Délka molekuly je 80 Å a průměrná šířka 30 Å.^[1]

Pro lepší ilustraci bylo vytvořeno mnoho počítačových modelů molekuly albuminu, jeden z nich je i na obrázku č. 1.



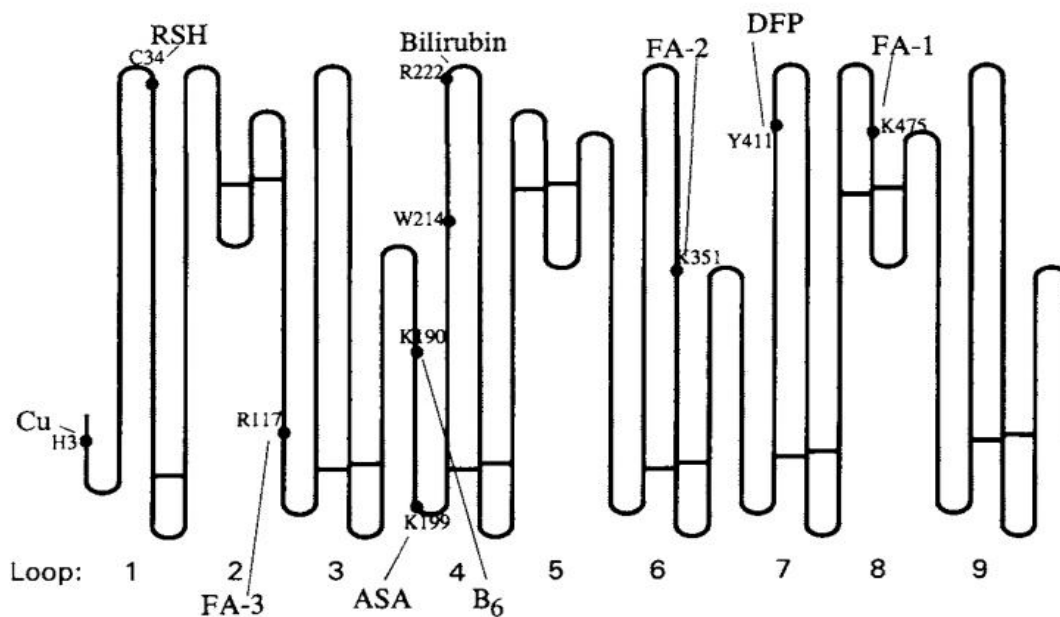
Obr. č. 1; 3D model HSA vytvořen pomocí počítačové techniky. Části molekuly tvořené α -helixem jsou vyznačeny červenou barvou. ^[6]

1.1.1.3 Terciární struktura albuminu

Albumin tvoří devět dvojitých smyček, které jsou propojeny pomocí disulfidických můstků. Tyto dvojitě smyčky jsou uspořádány do třech homologních domén (každá doména obsahuje 3 dvojitě smyčky), které jsou rozděleny na dvě subdomény a ty jsou dále tvořeny α -helixy. Jedna subdoména je zásadně tvořena třemi až čtyřmi α -helixy, mezi sebou vzájemně propojené dalším úsekem α -helixu. [1]

Subdomény jsou rozděleny mezi domény následovně, subdomény označované jako A jsou tvořeny prvními dvěma smyčkami v každé doméně, subdomény označované jako B jsou tvořeny třetími smyčkami v doménách. Subdoména IA je tvořena smyčkami 1 a 2, subdoména IIA je tvořena smyčkami 4 a 5, subdoména IIIA je tvořena smyčkami 7 a 8, Subdoména IB je tvořena smyčkou číslo 3, subdoména IIB smyčkou číslo 6 a subdoména IIIB smyčkou číslo 9. Pro lepší orientaci je připojeno schema (obr. č. 2), na kterém jsou smyčky vyznačeny. [1]

Všechny savčí druhy mají v molekulách albuminu stejný počet zbytků cysteinu a to 35, které vždy tvoří 17 disulfidických můstků (jediný cystein, který se nepodílí na tvorbě disulfidických můstků je v poloze 34) Tvorba disulfidických můstků je charakteristická pro extracelulární proteiny, jelikož přispívá ke stabilitě proteinů zvláště tehdy, je-li vyžadováno, aby proteiny nenedenurovaly v krevní plazmě (biologický poločas HSA je poměrně dlouhý a pohybuje se kolem 20 dní). Disulfidické můstky se tvoří mezi nejbližšími cysteiny a tvoří kličky o délce 10 až 47 aminokyselin. Polohy jednotlivých disulfidických můstků jsou znázorněny na obrázku č. 2. [1]



Obr. č. 2; Schema HSA s vyznačenými smyčkami, disulfidickými můstky a vazebnými místy pro jednotlivé ligandy (FA, FA s dlouhým řetězcem, ASA, vitamín B₆, pyridoxal 5'-fosfát, diisopropylfluorofosfát). Převzato z [1]

Takto složená molekula albuminu je díky smyčkám propojeným disulfidickými můstky odolnější vůči vnějším vlivům, molekula tedy získává určitou míru flexibility, navíc se může reverzibilně sbalovat a rozbalovat. Rozbalení molekuly albuminu při změně pH pod 4 a nad 8 je způsobeno nabíjením těch zbytků aminokyselin, které při fyziologickém pH zůstávají nenabitými. Tyto nadbytečné náboje tedy způsobí repulzi mezi jednotlivými kladnými (potažmo zápornými) náboji a molekula se začne rozbalovat. O rozbalování molekuly albuminu vlivem pH bude pojednáno později. Disulfidické můstky zabraňují rozsáhlejší změně v sekundární struktuře, díky nim je molekula proteinu schopna snášet i vcelku drsné podmínky jako jsou roztok močoviny o koncentraci 8 mol·l⁻¹ nebo pH o hodnotě 1. [1]

1.1.2. Spektroskopické vlastnosti albuminu

Aminokyseliny nejvíce interagující s elektromagnetickým zářením jsou tryptofan, tyrosin a fenylalanin (seřazeny podle míry interakce), tedy aminokyseliny s konjugovaným systémem dvojných vazeb (obsahují aromatický kruh). Mezi další velice silně absorbující struktury patří kovové ionty a dvojně vazby. Vlivy ostatních aminokyselin jsou takřka zanedbatelné, proto o celkové absorbanci roztoku proteinu rozhodují především výše zmíněné aminokyseliny. [7]

Ve viditelném spektru ($\lambda = 400-800$ nm) roztoky albuminu neabsorbují a jsou bezbarvé, jak již bylo zmíněno. V blízké ultrafialové oblasti je spektrum albuminu podobné spektru všech proteinů, které nemají prosthetickou skupinu. Ve vzdálené ultrafialové oblasti, tedy pod 240 nm, převládá absorbance peptidové vazby. [1]

1.1.3. Změny molekuly albuminu v závislosti na pH

Molekula albuminu podstupuje vlivem pH několik reversibilních, konformačních změn. K těmto změnám dochází v podmínkách, které se velmi odlišují od fyziologických. Těmito změnami je ovlivnění konformace, štěpení disulfidických vazeb, nebo znovusložení proteinu po totální redukci disulfidických můstků. [1]

Při pH v rozpětí 4,0 až 8,0 molekula albuminu existuje v konformaci označované písmenem N (Normal). Tato konformace se zvyšováním nebo snižováním pH postupně rozvolňuje. Při tomto rozvolňování jsou některé konformace stabilnější než ostatní a tak dochází k formování 4 různých konformerů albuminu v závislosti na pH. Tyto konformery se označují velkými písmeny, jak ukazuje následující tabulka č. 1. [1]

Tab. č. 1; Zkratky používané pro jednotlivé konformery sérových albuminů a podmínky jejich existence. [1]

| Konformer | Podmínky existence konformeru |
|--------------------|-------------------------------|
| F (fast) forma | Existuje kolem pH = 4 |
| E (extended) forma | Existuje pod pH = 3 |
| B (basic) forma | Existuje kolem pH = 8 |
| A (agend) forma | Existuje kolem pH = 10 |

1.1.4. Vazba ligandů na albumin

Protein albumin je známý především pro svou schopnost vázat menší molekuly mnoha různých druhů. Je to dáno jeho unikátní strukturou. Díky třem doménám disponuje albumin velkým počtem míst, kam se mohou případné ligandy navázat. [1]

Ze všech možných druhů ligandů jsou albuminem nejsilněji a nejspecifičtěji vázány hydrofobní organické anionty o velikosti 100 až 600 Da. Mezi tyto látky patří především mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (kyselina olejová, palmitová, stearová atd...), hematin a bilirubin, tedy látky které velmi často znečišťují albumin a zabraňují tak jeho 100% purifikaci. Albumin v organismu zajišťuje transport 99,9% mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Tyto kyseliny se váží na šest různých vazebných míst, ovšem tato vazebná místa tvoří velmi podobné aminokyseliny. Obsahují hlavně bazické aminokyseliny, zvláště arginin a lysin. [1]

Dále jsou vázány látky menší a méně hydrofobní, jako tryptofan či kyselina askorbová. Tyto látky jsou již vázány méně pevně, ovšem jejich vazba stále zůstává velmi specifická. Jako příklad nám poslouží tryptofan, jehož L-forma má k albuminu afinitu stonásobnou oproti D-formě. [1]

Dále albumin váže velké množství nejrůznějších léků, většinou nízkomolekulární a obsahující thiolové skupiny, za vazbu těchto látek je

zodpovědný cystein na 34. pozici. Mimo jiné se na tento cystein váže i oxid dusnatý. [8]

Pro mnoho látek, které albumin přenáší, slouží zároveň jako rezervoár, ze kterého se poté mohou tyto látky čerpat. Celková koncentrace sloučenin takto navázaných na albumin může potom překročit v krvi limit rozpustnosti pro danou látku. Albumin je také důležitý při detoxikaci organismu. Vázané toxiny dopravuje do jater k dalšímu zpracování. Jiné ligandy, jako například bilirubin, jsou drženy albuminem v pozici usnadňující jejich následné metabolické úpravy. [1]

Albuminy váží i mnoho iontů a velmi často slouží jako jejich transportéry. Nejpevněji a nejspecifičtěji jsou albuminem vázány ionty Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} . Vazebné místo pro tyto ionty je tvořeno posledními čtyřmi aminokyselinami na N-konci molekuly HSA (N-Asp-Ala-His-Lys). Dále je albumin důležitý zvláště pro transport Ca^{2+} , Mg^{2+} a Zn^{2+} , pro které představuje majoritní přenašeč (až 65% Zn^{2+} v organismu je navázáno na albumin a to i přesto, že jeho afinita k Zn^{2+} je v porovnání s afinitou k iontům Cu^{2+} a Ni^{2+} velmi nízká [9]). Albumin váže i ionty Au^+ , Ag^+ a Hg^{2+} . Tyto ionty jsou vázány cysteinem na pozici 34. [8]

1.2. Barviva

Na albumin se váže velké množství nejrůznějších barviv jako je metyloranž, bromkresolová zeleň nebo fenolová červeň. Ovšem zde musíme upozornit na tzv. proteinovou chybu indikátoru, která bude zmíněna v samostatné kapitole. [1]

Asociační konstanty albuminu a různých barviv jsou již dlouho známé. Barvivem, které albumin váže nejsilněji je sulfobromftalein s $K_A = 1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Jeho eliminace po intravenózním podání byla po léta používána k měření míry funkčnosti jater. Později se bohužel ukázalo, že se jedná o toxickou látku. Bromfenolová modř má také jednu z nejvyšších afinit k albuminu, pro lepší

srovnání viz tabulka č. 2. Vyšší afinitu k albuminu má pouze již zmíněný sulfobromftalein. [1]

Tab. č. 2; Asociační konstanta (K_A) pro komplexy vybraných barviv s HSA a počet molekul vázaných na molekulu albuminu (N) v případě, že je tato informace známa. [1]

| Barvivo | K_A [M^{-1}] | n |
|---------------------|--------------------|----|
| Bromfenolová modř | $1,5 \cdot 10^6$ | 3 |
| Bromkresolová zeleň | $7,0 \cdot 10^5$ | 3 |
| Fenolová červeň | $2,8 \cdot 10^4$ | 1 |
| Methyloranž | $2,2 \cdot 10^3$ | - |
| Methylová červeň | $2,2 \cdot 10^5$ | - |
| Sulfobromftalein | $1,7 \cdot 10^7$ | - |
| Evansova modř | 4.105 | 14 |

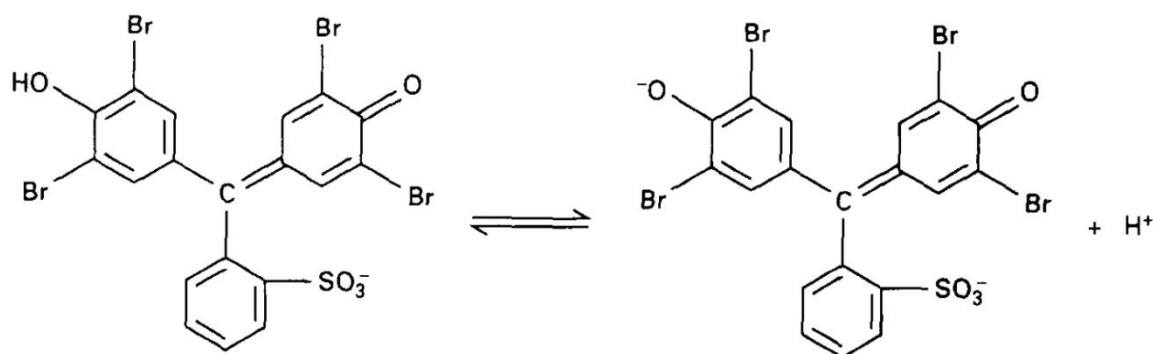
1.2.1 Bromfenolová modř

Bromfenolová modř (dále jen BPB), systematickým názvem 3',3'',5',5''-tetrabromfenolsulfoftalein, je slabá kyselina o pK_a 3,85. Toto sulfoftaleinové barvivo se používá především jako acidobazický indikátor. [10] Využívá se i při elektroforézách a to jak v klasickém provedení, tak i v diskové elektroforéze, jako takzvané sledovací barvivo. [11]

Sledovací barviva jsou barevné sloučeniny, které se přidávají ke vzorku při nanášení na gel. Jejich přítomnost v gelu má dva důvody. Zaprvé usnadňují manipulaci s gelem obsahujícím vzorek, jelikož je obarvený, a navíc nám umožňují přímo sledovat pohyb vzorku v dráze gelu a odhadnout, jak daleko doputovaly

tříděné molekuly. BPB se navíc pohybuje v gelu (konkrétní pohyblivost závisí na koncentraci agarosového gelu) jako molekula DNA o velikosti 300 až 500 párů bazí, lze jí tedy využít jako primitivní marker velikosti DNA či RNA fragmentů. [12]

Relativní molekulová hmotnost má pro BPB hodnotu 669,97. Má vlastnosti slabé kyseliny a v disociované formě nese dva záporné náboje. Přechod mezi ionizovanou a neionizovanou formou je znázorněn na obrázku č. 3. Ionizovaná forma se vyskytuje v roztoku, na molekulu proteinu může být BPB navázána pouze v neionizovaném stavu. Tento stav dovoluje čerpání elektronů z proteinu do π -elektronového systému BPB. Právě toto načerpání elektronové hustoty do elektronového systému BPB způsobuje bathochromní posun a hyperchromní jev. Tyto skutečnosti se projevují na spektru navázané BPB. [13]



Obr. č. 3; Přechod mezi nedisociovanou a disociovanou formou BPB. Převzato z [13]

Pro využití látky jako acidobazického indikátoru je nutností, aby látka výrazně měnila barvu při přechodu z ionizované formy do formy neionizované a naopak. Při proměření spektra čistého roztoku BPB v závislosti na pH mezi hodnotami 3 a 4,6 a následným vynesemím naměřených spekter do jednoho grafu dostaneme graf, kde se jednotlivé křivky protínají v jediném bodě. Tento bod se

nazývá bodem isosbestickým, a lze jej využít jako kontrolu pro přesnost práce. Jestliže nějaká křivka isosbestický bod mine, a všechny ostatní křivky tento bod protínají, je jasné že vzorek, kterému náleží křivka mimo isosbestický bod je zatížen chybou. [13]

Roztoky BPB o $\text{pH} < 3$ jsou žluté, roztoky mezi $\text{pH} 3$ až $4,6$ zelené a při hodnotě pH větší než $4,6$ jsou roztoky BPB modré až temně fialové. [14]

Pro větší názornost je níže připojen obrázek č. 4, na kterém jsou znázorněny barvy roztoků BPB při $\text{pH} 1$ až 14 .



Obr. č. 4; Barevný přechod roztoku BPB od $\text{pH} 1$ (žlutý konec) k $\text{pH} 14$ (modrý konec). Převzato z [15]

Při $\text{pH} = 3,6$ roztoky BPB vykazují dichromatismus. Díky tomuto jevu pozorujeme skutečnost, že roztok BPB se nám jeví jako zelený nebo červený v závislosti na koncentraci a mocnosti vrstvy, v jaké roztok pozorujeme. Stejně vlastnosti má mimo BPB i dýňový olej a roztoky resazurinu. Většina látek dichromatismus nevykazuje, s koncentrací a mocností vrstvy se u nich tak mění pouze jas a sytost barvy. [16]

Aby látka vykazovala dichromatismus musí mít minimálně dvě minima v absorpčním spektru. Jedno musí být mělké a široké, druhé minimum musí být velmi hluboké a úzké. Tyto podmínky spektrum BPB splňuje. [16]

1.2.1.1. Vazba BPB na BSA

BPB vytváří s albuminem barevný komplex, proto se při studiu vazby BPB na albumin využívá především spektroskopických metod.

Po proměření spektra roztoku BPB s přidaným BSA a jeho porovnáním se spektrem čisté BPB je patrné, že dochází k bathochromnímu posunu (λ_{\max} roste) a hypochromnímu jevu (klesá intenzita absorpce). Tyto změny absorpčních charakteristik BPB po vazbě na albumin jsou přisuzovány změně elektronové hustoty v molekule BPB a hydrofobnímu prostředí ve vazebném místě pro BPB. Vlnová délka absorpčního maxima je dána rozdílem energií mezi základním a excitovaným stavem, posun vlnové délky absorpčního maxima je tedy spojen se změnou energie těchto stavů. Umístění dvou záporných nábojů BPB do nepolárního vazebného místa proteinu destabilizuje základní stav a zmenšuje energii mezi základním a excitovaným stavem. Tato skutečnost tedy vede k rudému posunu (bathochromní posun). [17]

Pro přesné výsledky je důležité provádět měření s roztoky připravenými z dobře purifikovaného albuminu. Bylo již dříve dokázáno, že se vazebná místa pro dvě různé látky mohou překrývat. Jak je tomu kupříkladu u HSA kde se jedno vazebné místo pro BPB překrývá s vazebným místem pro bilirubin, který je navíc do zmíněného prostoru vázán pevněji než BPB. [18]

1.2.2. Proteinová chyba acidobazických indikátorů

Proteinovou chybou označujeme situaci, ke které dochází po přidání proteinu do roztoku acidobazického indikátoru. Tento jev většinou často komplikuje snahu o stanovení pH pomocí kolorimetrie (určení pH roztoku pomocí změny zbarvení indikátoru). Kupříkladu roztok, ve kterém je pouze neutrální červeň, má pH 6,6. Když do tohoto roztoku přidáme pětiprocentní globulin a stanovíme kolorimetricky pH, bude naměřená hodnota pH 6,0. Ovšem

proteinová chyba velmi závisí na přidaném proteinu, kupříkladu čistý vaječný albumin až do své 7% koncentrace nezpůsobí proteinovou chybu v roztoku neutrální červeně či fenolové červeně. [19]

Příčinou tohoto jevu je vzájemné působení molekul proteinů s molekulami barviva (molekuly barviva jsou mnohem menší než molekuly proteinu). V dnešní době jsou známy 4 mechanismy, které vysvětlují podstatu tohoto jevu. [19]

Těmito mechanismy jsou:

A, Molekuly proteinu ovlivní rovnováhu mezi monomerní a dimerní formou barviva.

B, Molekula proteinu je opačně nabitá než molekuly barviva a protein tedy na sebe váže molekuly barviva, a tak ovlivňuje rovnováhu mezi kyselou a bazickou formou barviva.

C, Molekula proteinu je shodně nabitá jako molekula barviva a tak může dojít ke vzniku komplexů a silné elektrostatické repulzi.

D, Spektra volného a vázaného barviva se podstatně liší.

1.3. Studium vazby ligandu na protein

Navázání malé molekuly na biomakromolekulu proteinu je často prvním krokem ve většině funkcí organismu. Jako příklad uveďme přeměnu substrátu enzymem, vazbu protilátek na antigeny nebo vazbu neurotransmiteru na receptor. [20]

Vazbu ligandu na protein lze studovat pomocí velkého spektra biofyzikálních metod. Pro rozpustné systémy je nejjednodušší metodou klasická rovnovážná dialýza. Skutečnost, že se ligand navázal na protein, můžeme dokázat určením velikosti některých změn. Mezi tyto změny, které nám umožňují určit různé vlastnosti vazby ligandu na protein, patří: [20]

A, Určení koncentrace volného ligandu

B, Detekce změny biofyzikálních nebo biochemických vlastností vázaného ligandu.

C, Detekce změny biofyzikálních nebo biochemických vlastností proteinu.

A, Určení koncentrace volného či navázaného ligandu

Pro měření koncentrace volného či vázaného ligandu se využívá především rovnovážná dialýza a následné měření koncentrace ligandu v obou fázích. Tyto fáze jsou vzájemně oddělené semipermeabilní membránou nepropustnou pro molekuly proteinu, ale molekuly ligandu mohou prostupovat membránou libovolně. Toto experimentální uspořádání lze zaměnit za systém, který obsahuje dvě nemísitelné kapaliny, mezi kterými můžou prostupovat pouze molekuly ligandu, ale molekuly proteinu zůstávají pouze v jedné fázi. [20]

B, Detekce změny biofyzikálních nebo biochemických vlastností navázaného ligandu.

Vlastnosti ligandu po navázání na molekulu proteinu se velmi často výrazně mění. Výrazné změny postihují spektra všech typů od UV přes IR až k NMR, stejně jako u ORD nebo fluorescenční spektroskopie. Změny nastávají hlavně ve frekvenci nebo amplitudě, velmi často se mění obě veličiny. [20]

Když navázaný ligand nemá shodné spektroskopické vlastnosti jako ligand nenavázaný, je jedno, kolik molekul ligandu je navázáno na protein a my můžeme vypočítat podíl ligandu vázaného na protein, α , z následující rovnice

$$A = \alpha * A_{vaz} + (1 - \alpha) * A_{vol} \quad (\text{vztah č. 1})$$

Kde A je absorbance, α podíl ligandu navázaného ligandu, A_{vaz} absorbance navázaného ligandu a A_{vol} absorbance volného ligandu.

Tento vztah lze s lehkými obměnami (namísto absorbance použijeme ve vzorci chemický posun, intenzity fluorescence apod.) využít i pro měření pomocí NMR, fluorescenční spektroskopie nebo CD. [20]

C, Detekce změny biofyzikálních nebo biochemických vlastností proteinu.

Po navázání ligandu se změní celá řada vlastností proteinu. Bohužel jsou tyto vlastnosti velmi různorodé a velmi záleží na individuálních vlastnostech proteinu i ligandu. Díky tomuto individuálnímu přístupu se nám ale otevírá nový pohled na interakci proteinu s ligandem. Můžeme například určit, kam se ligand přesně váže. Tyto metody spočívají ve skutečnosti, že změna vlastností proteinu s navázaným ligandem v jiném vazebném místě nebude shodná se změnou vlastností proteinu s ligandem navázaným jinde. Změny vlastností proteinů měříme pomocí metod termodynamických, elektromagnetických a biologických. [20]

1.3.1. Spektroskopie směsi dvou absorbujících látek

Spektroskopické stanovení koncentrace rozpuštěné látky v roztoku je založeno na Lambertově-Beerově zákonu. Tento zákon se obvykle vyjadřuje následujícím vzorcem:

$$A = -\log T = \log (I_0/I) = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (\text{vztah č. 2})$$

kde je absorbance A , transmitance T , I_0 je intenzita záření vstupujícího do vzorku, I je intenzita záření vystupujícího ze vzorku, ε je molární absorpční koeficient, l je délka paprsku procházejícího vzorkem a c je koncentrace absorbující látky ve vzorku. [21]

Lambertův-Beerův zákon je zákon s limitní platností. Nejvýznamnějším požadavkem pro platnost Lambertova-Beerova zákona jsou dostatečně nízké koncentrace rozpuštěné látky ve vzorku. V praxi se tato podmínka většinou prověřuje proměřením kalibrační křivky a jejím sestavením. Obecně a také

s ohledem na vlastnosti přístrojů používaných k měření absorpance nelze předpokládat linearitu kalibrační křivky pro hodnoty absorpance větší než 2. Pokud kalibrační přímka není lineární nelze pro koncentrace použité k sestavení kalibrační křivky uplatňovat Lambertův-Beerův zákon. [22]

Pro roztoky vzájemně neinteragujících a neasociujících látek platí Lambertův-Beerův zákon ve velmi širokém rozpětí koncentrací. Tento zákon je zákonem aditivním, lze tedy uplatňovat pravidlo o aditivitě absorpací jednotlivých složek roztoku. Celková absorpance A se při určité vlnové délce λ tedy bude dát vyjádřit následovně:

$$A(\lambda) = A_1(\lambda) + A_2(\lambda) + A_3(\lambda) + \dots + A_n(\lambda) \quad (\text{vztah č. 3})$$

Do vzorce dosadíme z prvního vztahu:

$$A(\lambda) = \varepsilon_1(\lambda) \cdot l \cdot c_1 + \varepsilon_2(\lambda) \cdot l \cdot c_2 + \varepsilon_3(\lambda) \cdot l \cdot c_3 + \dots + \varepsilon_n(\lambda) \cdot l \cdot c_n \quad (\text{vztah č. 4})$$

Indexy 1,2,3 a n označují jednotlivé složky roztoku.

Tato aktivita umožňuje stanovit koncentraci jednotlivých složek měřením absorpance v n vhodně zvolených bodech. Následným řešením soustavy rovnic (za podmínky, že měření probíhalo v identických kyvetách a proti stejnému blanku) při různých vlnových délkách, lze po úpravě vyjádřit pro dvousložkovou soustavu koncentraci složek pomocí následujícího vztahu:

$$c_1 = \frac{A_a \cdot \varepsilon_{2b} - A_b \cdot \varepsilon_{2a}}{\varepsilon_{1a} \cdot \varepsilon_{2b} - \varepsilon_{2a} \cdot \varepsilon_{1b}} \quad c_2 = \frac{A_b \cdot \varepsilon_{1a} - A_a \cdot \varepsilon_{1b}}{\varepsilon_{1a} \cdot \varepsilon_{2b} - \varepsilon_{2a} \cdot \varepsilon_{1b}} \quad (\text{vztah č. 5})$$

Tato metoda má pouze jedno omezení, a tím je nutnost mít jmenovatele v jednotlivých výrazech různého od nuly. Nelze tedy volit obě vlnové délky tak, aby byly shodné jednotlivé molární absorpční koeficienty (ε_1 se nesmí rovnat ε_2).

[21]

Měření je vhodné provádět při vlnových délkách umístěných například symetricky k isosbestickému bodu, či na minima a maxima jednotlivých spektrálních křivek, kde je citlivost na drobné nepřesnosti menší než na strmých rústech a klesáních. O vhodnosti zvolených jednotlivých vlnových délek je nejlepším řešením provést pokus, při kterém budeme znát jednotlivé koncentrace obou složek soustavy. [23]

1.3.2. Grafické znázornění výsledků

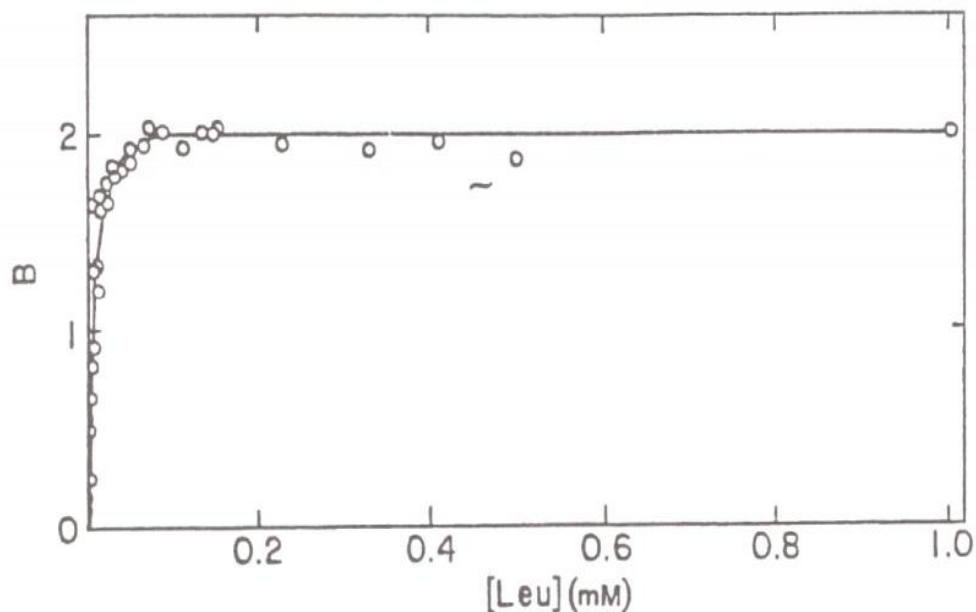
Vstupními daty pro vyhodnocování vazby ligandu na protein musí být množství navázaného ligandu (označovaného jako B) jako funkce koncentrace volného ligandu (označovaného jako [L]). Získáme tedy rovnici:

$$B = g([L]) \quad (\text{vztah č. 6})$$

Takto získaná data mohou být znázorněna graficky, pomocí mnoha různých způsobů, z nichž jsou nejvýznamnější tyto tři: přímý výnos, semilogaritmický výnos a Scatchardův výnos. [20]

1.3.2.1. Přímý výnos

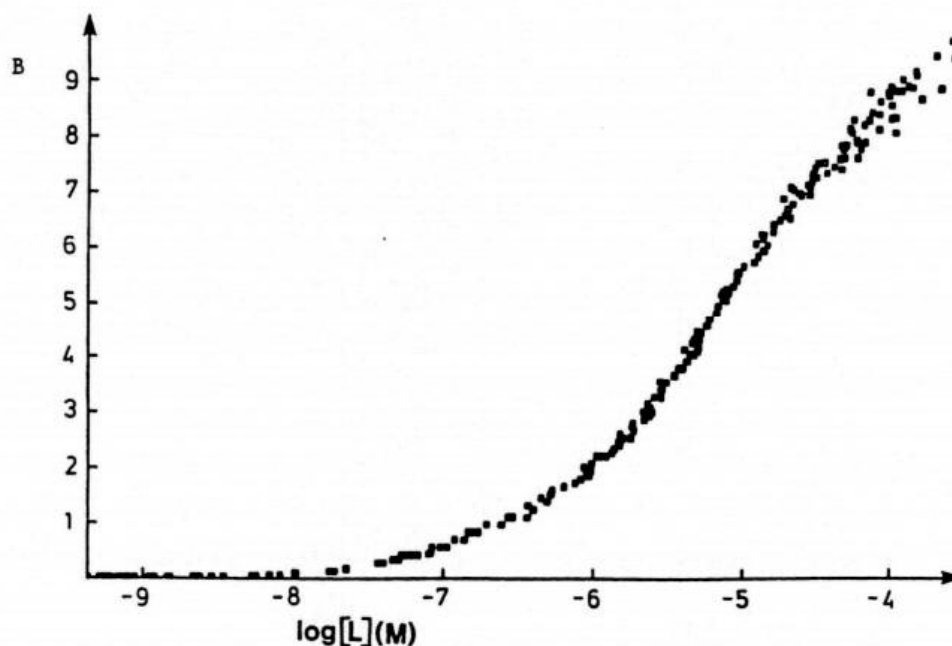
Přímý výnos je nejjednodušší možné znázornění experimentálních dat. Vynáší se pouze B proti [L]. Z obrázku č. 5 je patrné, že při vyšších koncentracích ligandu je na protein vázáno stále stejné množství ligandu. Z této skutečnosti lze tedy usoudit, že protein bude ligandem saturován. Nevýhoda tohoto výnosu spočívá ve skutečnosti, že většina bodů se nalézá v těsném sousedství osy y, body následně nejsou zcela čitelné a mohou splývat. Další nevýhodou jsou velké problémy při určení celkového počtu vazebných míst. [20]



Obr. č. 5; Přímé vynesení koncentrace vázaného ligandu (B) proti koncentraci volného ligandu (L). Ligandem byl v tomto případě leucin, proteinem byla α -isopropylmalátsynthasa. Převzato z [1]

1.3.2.2. Semilogaritmický výnos

Při semilogaritmickém výnosu vynášíme B jako funkci $\log [L]$. Tato změna usnadní určení celkového počtu vazebných míst. V tomto výnosu je totiž jasně patrné dosažení saturace proteinu ligandem, a to díky tomu, že křivka grafu dosáhne roviny. Další výhodou je rovnoměrné rozložení bodů grafu, nedochází tedy k nepřehledným zhuštěním bodů v žádné části grafu, jako v případě přímého výnosu. Křivka tohoto grafu je velmi podobná titračním křivkám. Příklad tohoto výnosu je na obrázku č. 6. [20]



Obr. č. 6; Semilogaritmický výnos B proti $\log [L]$, Vazba laurátu na na HSA. Převzato z [19]

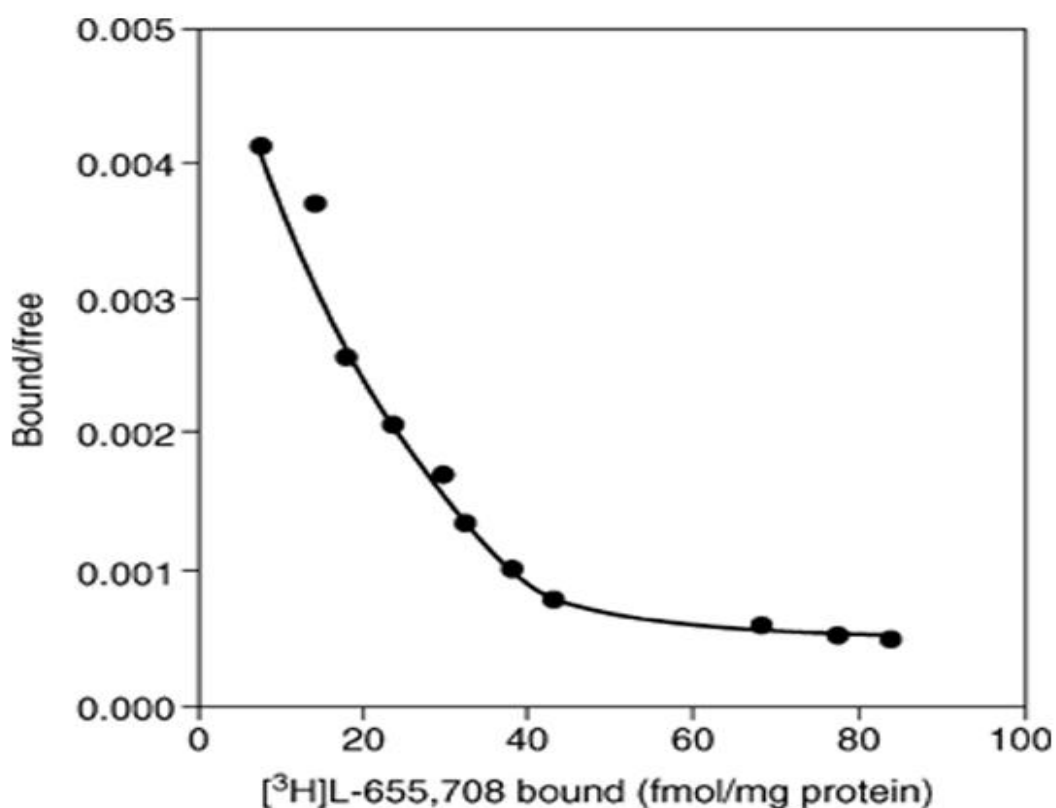
1.3.2.3.Scatchardův výnos

V tomto výnosu vynášíme $B/[L]$ na ose y proti B na ose x. Scatchardův výnos je důležitým výnosem pro studium interakce mezi ligandem a proteinem. Pokud v tomto výnosu proložíme jednotlivými body přímkou, můžeme poté ze směrnice přímky a jejího průsečíku s osou x dostat zajímavé informace o vazbě ligandu na protein. Průsečíky této přímky s osami x a y jsou důležitými body, poskytující nám cenné informace. Průsečík s osou x dává hodnotu B_{max} , tedy počet maximálně navázaných molekul ligandu na protein, hodnota průsečíku s osou y se rovná $n \cdot K_A$. Z grafu lze získat i další informaci o K_A , sklon grafu totiž odpovídá záporné reciproké hodnotě K_A . [20]

Bohužel lze pomocí Scatchardova grafu velmi snadno udělat špatné závěry. Častým problémem je nesprávné proložení bodů grafu přímkou i v případech kdy body tvoří křivku. Takovýto graf je znázorněn na obrázku č. 7, body naměřené při

vyšších koncentracích B se totiž velmi často odchyľují od přímky proložené body při malých koncentracích. Pro tyto systémy tedy neplatí požadavek na jednoduchý systém se shodnými vazebnými místy. [20]

Tyto systémy mohou odpovídat dvěma možným případům. V prvním má protein dvě a více typů vazebných míst s neměnnými afinitami, a tyto afinity se nemění ani s mírou obsazení ostatních vazebných míst, to je případ grafu na obrázku č. 7. Ve druhém případě se afinity pro molekuly ligandu alespoň na některých vazebných místech snižují nebo zvyšují v závislosti na obsazení ostatních vazebných míst. [20]



Obrázek č. 7; Scatchardův výnos pro vazbu [³H]L655,708 na membránu myšího mozku. [24]

1.3.2.4. Jobův výnos

Dalším výnosem vhodným ke studiu stechiometrie vazby ligandu na protein je Jobův výnos, který je znám také jako metoda kontinuálních variací. Při této metodě zůstává součet koncentrací ligandu a proteinu konstantní, mění se pouze jejich poměr. Lze tedy psát:

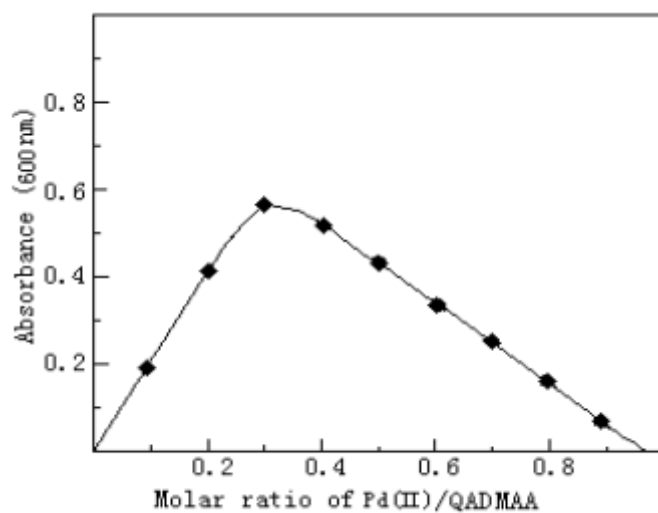
$$c_L + c_P = \text{konstanta} \quad (\text{vztah č. 7})$$

Do jednotlivých vzorků tedy připravíme přesně takové množství jednotlivých složek, aby molární zlomek jedné látky v posloupnosti roztoků rostl od nuly k jedné; molární zlomek druhé látky bude růst opačným směrem. [25]

V Jobově výnosu vynášíme veličinu, která udává množství zformovaného komplexu protein-ligand (L_nP) na ose y proti molárnímu zlomku ligandu nebo proteinu na ose x. [25] Veličinou, která nám prozradí množství zformovaného komplexu, bude v našem praktiku absorbance, měřená při 606 nm, což je absorpční maximum navázané BPB.

Na obrázku č. 8 je příklad Jobova výnosu. Na křivce je zcela jasně patrné maximum, tedy poměr reaktantů, při kterém se vytvoří nejvíce molekul komplexu. V tomto maximu je tedy poměr molárního zlomku ligandu a proteinu ideální pro vznik komplexu. Z této skutečnosti lze usoudit, že molární zlomky jednotlivých složek přímo odpovídají složení komplexu. [26]

Z absorpčního maxima křivky na ukázkovém grafu lze odečíst molární zlomek paladia, pro který se vytvořilo nejvíce komplexu. Je-li molární zlomek paladia v maximu roven 0,33, pak je jisté, že komplex tvořený 2-(2-chinoly)-5-dimethylaminoanilinem a Pd^{2+} má stechiometrii 1:2 (2-(2-chinoly)-5-dimethylaminoanilin : Pd^{2+}). [27]



Obr. č. 8; Závislost absorbance na molárním zlomku Pd²⁺ v roztoku, který obsahoval Pd²⁺ a 2-(2-chinolyl)-5-dimethylaminoanilin. Převzato z [27]

2. MATERIÁL A METODY

2.1. Použité chemikálie a přístroje:

- Hovězí sérový albumin – Serva (Cohnova frakce V)
- Bromfenolová modř – p.a., Lachema
- Kyselina citronová (monohydrát) – p.a., Lachema
- Citronan sodný – p.a., Lachema
- Hydroxid sodný – zásobní roztok o koncentraci $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
- pH metr inolab 720
- spektrofotometr Specord M 40
- spektrokolorimetr Spekol 11

2.2. Příprava vzorků a roztoků

2.2.1. Citrátový pufr

Citrátový pufr byl připraven smícháním zásobních roztoků kyseliny citronové a citronanu sodného v poměru 4:1. Následně bylo upraveno pH na hodnotu 3,3 přidáním kyseliny nebo soli. Roztok kyseliny citronové byl připraven rozpuštěním 10,507 g monohydrátu kyseliny citronové ($M_r = 210,14$) v 500 ml destilované vody. Takto byl připraven přibližně 0,1 molární roztok kyseliny citronové. Roztok citronanu sodného byl připraven rozpuštěním 14,705 g dihydrátu citronanu sodného ($M_r = 294,1$) v 500 ml destilované vody. Takto byl připraven zásobní roztok citronanu sodného o přibližné koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Zásobní roztoky kyseliny citronové a citronanu sodného byly uchovávány v lednici. Bohužel i přesto došlo několikrát k znečištění hlavně zásobního roztoku kyseliny citronové. V zásobní láhvi s roztokem kyseliny citronové plavaly bílé

hlenovité agregáty o průměru odhadem 1-2 mm. Nejspíše šlo o produkty metabolismu bakterií, které se nacházely v době přípravy roztoku ve vzduchu nebo přímo v zásobní láhvi. Zjištění přítomnosti těchto agregátů bylo v jednom případě zjištěno až po proměření absorbancí vzorků. Hodnota absorbance vzorků, které obsahovaly tyto agregáty, fluktovala až o 0,050. Došlo tedy ke znehodnocení výsledků měření, a proto výsledky těchto měření neuvádím.

2.2.2. Zásobní roztok BSA

Roztok BSA byl připraven rozpuštěním čistého BSA ($M_r = 66\,700 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) v destilované vodě. Na analytických vahách bylo naváženo 0,1343 g BSA a kvantitativně převedeno do kádinky. Odměrným válcem bylo odměřeno 100 ml citrátového pufru. V kádince byl albumin nejdříve rozmíchán v malém množství pufru na kašičku. Teprve poté byl z odměrného válce přidán zbytek pufru. Takto byl připraven vodný roztok BSA o koncentraci $2\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

2.2.3. Zásobní roztok BPB

Na analytických vahách bylo naváženo 0,01334 g BPB ($M_r = 667 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Toto množství BPB bylo následně kvantitativně převedeno do kádinky, kde byla BPB rozpuštěna ve 200 μl 0,5 M NaOH. Takto připravený velmi tmavě fialový roztok BPB byl poté zředěn 20 ml destilované vody. Takto byl připraven roztok BPB o koncentraci $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z tohoto roztoku BPB byly dále pipetovány 2 ml do jiné, čisté kádinky, do které bylo následně přidáno 18 ml citrátového pufru odměřených odměrným válcem. Tak byl připraven roztok BPB o koncentraci $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Takto koncentrovaný roztok BPB byl používán pro analýzu vazby BPB na BSA pomocí Scatchardova výnosu.

Metodu kontinuálních variací značně zjednoduší a zpřehlední použití roztoků BSA a BPB o stejné koncentraci. Proto byl z právě připraveného roztoku

BPB o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ připraven roztok BPB o koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Z roztoku BPB o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bylo odebráno 10 ml tohoto roztoku, který byl převeden do čisté kádinky, a k němu bylo odměrným válcem odměřeno 40 ml pufru. Takto byl připraven roztok BPB používaný pro metodu kontinuálních variací o koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a objemu 50 ml.

2.2.4. Příprava vzorků pro metodu kontinuálních variací

Součet koncentrace BPB a BSA ve vzorku pro metodu kontinuálních variací musí být konstantní. Mění se pouze poměr koncentrací jednotlivých složek. Pro měření bylo připraveno v prvním případě 10 a v druhém případě 11 vzorků do lékovek. Do označených lékovek byly postupně pipetovány objemy podle tabulky č. 3.

Tab. č. 3; Složení jednotlivých vzorků používaných pro metodu kontinuálních variací. Koncentrace BSA a BPB pro první pokus byla $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Koncentrace BSA a BPB pro druhý pokus byla $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

| číslo vzorku | V přidané BPB [ml] | | V přidaného albuminu [ml] | | molární zlomek BPB v roztoku | |
|--------------|--------------------|----------|---------------------------|----------|------------------------------|----------|
| | 1. pokus | 2. pokus | 1. pokus | 2. pokus | 1. pokus | 2. pokus |
| 1 | 5 | 5 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 2 | 4,9 | 4,75 | 0,1 | 0,25 | 0,98 | 0,95 |
| 3 | 4,7 | 4,5 | 0,3 | 0,5 | 0,94 | 0,9 |
| 4 | 4,5 | 4,25 | 0,5 | 0,75 | 0,9 | 0,85 |
| 5 | 4,3 | 4 | 0,7 | 1 | 0,86 | 0,8 |
| 6 | 4 | 3,75 | 1 | 1,25 | 0,8 | 0,75 |
| 7 | 3,5 | 3,5 | 1,5 | 1,5 | 0,7 | 0,7 |
| 8 | 3 | 3 | 2 | 2 | 0,6 | 0,6 |
| 9 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,5 | 0,5 |
| 10 | 1,5 | 2 | 3,5 | 3 | 0,3 | 0,4 |
| 11 | 0 | 1 | 5 | 4 | 0 | 0,2 |
| 12 | - | 0 | - | 5 | - | 0 |

2.2.5. Příprava vzorků pro Scatchardův výnos

Vzorky pro následné vynesení pomocí Scatchardova výnosu byly připravovány podle takulky č. 4. Celkový objem všech vzorků byl stejný a to 4 ml. Koncentrace BSA byla také ve všech vzorcích shodná a měla hodnotu $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Jednotlivé vzorky se lišily pouze koncentrací BPB, která byla pipetována ze zásobního roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Do jednotlivých označených lékovek byl nejprve pipetován roztok albuminu, následně pufr a nakonec roztok BPB.

Tab. č. 4; Složení jednotlivých vzorků použitých pro Scatchardův výnos. Koncentrace přidávaného BSA byla $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a koncentrace přidávané BPB byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

| číslo vzorku | V přidávaného BSA [ml] | V přidávaného pufru [ml] | V přidávané BPB [ml] |
|--------------|------------------------|--------------------------|----------------------|
| 1 | 2 | 1,98 | 0,02 |
| 2 | 2 | 1,96 | 0,04 |
| 3 | 2 | 1,92 | 0,08 |
| 4 | 2 | 1,88 | 0,12 |
| 5 | 2 | 1,84 | 0,16 |
| 6 | 2 | 1,8 | 0,2 |
| 7 | 2 | 1,7 | 0,3 |
| 8 | 2 | 1,6 | 0,4 |
| 9 | 2 | 1,5 | 0,5 |
| 10 | 2 | 1,4 | 0,6 |
| 11 | 2 | 1,2 | 0,8 |
| 12 | 2 | 0,8 | 1,2 |
| 13 | 2 | 0 | 2 |
| 14 | 4 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 4 |

2.2.6. Spektrofotometrické vyhodnocování vzorků

První pokusy o měření absorbance pro zkoumání vazby BPB na BSA pomocí Jobova výnosu probíhaly zpočátku pomocí přístroje Spekol 11. Ovšem tento přístroj neumožňuje měření absorbance při dvou vlnových délkách a ani nám neumožní proměření spektra a zjištění absorpčních maxim a minim. Bylo tedy rozhodnuto, že spektrokolorimetr Spekol 11 bude používán pouze k vyhodnocování metody kontinuálních variací. K sofistikovanějším spektrofotometrickým měřením pro zkoumání vazby BPB na BSA pomocí Scatchardova výnosu byl používán přístroj Specord M40, který umožňuje měřit dvě vlnové délky v jednom programu najednou a navíc lze proměřit celé spektrum, což znamená, že je snazší zjistit absorpční maxima a minima.

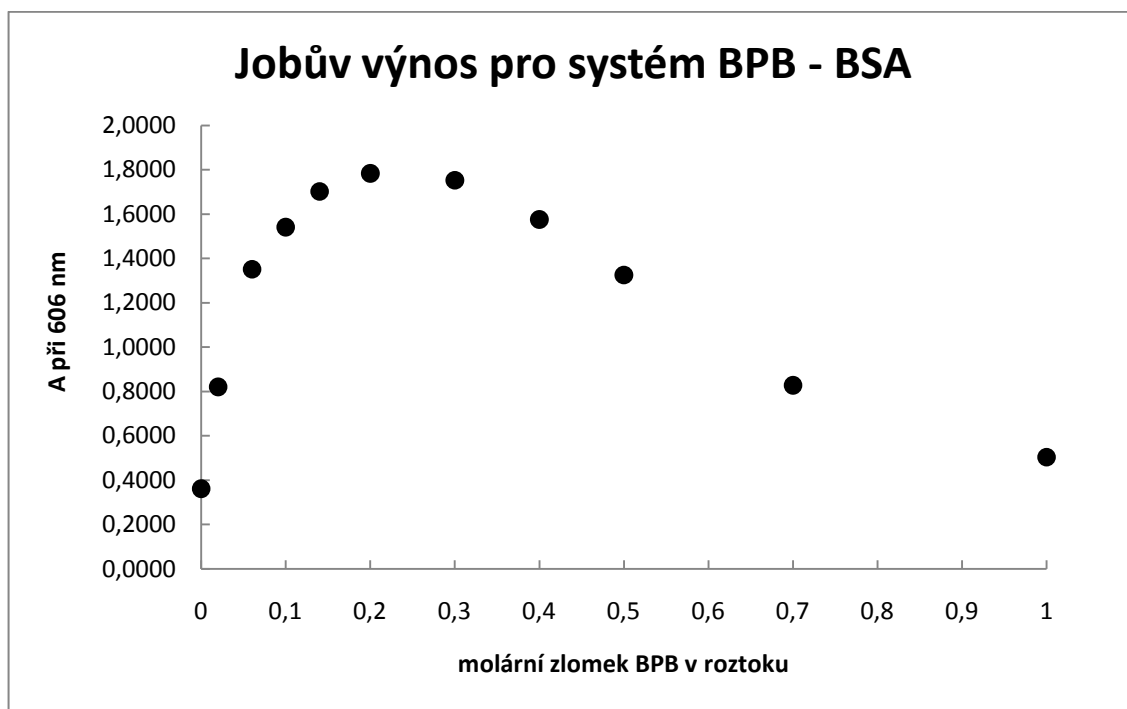
V dalším kroku byly připraveny vzorky pro vyhodnocování vazby BPB na BPB pomocí Jobova výnosu podle starých návodů do praktik a byly proměřeny jejich spektra. Maxima většina vzorků vykazovala při 445 a 606 nm. Maximum při 445 nm náleží hlavně volné BPB, maximum při 606 nm náleží převážně BPB navázané na BSA. Bohužel pík při 606 nm je ovlivněn druhým menším absorpčním maximem volné BPB při 591 nm, dochází proto k lehkému zneřesnění výsledků. Na základě těchto poznatků bylo rozhodnuto, o proměřování absorbancí při vlnových délkách 445 (maximum pro volnou BPB) a 606 (maximum pro BPB navázanou na BSA) nm.

3. VÝSLEDKY

3.1. Vyhodnocení vazby BPB na BSA pomocí Jobova výnosu

Pomocí Jobova výnosu se zkoumá poměr, v jakém se na sebe dvě různé látky vážou. Směs těchto dvou látek má tedy stále stejnou koncentraci, mění se pouze molární zlomky jednotlivých látek ve vzorku. Při spektrofotometrickém vyhodnocení umísťujeme na osu x právě molární koncentraci jedné ze složek, a na osu y vynášíme velikost absorbance vznikajícího komplexu.

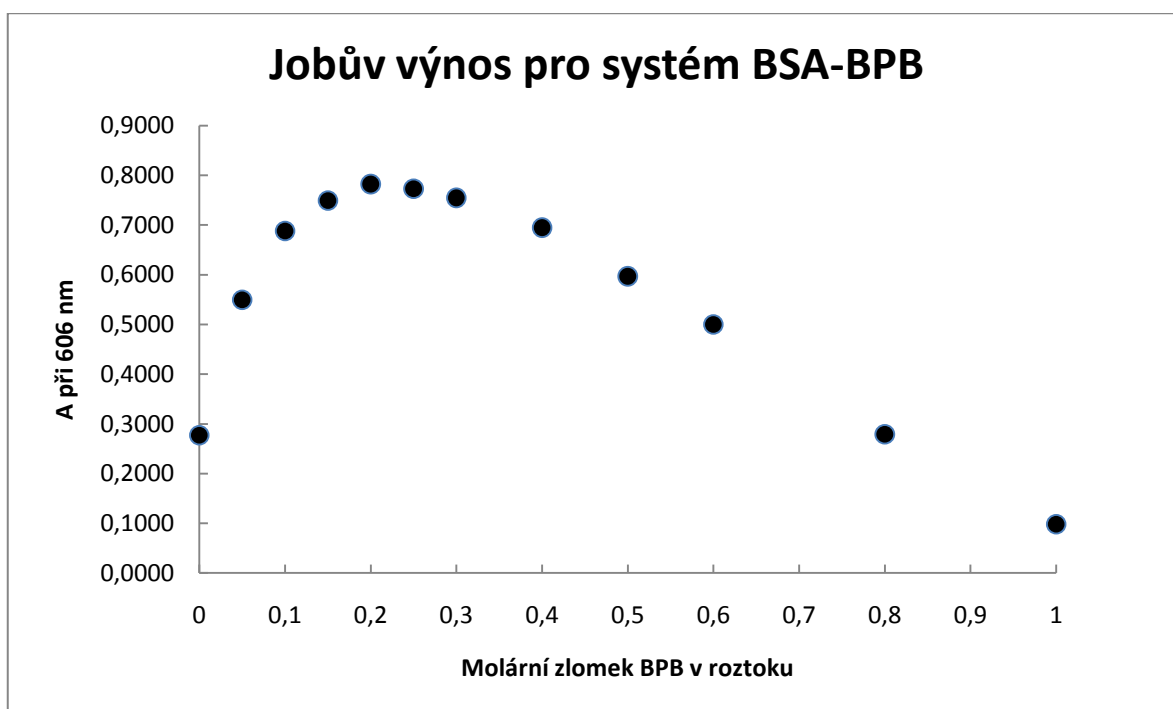
První laboratorní měření pro stanovení stechiometrie komplexu BPB-BSA pomocí metody kontinuálních variací bylo provedeno s roztoky BPB a BSA v koncentracích $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při celkovém objemu každého vzorku 5 ml. Z naměřených dat byl sestrojen graf, tento graf je znázorněn na obrázku č. 9.



Obr. č. 9; Graf závislosti absorbance při vlnové délce 606 nm na molárním zlomku BPB v roztoku. Koncentrace přidávaných roztoků BPB a BSA byla $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Na sestrojeném grafu je jasně patrné maximum křivky. Molární zlomek BPB v maximu je 0,2, z čehož vyplývá, že stechiometrie komplexu BSA a BPB je při pH 3,3 rovna poměru 1:4.

Ovšem hodnoty naměřené absorbance byly velmi vysoké (maximum absorbance dosahovalo hodnoty 1,784), bylo tedy rozhodnuto o snížení koncentrace BSA i BPB na $2 \cdot 10^{-5}$. Takto koncentrované zásobní roztoky budou použitelné i pro přípravu roztoků použitých pro měření dat pro Scatchardův výnos. S těmito sníženými koncentracemi a lehce poupraveným složením jednotlivých vzorků bylo provedeno další proměření absorbance při 606 nm a takto získaná data byla vynesena pomocí Jobova výnosu na obrázku č. 10. I v tomto případě byl molární zlomek BPB v maximu roven hodnotě 0,2. Z hodnoty molárního zlomku maxima lze vypočítat, že při pH = 3,3 se na molekulu BSA vážou 4 molekuly BPB.



Obr. č. 10; Graf závislosti absorbance při vlnové délce 606 nm na molárním zlomku BPB v roztoku.

3.2. Vyhodnocení vazby BPB na BSA pomocí Scatchardova výnosu

Při zkoumání stechiometrie komplexu pomocí Scatchardova výnosu titrujeme protein ligandem. Koncentrace BSA byla konstantní ve všech lékovkách a to v hodnotě $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Koncentrace BPB se v roztocích měnila a to od hodnoty $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až do $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Naměřené absorbance jsou i s koncentracemi BSA a BPB v roztoku uvedeny v tabulce č. 5.

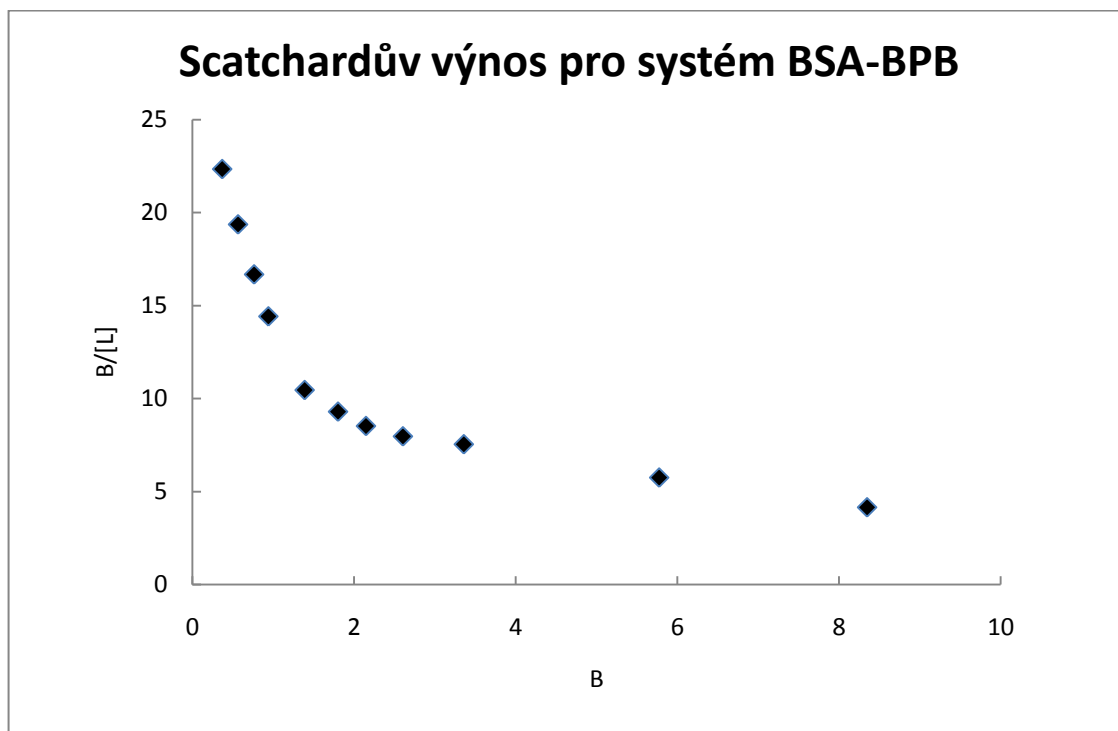
Tab. č. 5; Složení a naměřené absorbance jednotlivých vzorků. Vzorek č. 14 byl zředěn na polovinu, změřen a hodnota absorbance byla poté vynásobena dvěma.

| číslo vzorku | koncentrace BPB v roztoku [mol.l-1] | koncentrace BSA v roztoku [mol.l-1] | Absorbance při 445 nm | Absorbance při 606 nm |
|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | $5 \cdot 10^{-7}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,0007 | 0,0261 |
| 2 | $1 \cdot 10^{-6}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,0013 | 0,0457 |
| 3 | $2 \cdot 10^{-6}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,0072 | 0,0826 |
| 4 | $3 \cdot 10^{-6}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,0119 | 0,1271 |
| 5 | $4 \cdot 10^{-6}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,0175 | 0,1726 |
| 6 | $5 \cdot 10^{-6}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,0235 | 0,2135 |
| 7 | $7,5 \cdot 10^{-6}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,0428 | 0,3195 |
| 8 | $1 \cdot 10^{-5}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,0603 | 0,4169 |
| 9 | $1,25 \cdot 10^{-5}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,0765 | 0,4992 |
| 10 | $1,5 \cdot 10^{-5}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,0975 | 0,6078 |
| 11 | $2 \cdot 10^{-5}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,131 | 0,7863 |
| 12 | $3 \cdot 10^{-5}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,2781 | 1,378 |
| 13 | $5 \cdot 10^{-5}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,5258 | 2,05 |
| 14 | $1 \cdot 10^{-4}$ | - | 2,211 | 1,072 |
| 15 | - | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,0008 | 0,0156 |

Od naměřených hodnot absorbancí jednotlivých směsí byla odečtena hodnota absorbance BSA při daných vlnových délkách.

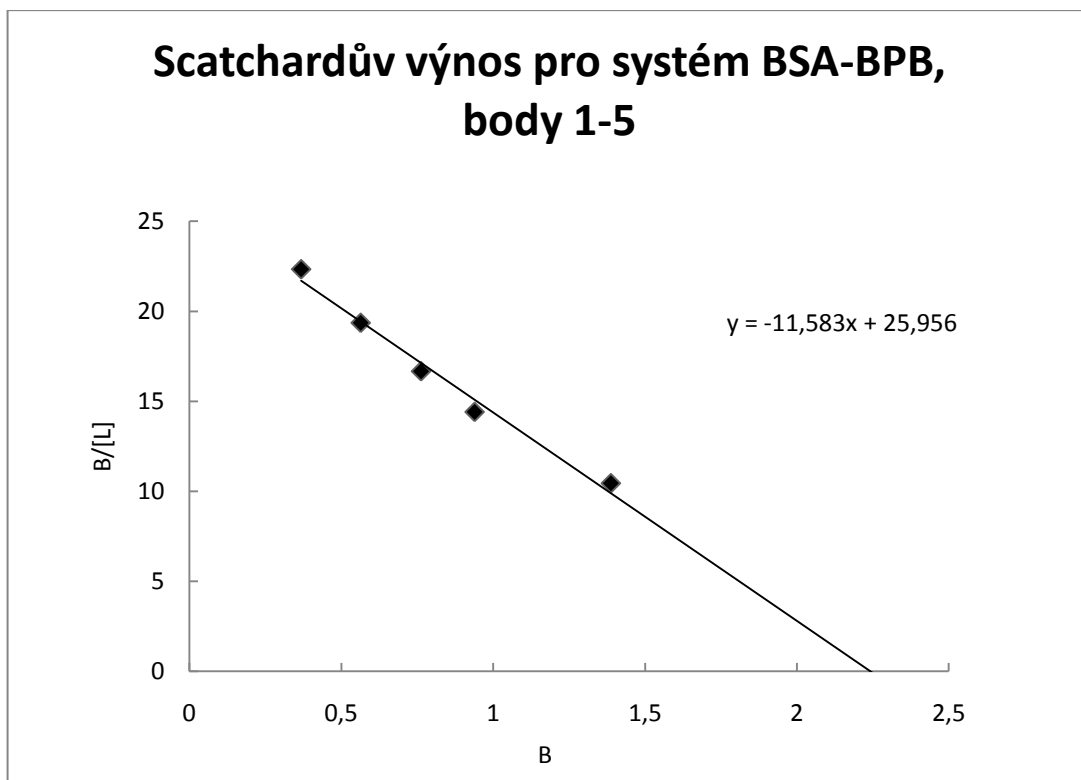
Extinční koeficienty pro volnou a vázanou BPB byly vypočítány z jednotlivých absorbancí při 445 nm a při 606 nm a to podle vztahu č. 2.

V dalším kroku byly z nyní již známých extinčních koeficientů vypočteny podle vztahu č. 5 koncentrace pro vázanou BPB na albumin a volnou BPB v roztoku. Tyto koncentrace vázané a volné BPB byly vstupními daty pro Scatchardův výnos. Tato vstupní data byla vynesena pomocí Scatchardova výnosu a jsou znázorněna na obrázku č. 11.

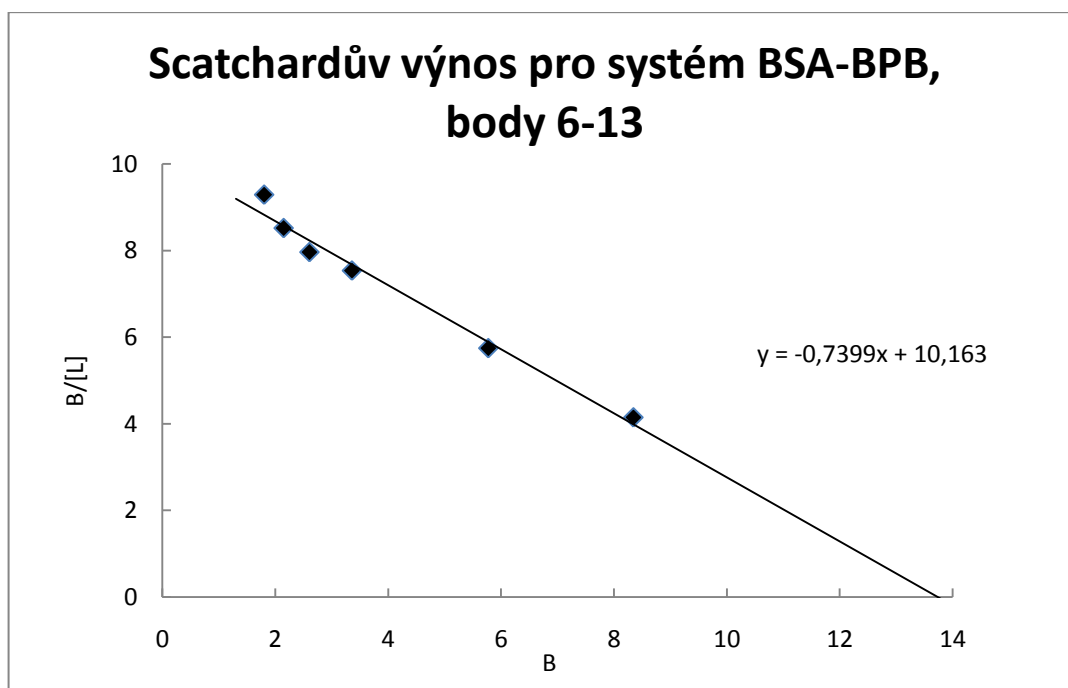


Obr. č. 11; Scatchardův výnos, k roztoku BSA o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla přidávána BPB v rozsahu koncentrací $5 \cdot 10^{-7}$ až $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Je zcela jasné, že tento graf nelze proložit jednou přímkou. Ovšem, graf lze rozdělit na dvě samostatné části. Vezmeme-li prvních 5 bodů z grafu a vytvoříme z nich nový graf, potom jej lze proložit přímkou velmi dobře. To samé platí pro graf složený z bodů 6-13. Takto vytvořené grafy jsou zobrazeny na obrázcích č. 12 a 13.



Obr. č. 12; Scatchardův výnos pro prvních 5 bodů z obr. č. 10 proložený lineární regresí.



Obr. č. 13; Scatchardův výnos pro body 6 až 13 z obr. č. 10, proložený lineární regresí.

Následně z rovnic regresních přímek vypočteme hodnoty x pro $x = 0$ (tedy souřadnice průsečíku s osou x). Tak získáme maximální počet molekul BPB vázaných ve vazebných místech albuminu s vyšší (popřípadě nižší) afinitou k BPB.

Rovnice regrese pro vazebná místa BSA pro BPB s vyšší afinitou:

$$y = -11,583 + 25,956x$$

Po dosazení za $x = 0$ dostaneme maximální možný počet molekul BPB vázaný vazebnými místy s vyšší afinitou.

$$x = 2,241$$

Vazebná místa na BSA s vyšší afinitou tedy váží 2 molekuly BPB.

Rovnice regrese pro vazebná místa BSA pro BPB s nižší afinitou:

$$y = -0,7399 + 10,163x$$

Po dosazení za $x = 0$ dostaneme maximální možný počet molekul BPB vázaný vazebnými místy s nižší afinitou.

$$x = 13,736$$

4. DISKUZE

4.1. Vyhodnocení vazby BPB na BSA pomocí Jobova výnosu

Podle mého měření a následných výpočtů tvoří BSA a BPB komplex se stechiometrií 1:4. Na jednu molekulu BSA se tedy váží 4 molekuly BPB. To je v rozporu se závěry publikovanými v práci [28] podle kterých, se na molekulu albuminu váží 2 molekuly BPB a tedy stechiometrie komplexu BSA-BPB je 1:2. Ovšem musíme si uvědomit, že naše měření bylo prováděno při pH v hodnotě 3,3 oproti tomu měření Bertshe a jeho spolupracovníků bylo prováděno v Tris pufru, který zajišťoval v roztocích konstantní pH o hodnotě 8.

Toto zjištění je tedy v souladu s již známými charakteristikami vazby ligandů na albumin [1]. Je známo, že při poklesu pH do velmi kyselé oblasti (pod pH 4) dochází k reverzibilnímu rozbalování molekuly albuminu. Kolem pH 3 dochází k dalšímu rozvolňování struktury molekuly albuminu a tedy dalšímu potencionálnímu odhalování vazebných míst.

S nejvyšší pravděpodobností lze tedy tvrdit, že vlivem kyselého prostředí v roztoku dochází k postupnému rozbalování struktury molekuly albuminu (přechod od konformeru N k konformeru F, k rozvolnění struktury na konformer E nejspíše nedochází, jelikož tato konformace převažuje až při pH menším než 3 [1]) a tímto rozbalením se odhalují další vazebná místa, která jsou schopná vázat BPB.

4.2. Vyhodnocení vazby BPB na BSA pomocí Scatchardova výnosu

Ze Scatchardova výnosu, lze celkem snadno odečíst, že molekula albuminu obsahuje (aspoň v rozmezí námi použitých koncentrací) dva typy vazebných míst. První typ má afinitu k BPB vyšší, druhý typ vazebných míst má afinitu k BPB nižší.

Vazebná místa albuminu s vyšší afinitou k BPB mohou vázat maximálně 2 molekuly BPB. Teprve v momentu, když jsou všechna tato vazebná místa s vyšší afinitou obsazena molekulami BPB, začínají molekuly BPB obsazovat vazebná místa s nižší afinitou. Maximální počet molekul BPB obsazujících na albuminu vazebná místa s nižší afinitou je 14. Místa s vyšší afinitou jsou obsazována BPB díky vysoké afinitě přednostně, a tedy odpovídají strmé části grafu, místa s nižší afinitou jsou obsazována s nižší pravděpodobností než místa s vyšší afinitou (díky menší vazebné konstantě) a tvoří tedy část grafu s menším sklonem. Počet molekul BPB vázaných BSA lze velmi silně ovlivnit pomocí iontové síly. Molekula BPB má dva záporné náboje, soutěží tedy s jinými anionty v roztoku (disociovaná kyselina citronová nebo citrónan) o vazebná místa. Počet obsazovaných vazebných míst tedy závisí i na koncentraci a to jak pufru, tak samotné BPB.

Ze získaných dat a díky jejich vynesení pomocí Scatchardova výnosu lze tedy usoudit, že BSA obsahuje dva různé typy vazebných míst pro BPB. Jeden typ má vyšší vazebnou konstantu a může vázat maximálně 2 molekuly BPB. Druhý typ má vazebnou konstantu v porovnání s prvním typem menší. Tento druhý typ, slaběji vázající BPB, může celkem vázat až 13 molekul BPB.

4.3. Porovnání výsledků Jobova a Scatchardova výnosu

Pomocí Jobova výnosu bylo zjištěno, že BSA tvoří s molekulami BPB komplex a stechiometrie tohoto komplexu je 1:4. Ze Scatchardova výnosu byla získána informace o existenci dvou různých typů vazebných míst pro BPB na molekule BSA. Tato vazebná místa váží maximálně 2 a 13 molekul BPB. Znamená to tedy, že jsou výsledky mezi sebou v rozporu?

Nejsou, pomocí Jobova výnosu totiž zjišťujeme stechiometrii komplexu v rovnováze. Oproti tomu pomocí Scatchardova výnosu zkoumáme počet vazebných míst s různými afinitami a počet molekul BPB vázaných jednotlivými vazebnými místy. Výsledky práce lze tedy shrnout do konstatování, že molekula

BSA tvoří s BPB komplex o stechiometrii 1:4. Při tvorbě tohoto komplexu jsou obsazována dvě místa s vyšší afinitou a dvě místa s nižší afinitou, zbývající místa s nižší afinitou jsou obsazována až při přebytku BPB v roztoku. Není tedy vyloučeno, že kdyby se pokračovalo ve zvyšování koncentrací BPB ve vzorcích pro Scatchardův výnos, došlo by na grafu k objevení dalšího úseku s opět menším sklonem. Tento další úsek grafu by odpovídal možnosti, že molekula BSA obsahuje další vazebná místa s menšími afinitami. [13]

5. Závěr

Stávající úloha pokročilého biochemického praktika byla rozšířena o vyhodnocování vazby pomocí Scatchardova výnosu. Tento výnos umožní studentům určit počet vazebných míst pro BPB na molekule BSA, jejich afinity a počty molekul BPB vázaných jednotlivými vazebnými místy.

V druhé části této úlohy bylo optimalizováno složení jednotlivých roztoků pro metodu kontinuálních variací. Výsledkem bude tedy přehlednější graf s čitelnějším maximem.

Časová náročnost úlohy není ani po přidání vyhodnocování vazby pomocí Scatchardova výnosu nikterak velká. Šikovný student zvládne roztoky připravit a proměřit jejich absorbance na spektrofotometru za dvě hodiny.

6. Seznam použité literatury a internetových zdrojů

- [1] Peters, T., jr.: All about albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications, American Elsevier, New York (1995)
- [2] Behrens, P.Q., Spiekerman, A.M., Brown, J.R.: Structure of human serum albumin, Fed. Proc. 34, 591 (1975)
- [3] Brown, J.R.: Structure of bovine serum albumin, Fed. Proc. 34, 591 (1975)
- [4] Meloun, B., Morávek, L., Kostka, V.: Complete amino acid sequence of human serum, FEBS letters 58, 134-137 (1975)
- [5] Wallevik, K.: Spontaneous in vivo isomerization of bovine serum albumin as a determinant of its normal catabolism., J Clin Invest. 57, 398-407 (1976)
- [6]http://wikipremed.com/image_science_archive_68/040706_68/373600_ALB_structure_68.jpg 26.4.2011
- [7] Marshall, A.G.: Biophysical chemistry, principles, techniques and applications, John Wiley & Sons, New York, 391-462 (1978)
- [8] Ohyoshi, E., Hamada, Y., Nakata, K., Kohata, S.: The interaction between human and bovine serum albumin and zinc studied by a competitive spectrophotometry, J. Inorg. Biochem. 75, 213 - 218 (1999)
- [9] Quinlan, G.J., Martin, G.S., Evans, T.W. : Albumin: biochemical properties and therapeutic potential, Hepatology 41, 1211-1219 (2005)
- [10] O'Neil, M.J.: The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, Merck and Co, New Jersey, 236 (2006)
- [11] Wengenmayer, F., Ueberschär, K. H., Kurz, G.: Alterations of enzymes by riboflavin and by bromophenol blue during preparative disc.electrophoresis, Febs letters 40, 224-228 (1974)

- [12] <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Sledovaci%20barvivo.htm> 13.4.2011
- [13] Wei, Y-J., Li, K-A., Tong, S-Y.: The interaction of Bromphenol Blue with proteins in acidic solution, *Talanta* 43, 1 - 10 (1996)
- [14] <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/186indicator.html> 12.5.2011
- [15] <http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/indikato/priklady/acidoba2.html> 27.4.2011
- [16] Kreft, S., Kreft M., Physicochemical and physiological basis of dichromatic colour, *Naturwissenschaften* 94, 935-939 (2007)
- [17] Kim B.B., Kadir A.H., Tayybab S.: Bromphenol blue binding to mammalian albumins and displacement of albumin-bound bilirubin, *Pak. J. Biol. Sci.* 20, 2418-2422 (2008)
- [18] Bjerrum, J.O.: Interaction of bromophenol blue and bilirubin with bovine and human serum albumin determined by gel filtration, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 22, 41-48 (1968)
- [19] Lepper, E. H., Martin, C. J.: The protein error in estimating pH with neutral red and phenol red, *Biochem. J.* 21, 356 - 361 (1927)
- [20] Klotz, I.M.: Ligand-protein binding affinities v knize *Protein function, a practical approach*, (Creighton, T. E. ed.), IRL Press, Oxford, 25-54 (1989)
- [21] Kranhanzl, A., Hladík, J. a kolektiv: *Biochemické metody, Návody k pokročilým praktickým cvičením*, skriptum PřF UK Praha, 113-115, (1991)
- [22] Dawes, E.A.: *Kvantitativní problémy v biochemii*. (český překlad, Höfer M., Kotyk A.) Nakladatelství Československé akademie věd, Praha (1965)
- [23] Oberfelder, R.W., Lee J.C.: Measurement of ligand-protein interaction by electrophoretic and spectroscopic techniques, *Meth. Enzymol.* 117, 381-414 (1985)

- [24] Sigel, E., Buhr, A.: The benzodiazepine binding site of GABAA receptors, Trends in Pharmacol. Sci. 18, 425-429 (1997)
- [25] Hill, Z. D., MacCarthy, P.: Novel approach to Job's method, J. Chem. Educ. 63, 162 - 167 (1986)
- [26] Huang C.Y.: Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method: the Job plot, Meth. Enzymol. 87, 509-525 (1982)
- [27] Si, Y., Hu, Q., Huang, Z., Yang, G., Yin, J.: Study on color reaction of 2-(2-quinolyazo)-5-dimethylaminoaniline with palladium and its application, Turk. J. Chem. 29, 135-140 (2005)
- [28] Bertsch, M., Mayburd, A. L., Kassner, R. J.: The identification of hydrophobic sites on the surface of proteins using absorption difference spectroscopy of bromphenol blue, Anal. Biochem. 313, 187 - 195 (2003)

