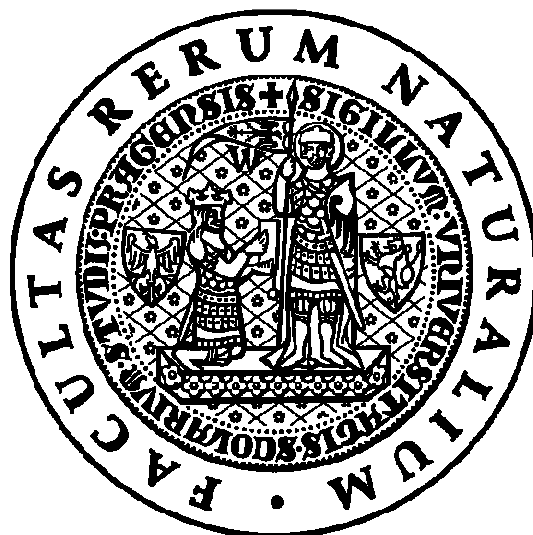


**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**„Vazba organických barviv na proteiny.**

**Možnosti využití v rámci praktika z biochemie.“**

**„Binding of organic dyes to proteins. Applications in practical  
course in biochemistry.“**

Bakalářská práce

Praha 2010

Vypracovala: Anna Hynková

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

## Prohlášení

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

V Praze dne 31. 8. 2010

.....

Anna Hynková

## Poděkování

Děkuji tímto svému školiteli Prof. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za jeho obětavé vedení mé práce, za cenné rady a pomoc při vypracování. Děkuji také své kolegyni Kateřině Vodičkové za spolupráci a konzultaci výsledků práce.

## Abstrakt

V předložené bakalářské práci byla experimentálně ověřována možnost vytvoření nové úlohy pro pokročilé biochemické praktikum, tematicky zaměřené na studium vazby nízkomolekulární látky (barviva) na makromolekulu proteinu.

Prvotním záměrem bylo v tomto směru modifikovat existující úlohu „Studium kinetiky dialýzy“. Výsledky experimentů ale ukázaly, že fluorimetrické měření v podmínkách praktika je nedostatečně reprodukovatelné a měření absorbance málo citlivé.

Proto byla vytvořena úloha nová: „Vazba bromfenolové modři na sérový albumin“, ve které je studována stechiometrie této vazby pomocí tzv. Jobova výnosu. Po optimalizaci postupu byl vytvořen návod, který je přílohou této práce.

**Klíčová slova:** fluorescein, bromfenolová modř, sérový albumin

## Abstract

In this submitted thesis the possibility of creating a new laboratory task for advanced practical courses in biochemistry, concerning the binding of a low-molecular compound (dye) to a protein macromolecule, was experimentally verified.

First intention was to modify the existing task "Dialysis kinetics" with a binding of fluorescein to a protein. However, the experiments have proved, that fluorescence measurements of this kind are not reproducible in the conditions of practical courses laboratory and absorbance measurements have low sensitivity.

Therefor a whole new task was created: "Binding of bromophenol blue to serum albumin", in which the stoichiometry of this binding is studied using so-called Job plot. After the optimization of procedure a laboratory task instructions were created, which are attached to this thesis.

**Keywords:** fluorescein, bromophenol blue, serum albumin

# Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	4
Obsah.....	5
Seznam použitých zkratek.....	7
1. Přehled problematiky.....	9
1.1 Albumin	
1.1.1 Struktura albuminu.....	9
1.1.1.1 Primární struktura a topologie albuminu.....	9
1.1.1.2 Terciární struktura.....	13
1.1.2 Lidský sérový albumin.....	13
1.1.2.1 Biosyntéza HSA.....	13
1.1.2.2 Albumin a proalbumin.....	13
1.1.2.3 Životnost albuminu.....	14
1.1.3 Vazba ligandů na albumin.....	14
1.1.3.1 Vazba mastných kyselin.....	15
1.1.3.2 Vazba iontových ligandů.....	15
1.1.3.3 Vazba barviv.....	16
1.2 Bromfenolová modř	
1.2.1 Struktura a funkce.....	17
1.2.2 Vazba BPB na albumin.....	18
1.3 Proteinová chyba indikátoru.....	18
1.4 Fluorescein.....	19
1.5 Popis přístroje SPEKOL 11.....	20
1.6 Metody studia vazby ligandů.....	20
1.7 Grafické znázornění experimentálních dat.....	21
1.7.1 Jobův výnos.....	23
2. Materiál a metody.....	24
2.1 Použité chemikálie a přístroje.....	24
2.2 Příprava roztoků a vzorků.....	24
2.2.1 Zásobní roztok bromfenolové modři.....	24
2.2.2 Citrátový pufr.....	25
2.2.3 Příprava roztoků pro kalibrační řadu fluoresceinu.....	25
2.2.4 Příprava roztoků lidského albuminu.....	26
2.2.5 Příprava vzorku fluoresceinu pro dialýzu.....	26

2.2.6	Příprava vzorků BPB v pufrách o různém pH.....	27
2.2.7	Příprava vzorků lidského albuminu s BPB pro spektrofotometrické stanovení vazby barviva na protein.....	27
2.3	Studium kinetiky dialýzy fluoresceinu.....	28
2.4	Měření absorbance vzorku v závislosti na vlnové délce (spektrofotometr HP).....	28
3.	Výsledky a diskuse.....	29
3.1	Dialýza fluoresceinu a NaCl	
3.1.1	Měření kalibrační křivky fluorescence fluoresceinu.....	29
3.1.2	Měření kalibrační křivky absorbance fluoresceinu.....	31
3.1.3	Měření absorbance a fluorescence odebíraného dialyzátu v čase.....	32
3.1.4	Konduktometrické stanovení kinetiky dialýzy.....	33
3.1.5	Dialýza fluoresceinu a NaCl – shrnutí.....	34
3.2	Vazba bromfenolové modři na albumin.....	34
3.2.1	Porovnání polohy isosbestického bodu BPB v roztocích o různém pH a ve směsi s albuminem.....	34
3.2.2	Porovnání spekter BPB navázané na albumin v pufrách o různém pH....	36
3.2.3	Vyhodnocení vazby BPB na albumin pomocí Jobova výnosu.....	38
3.2.4	Ověření postupu vyhodnocení vazby BPB na albumin pomocí Jobova výnosu pro biochemické praktikum.....	38
3.2.5	Vazba bromfenolové modři na albumin – shrnutí.....	40
4.	Závěr.....	41
5.	Seznam citací a internetových zdrojů obrázků.....	42
	Příloha 1 – Návod úlohy pro pokročilé praktikum z biochemie I.....	44

## **Seznam použitých zkratk**

BPB – bromfenolová modř

BSA – hovězí sérový albumin

ER – endoplasmatické retikulum

FA – mastné kyseliny

HSA – lidský sérový albumin

IgG – imunoglobulin G

IR – infračervená spektroskopie

LCFA – mastné kyseliny s dlouhým řetězcem

NMR – jaderná magnetická rezonance

Tato bakalářská práce vznikla za účelem vytvoření nové úlohy zabývající se vazbou nízkomolekulární látky na makromolekulu proteinu. Úloha zabývající se vazebnou studií dosud nebyla v rámci praktik zařazena, přestože se jedná o praktické procvičení poměrně důležité oblasti biochemie. Díky vazebným studiím lze získat informace např. o mechanismu vazby nebo struktuře proteinu.

Naším prvotním záměrem bylo obohatit úlohu „Studium kinetiky dialýzy“ o vazbu barviva na protein. Po provedení stávající úlohy jsme ale zjistili, že fluorescenční měření není dostatečně citlivé ani přesné. Přesto jsme se rozhodli připravit pro praktikum úlohu, která by se měla týkat vazby některého barviva na protein a kterou bude následně možné vyhodnotit spektrofotometricky.

Jako barvivo jsme zvolili bromfenolovou modř, a to z několika důvodů: je levná, barva jejího roztoku je sytá i při velmi nízké koncentraci, a prokazatelně se váže na albumin (pozorujeme výrazné změny v jejím spektru před navázáním na albumin a po něm).

Naším hlavním úkolem bylo optimalizovat postup experimentu tak, aby ho bylo možné provést v čase vyhrazeném pro praktikum a jeho výsledky co nejsnadněji vyhodnotit a interpretovat.

V následujícím přehledu problematiky jsou uvedeny důležité informace o albuminu, jeho chemických vlastnostech, použití a vazbě ligandů na něj.

Experimentální část práce je zaměřena na provedení samotného pokusu a vytvoření návodu pro novou úlohu „Vazba bromfenolové modři na sérový albumin“.



# 1. Přehled problematiky

## 1.1 *Albumin*

Albumin je jedním z nejdéle známých a nejvíce prozkoumaných proteinů. Má velmi důležité využití v základním výzkumu a klinické praxi. Je to majoritní rozpustný protein krevní plazmy všech savců. V organismu plní velké množství důležitých funkcí: je transportním proteinem mnoha důležitých látek (mastné kyseliny, vitaminy, léčiva), hraje podpůrnou roli v transportu thyroïdních a steroidních hormonů a váže a detoxikuje nekonjugovaný bilirubin<sup>[1, 2]</sup>. Dále slouží jako rezervoár aminokyselin a přispívá asi 5% aminokyselin pro periferní tkáň. Napomáhá též udržovat osmotický tlak krve<sup>[3]</sup>. Biosyntéza albuminu je velmi závislá na množství aminokyselin v těle, a proto její rychlost výrazně stoupá po každém jídle<sup>[2]</sup>.

Na fyziologické funkce albuminu byl poprvé důkladně brán zřetel v době 2. světové války, kdy se od r. 1942 intenzivně rozvíjel na Harvardu program frakcionace krevní plazmy. Vědci se v rámci tohoto programu zaměřili na nahrazení krve plazmou, neboť ve válečných podmínkách bylo těžké krevní konzervy skladovat, a zároveň byla krev životně důležitá při ošetřování raněných. Díky výzkumu frakcionace bylo pro válečné účely vytvořeno velké množství velmi čistého, stabilního albuminu zbaveného virů, a tento program zároveň přispěl k vytvoření metodologie purifikace mnoha dalších plazmatických proteinů. Albumin byl posléze běžně připravován takto čistý, a tak se stal častým modelem pro studium chemie proteinů<sup>[1]</sup>.

### 1.1.1 **Struktura albuminu**

#### 1.1.1.1 *Primární struktura a topologie albuminu*

Roku 1975 byla publikována kompletní aminokyselinová sekvence hovězího a lidského sérového albuminu J. R. Brownem a jeho spolupracovníky<sup>[4, 5]</sup>. Vzápětí publikoval aminokyselinovou sekvenci lidského albuminu B. Meloun a kol<sup>[6]</sup>. Obě práce obsahovaly zjištění, že albumin tvoří jednoduchý peptidový řetězec o více jak 580 aminokyselinách. Jak u lidského, tak hovězího albuminu byla známá jejich aminokyselinová sekvence dříve, než struktura jejich cDNA<sup>[1]</sup>.

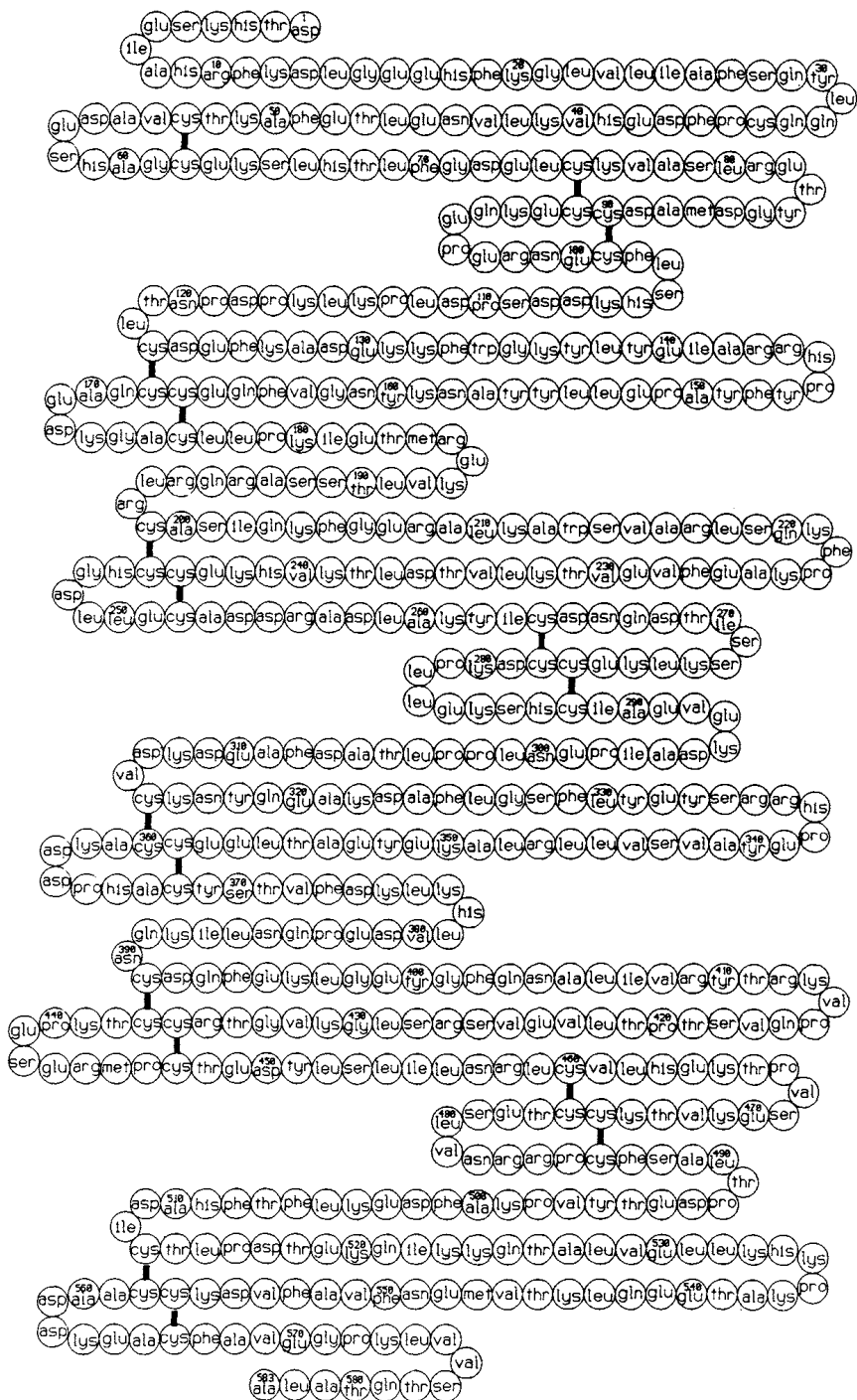
Hovězí sérový albumin (Obr. 1) obsahuje 583 aminokyselin, lidský sérový albumin (Obr. 2) 585 aminokyselin. Oba typy albuminu mají stejné zastoupení cysteinu v molekulách a tvoří stejný počet disulfidových můstků. Výrazným rysem savčího

albuminu je velmi nízký obsah tryptofanu, jen jeden nebo dva zbytky na molekulu. Oproti „typickému“ proteinu o podobném počtu aminokyselin má savčí albumin poměrně malé zastoupení methioninu, glycinu a isoleucinu. Naopak cysteinu, leucinu, kyseliny glutamové a lysinu obsahují molekuly albuminu velké množství. Velký počet ionizovaných skupin (okolo 185 nabitých skupin na molekulu při pH 7) napomáhá dobré rozpustnosti proteinu<sup>[1]</sup>.

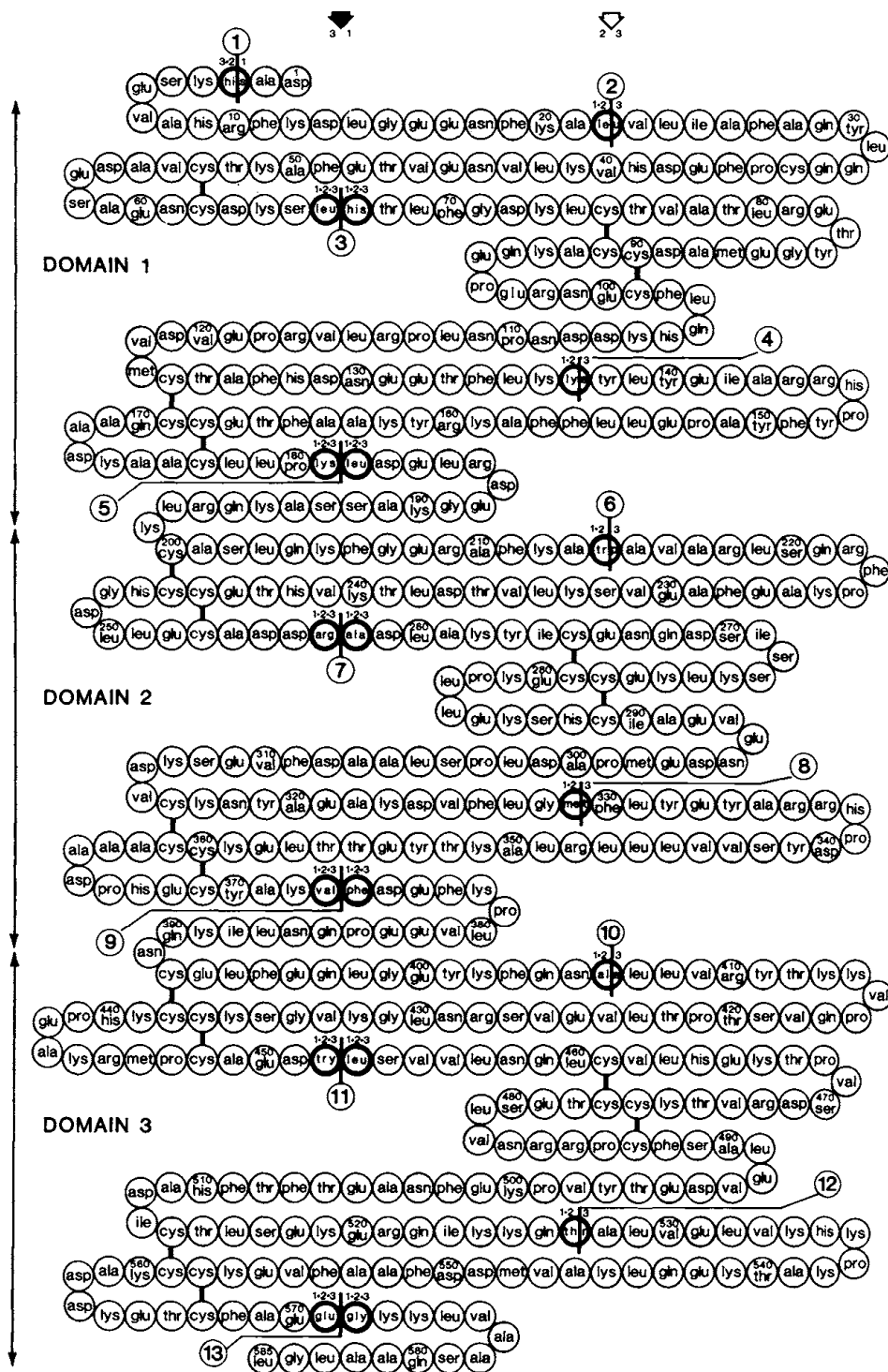
Topologie albuminu je tvořena devíti (resp. osmi a půl) dvojitými smyčkami propojenými disulfidovými můstky. Dvojité smyčky mohou být dále uspořádány do tří homologních domén, z nichž každou tvoří dvě delší smyčky a odděluje ji od ostatních kratší smyčka. Homologní domény jsou obvykle číslovány I, II a III, počítáno od N-konce, přičemž doména I obsahuje smyčky 1 až 3, doména II smyčky 4 až 6 a doména III smyčky 7 až 9<sup>[1, 7]</sup>. Každá z albuminových domén má jinou funkci, co se vazby ligandů týče. První dvě smyčky v každé doméně (tj. 1, 2, 4, 5, 7 a 8) jsou seskupeny do subdomén IA, IIA a IIIA, smyčky 3, 6 a 9 tvoří subdomény IB, IIB a IIIB (viz. Obr. 2). Toto rozdělení molekuly na jednotlivé domény a subdomény má svůj význam, který je dobře patrný při pohledu na strukturu odvozenou pomocí rentgenostrukturní analýzy<sup>[1]</sup>.

To, že je molekula uspořádána do smyček propojených můstky, může přispívat k odolnosti vůči denaturaci. Zároveň je molekula albuminu velmi flexibilní. Reverzibilní rozbalení molekuly, které nastává při poklesu pH pod 4, je vysvětlováno elektrostatickou repulzí smyček ve chvíli, kdy jsou pozitivněji nabitě. Disulfidové můstky mohou zabránit většímu poškození sekundární struktury, i když je albumin vystaven náročným podmínkám, jako například 8 mol.l<sup>-1</sup> močoviny nebo pH 1<sup>[2]</sup>.

Albumin neobsahuje žádné prosthetické skupiny ani další složky. Jako jeden z mála plazmatických proteinů není za normálních okolností glykosylován, může ale dojít k jeho glykaci (tj. neenzymovému navázání cukru, nejčastěji glukosy). Albumin sám je bezbarvý, ale díky vysoké afinitě např. k hematinu nebo bilirubinu mohou mít jeho koncentrované roztoky nažloutlou barvu<sup>[1]</sup>.



Obr. 1 – Hovězí sérový albumin<sup>[1]</sup>; aminokyselinová sekvence



**Obr. 2 – Lidský sérový albumin<sup>[1]</sup>**; aminokyselinová sekvence s vyznačením tří domén; číslované šipky v horní části obrázku označují pozici intronů v nesestříhaném mRNA

### 1.1.1.2 Terciární struktura

Dlouho se předpokládalo, že by molekula albuminu měla mít vysoce helikální strukturu. Krystalografická analýza potvrdila, že 67% vykrystalizovaného albuminu vytváří 28 oblastí  $\alpha$ -helixů. Zbytek molekuly je tvořen peptidovým řetězcem s 10%  $\beta$ -otáček<sup>[1]</sup>. Všechny tři domény jsou strukturně velmi podobné, jak již bylo zmíněno, každá je rozdělena na dvě subdomény, které jsou tvořeny třemi až čtyřmi  $\alpha$ -helixy spojenými dohromady dlouhým úsekem  $\alpha$ -helixu. Subdomény IA, IB a IIA jsou sbaleny těsně u sebe a tvoří dohromady rozšířenou hlavu molekuly, subdomény IIB, IIIA a IIIB vytvářejí protáhlý ocas<sup>[7]</sup>.

## 1.1.2 Lidský sérový albumin

### 1.1.2.1 Biosyntéza HSA

Albumin je, podobně jako jiné plazmatické bílkoviny, syntetizován v játrech, nejprve ve formě tzv. proalbuminu. Jeho biosyntéza je podobná jako u běžných proteinů: transkribuje se úsek DNA do mRNA, poté proběhne translace na ribozomech v drsném endoplasmatickém retikulu a vznikne nový protein, ten je přenesen z drsného ER do hladkého ER, z něj putuje do Golgiho komplexu a z Golgiho aparátu přes buněčnou membránu přechází albumin do krevního oběhu. Rozdílné oproti ostatním proteinům je to, že se netvoří žádné depozity albuminu, ze kterých by byl v případě potřeby uvolňován<sup>[2]</sup>.

Denně je syntetizováno asi 14 gramů albuminu, což odpovídá přibližně jedné osmině celkového množství proteinů, které vytváří játra. Jiné proteiny, např.  $\alpha$ - a  $\beta$ -globuliny jsou syntetizovány v podobně velkém množství za den jako albumin, jelikož se ale cirkulací v krevním oběhu opotřebí mnohem více než albumin, jejich koncentrace v séru je obvykle mnohem nižší<sup>[2]</sup>.

Albumin se v největším množství nachází v krevní plazmě, v níž má koncentraci přibližně  $0,6 \text{ mmol.l}^{-1}$ , můžeme jej též však nalézt v tkáních a tělních sekretech<sup>[3]</sup>. Nepatrné množství albuminu přechází hemoencefalickou bariérou do mozkomíšního moku.

### 1.1.2.2 Albumin a proalbumin

Bylo zjištěno, že rozdíl mezi proalbuminem a albuminem tkví v malém úseku peptidového řetězce na N-konci proteinu. V drsném endoplasmatickém retikulu se nachází protein ještě ve formě proalbuminu a na albumin jej přeměňuje nejspíše Golgiho aparát.

Na rozdíl od jiných proteinů není albumin v Golgiho aparátu koncentrován do váčků, ve kterých by byl transportován ven z buňky, ani glykosylován. Není znám ani důvod, proč je albumin syntetizován ve formě proalbuminu, neboť nemá enzymatické účinky jako např. trypsin, aby musel být dočasně inaktivován, ani nepotřebuje pro-formu k vytváření disulfidových můstků jako insulin, neboť je schopen je vytvořit samostatně. Pro-forma je tedy nejspíše tvořena kvůli regulaci schopnosti vázat mnoho ligandů v buňce, nebo může být jakýmsi regulátorem syntézy albuminu<sup>[2]</sup>.

#### 1.1.2.3 Životnost albuminu

Biologický poločas albuminu je velmi dlouhý, kolem dvaceti dní. Tento fenomén je nejspíše způsoben jeho strukturou v podobě smyček, která zajišťuje proteinu flexibilitu a stabilitu, přestože je neustále vystaven cirkulaci krve. Podobně stabilním proteinem je i imunoglobulin G (IgG). Obsahuje čtyři peptidové řetězce oproti albuminu, ale každý z těchto řetězců je stejně jako ten albuminový tvořen smyčkami propojenými disulfidovými můstky. Biologický poločas IgG je asi 27 dní<sup>[2]</sup>.

### 1.1.3 Vazba ligandů na albumin

Albumin má unikátní vlastnost vázat menší molekuly mnoha typů. Díky struktuře, která je tvořena třemi doménami, poskytuje množství míst, kam mohou se ligandy vázat. Interaguje s velmi širokým spektrem látek: nejsilněji se vážou hydrofobní organické anionty střední velikosti, 100 až 600 Da dlouhé řetězce mastných kyselin, hematin a bilirubin. Menší a méně hydrofobní látky, jako je tryptofan a kyselina askorbová, jsou vázány méně silně, avšak jejich vazba může být vysoce specifická<sup>[1]</sup>. V klinické praxi hraje afinita albuminu k látkám mnoha typů velmi důležitou roli, neboť díky ní může mít protein výrazný efekt na farmakokinetiku léčiv<sup>[3]</sup>.

Pro mnoho endogenních látek představuje albumin rezervoár, odkud mohou být uvolňovány ve velkém množství díky rozpustnosti proteinu v krevní plasmě. Na druhou stranu díky své reaktivitě může albumin navázat potenciální toxiny a transportovat je do míst účinku, kde škodí organismu<sup>[1]</sup>.

### 1.1.3.1 Vazba mastných kyselin

Nejdůležitějším ligandem albuminu jsou mastné kyseliny (FA), neboť jsou v krevní plazmě nerozpustné a potřebují přenašeč. Vazba FA na albumin má pravděpodobně také vliv na stabilitu proteinu. Pokud nejsou na protein navázány mastné kyseliny, je náchylnější vůči degradaci proteasami<sup>[2]</sup>.

Albuminem je v organismu transportováno 99,9% mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCFA), pouze 0,1% LCFA se nachází v krvi neesterifikováno<sup>[1]</sup>. Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem jsou vázány na albumin na šesti místech, tři nejsilnější vazby jsou lokalizovány na různých doménách: první se nachází mezi smyčkami 8 až 9, druhá na smyčce 6 a třetí na smyčce 3. Každé z těchto vazebných míst obsahuje bazické aminokyseliny, buď Arg nebo Lys<sup>[1]</sup>.

### 1.1.3.2 Vazba iontových ligandů

Informace o vazbě iontů na albumin jsou velice důležité, neboť některé ionty se účastní biochemických dějů v organismu ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a další) a navázáním na protein se může změnit jejich další osud. Naopak ionty, které nejsou tělu vlastní, mohou organismu po navázání na albumin škodit, protože tím např. zablokují jeho vazebná místa pro jiné důležité látky. V následujícím přehledu jsou uvedeny některé důležité ionty vázající se na protein.

*Měďnaté a nikelnaté ionty* jsou vázány molekulami savčího albuminu různých druhů specifitěji a pevněji než jiné kationty.

Měďnaté ionty se vážou na N-konec proteinu, kde tvoří velmi pevný chelátový kruh s  $\alpha\text{-NH}_2$  dusíkem kyseliny asparagové, s dusíkovými atomy prvních dvou peptidových vazeb a 3-N imidazolového kruhu histidinu<sup>[1]</sup>. Tato vazba byla studována i na synteticky připravených peptidech, jejichž pořadí aminokyselin odpovídalo N-konci molekuly albuminu, a poté byla charakterizována pomocí  $^1\text{H-NMR}$ <sup>[8]</sup>. Při vazbě  $\text{Cu}^{2+}$  dochází ke spektrálnímu posunu, který lze pozorovat i pouhým okem, protože z modrého roztoku volných iontů se po přidání albuminu stane jasně purpurový.

Nikelnaté ionty se stejně jako měďnaté vážou na N-konec proteinu. Tvoří především kruhově-planární cheláty, ale asi 30% ligandu vytváří oktaedrální strukturu, která je méně stabilní. Roztok  $\text{Ni}^{2+}$  iontů navázaných na albumin má žlutou barvu<sup>[1]</sup>.

V krevní plazmě je asi 10% měďnatých iontů navázáno na albumin, většina je inkorporována do ceruloplasminu. Nikelnatých iontů se v plazmě vyskytuje velmi málo a jejich transport je velmi pomalý<sup>[1]</sup>.

Interakce vápenatých a hořečnatých iontů s albuminem byla studována poměrně důkladně, neboť se jedná o velmi důležité ionty pro organismus.

Asi 45% vápenatých iontů v krvi se vyskytuje volně, 45% je vázáno na plazmatické bílkoviny, nejčastěji albumin, a 10% tvoří komplexy s malými molekulami, jako je citrát nebo fosfát. Vazba  $\text{Ca}^{2+}$  na albumin není nijak specifická, jeho afinita k proteinu se však zvyšuje po navázání mastných kyselin na albumin, hlavně *cis*-nenasyčených<sup>[1]</sup>.

Hořečnaté ionty mají k albuminu o něco menší afinitu než vápenaté a jejich množství v organismu je asi poloviční než vápenatých. Asi 45%  $\text{Mg}^{2+}$  iontů je navázáno na plazmatické proteiny<sup>[1]</sup>.

Zinek je kvantitativně a biologicky nejdůležitější nealkalický kov transportovaný albuminem. Spolupracuje s více jak 100 enzymy (např. s alkohol dehydrogenasou), a asi 65% z jeho celkového množství v organismu je vázáno slabou vazbou na albumin<sup>[1]</sup>. Jeho afinita k albuminu je ve srovnání s měďnatými nebo nikelnatými ionty velmi nízká<sup>[9]</sup>. V roztocích o pH 6 - 8 se váže na albumin v poměru 1:1, s klesajícím pH klesá i zdánlivá disociační konstanta Zn-HSA/BSA<sup>[9]</sup>.

V minulých letech byl prováděn výzkum vazby nejrůznějších iontů a jejich vazby na albumin, např. stříbrných pomocí rovnovážné dialýzy či UV a Ramanovy spektroskopie<sup>[10]</sup>, kobaltnatých pomocí UV/VIS spektroskopie<sup>[11]</sup>, ytterbia(III) a gadolinia(III) pomocí kompetitivní spektroskopie<sup>[12]</sup>, komplexu platiny(II) pomocí cirkulárního dichroismu<sup>[13]</sup> a dalších. Výsledky výzkumů přinesly nejen nové informace o tom, na jakou část molekuly albuminu se ionty vážou, ale i nové poznatky o možnosti využití některých iontů kovů či jejich komplexů v medicíně.

### 1.1.3.3 Vazba barviv

Barviva jsou velmi oblíbenými ligandy, protože jsou dobře viditelná a často jejich vazbu na protein doprovází barevná změna. Při stanovování pH pomocí acidobazických indikátorů může dojít k tzv. proteinové chybě indikátoru, která je diskutována v odstavci 1.3. U mnohých barviv jsou známy jejich asociační konstanty (viz. Tabulka 1). Jednu z nejsilnějších vazebných konstant má sulfobromftalein ( $K_A = 1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ), který se



používal desetiletí k měření jaterních funkcí. Až mnohem později se ukázalo, že je to toxická látka<sup>[1]</sup>. Jiná barviva např. pomáhají při izolaci albuminu (Cibacron Blue), slouží jako značky vazebných míst na albuminu (trijodbenzoát)<sup>[1]</sup>, nebo lze díky nim stanovit obsah proteinů v moči (Coomassie Blue)<sup>[14]</sup>. Díky barevnosti komplexů barvivo-protein je snadné stanovit vazbu spektrofotometricky.

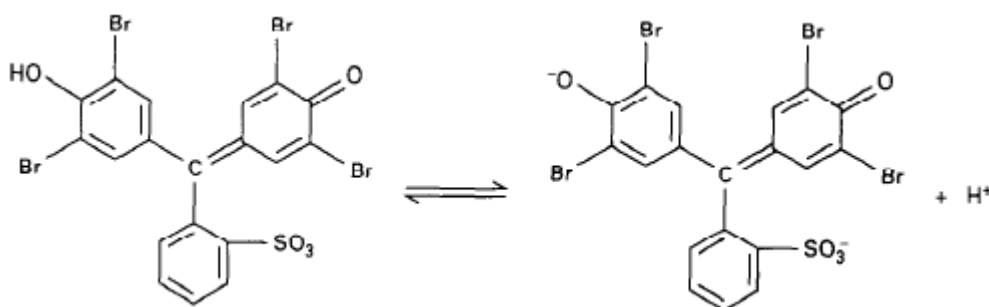
**Tabulka 1 – Disociační konstanty některých barviv<sup>[1]</sup>**

Barvivo	$K_A (M^{-1})$
Fenolová červeň	$2,8 \cdot 10^4$
Bromkresolová zeleň	$7,0 \cdot 10^5$
Bromfenolová modř	$1,5 \cdot 10^6$
Sulfobromftalein	$1,7 \cdot 10^7$
Methyloranž	$2,2 \cdot 10^3$
Methylová červeň	$2,2 \cdot 10^5$

## 1.2 Bromfenolová modř

### 1.2.1 Struktura a funkce

Bromfenolová modř (BPB) (3',3'',5',5''-tetrabromfenolsulfoftalein) se používá jako acidobazický indikátor a také při provádění gelových elektroforéz jako barvivo, díky němuž můžeme pozorovat průběh elektroforézy.



**Obr. 3 – Bromfenolová modř<sup>[15]</sup>**

Chemickou povahou je BPB slabá kyselina ( $pK_A = 3,85^{[15]}$ ). Při acidobazických titracích mění barvu v úzkém rozmezí pH: 3 (žlutá barva) až 4,6 (fialová barva)<sup>[16]</sup>.

Velmi zajímavou vlastností, již BPB vykazuje, je tzv. dichromatismus. Dichromatismus je jev, kdy barva či barevný odstín dané látky (či jejího roztoku) závisí na její koncentraci a zároveň na tloušťce vrstvy, ve které se látka nachází. Při pozorování roztoku BPB bylo zjištěno, že se jeví např. v kádince vínově červený a ve zkumavce naopak modrý. Stejnou vlastnost má i dýňový olej (v silné vrstvě v lahvi je červený, v tenké vrstvě v salátu zelený)<sup>[17]</sup>. U většiny látek se tato vlastnost neprojevuje. Na tloušťce vrstvy a koncentraci závisí pouze jas a sytost barvy, nemění se barva jako taková.

### 1.2.2 Vazba BPB na albumin

Existuje několik důvodů, proč je vazba BPB na proteiny potenciálně zajímavá – může přinést informace o struktuře daného proteinu nebo jejích změnách<sup>[18]</sup> či mechanismu vazby malých molekul barviva na protein<sup>[19]</sup>. Využívá se také ke stanovení proteinů v moči nemocných osob<sup>[20]</sup>.

Vazby bromfenolové modři na proteiny, potažmo albumin, je nejčastěji studována spektrofotometricky. Spektrum BPB tvoří dva významné píky, jeden odpovídá protonované formě barviva a druhý deprotonované (viz. Obr. 3). V pufrch o různém pH vždy jedna z forem převažuje, tudíž se mění hodnota absorbance absorpčního maxima obou píků. Vlnová délka absorpčních maxim se s rostoucím či klesajícím pH nezmění a ve spektru se vytváří isosbestický bod<sup>[15, 19]</sup>.

Ve spektru bromfenolové modři ve směsi s albuminem v kyselém prostředí pozorujeme změny spektra oproti volné BPB: změní se vlnová délka absorpčních maxim, hodnoty absorbancí absorpčních maxim i poloha isosbestického bodu<sup>[15, 19]</sup>. Vzhledem k tomu, že reakce BPB s albuminem probíhá v kyselém prostředí, lze soudit, že komplex BPB-albumin vznikne díky elektrostatické interakci mezi proteinem a barvivem<sup>[15, 19]</sup>.

### 1.3 Proteinová chyba indikátoru

Proteinovou chybou označujeme jev, který se projevuje po přidání proteinu do roztoku acidobazického indikátoru. Tento jev může značně zkomplikovat situaci, když se má stanovit hodnota pH kolorimetricky. Např. roztok neutrální červeně má bez přidání globulinu pH 6,6. Po přidání pětiprocentního globulinu se ale jeho pH jeví jako 6,0. Nutno dodat, že při stanovení pH pomocí pH metru se po přidání proteinu pH roztoku neutrální červeně nezmění<sup>[21]</sup>. Ne všechny proteiny ale způsobí stejně velkou chybu indikátoru.

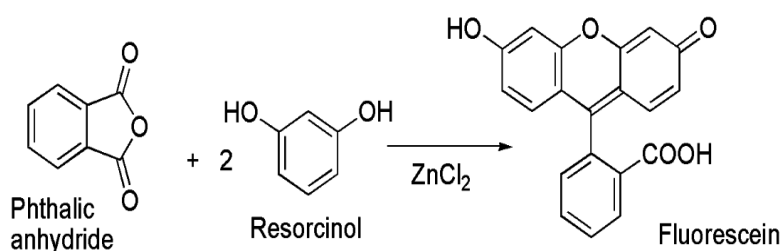
Příkladem takového proteinu je čistý vaječný albumin, který až do 7% koncentrace ve směsi s neutrální či fenolovou červení proteinovou chybu nezpůsobuje<sup>[21]</sup>.

Podstatou proteinové chyby indikátoru je interakce malých molekul barviva s makromolekulami proteinů. Existují čtyři mechanismy, kterými lze vysvětlit vznik tohoto jevu: (1) molekuly proteinu mohou porušit rovnováhu mezi monomerní a dimerní formou barviva, (2) pokud jsou molekuly proteinu a indikátoru opačně nabitě, může na sebe protein část molekul indikátoru navázat a tím porušit rovnováhu mezi bazickou a kyselou formou barviva, (3) u shodně nabitých molekul proteinu a indikátoru může dojít ke vzniku komplexů a silné elektrostatické repulzi a (4) spektra volného barviva a barviva navázaného na protein se mohou podstatně lišit<sup>[22]</sup>.

#### 1.4 Fluorescein

Fluorescein je fluoroforní barvivo, které má řadu derivátů a využívá se v mnoha oblastech lidské činnosti. Poprvé jej syntetizoval Adolf von Baeyer (nositel Nobelovy ceny za chemii z roku 1905 za výzkum organických barviv a hydroaromatických sloučenin<sup>[23]</sup>). Syntéza byla provedena tavením resorcinolu s anhydridem kyseliny ftalové za katalýzy chloridem zinečnatým<sup>[24]</sup> (Obr. 4).

Toto barvivo slouží jako kontrastní látka pro angiografii (tj. metoda vyšetřování cévního řečiště pacienta, který trpí např. onkologickým onemocněním). Při vysokých koncentracích může být pro člověka toxický<sup>[25]</sup>. Jeho deriváty lze využít také jako kontrastní látky, např. v průtokové cytometrii.



**Obr. 4 – Syntéza fluoresceinu**<sup>[26]</sup>

Sodná sůl fluoresceinu (tzv. uranin) je využívána v hydrologii při určování rychlosti a mapování vodních toků, jako jsou např. podzemní řeky. Roztok uraninu se nalije do řeky a díky fluorescenci je možné sledovat její tok. Později je uranin biologicky odbourán<sup>[24]</sup>.

## **1.5 Popis přístroje SPEKOL 11**

SPEKOL 11 je jednopaprskový spektrofotometr, vybavený mikroprocesorovou technikou. Ve spojení s měřicími násadami se přístroj používá k měření transmitance, absorbance, kinetických reakcí, fluorescence, zákalu, remise a dalších. Přístroj se skládá ze zdroje záření, mřížkového monochromátoru a detektoru záření, kterým jsou vakuová fotonka citlivá na modrou (340 – 620 nm) a vakuová fotonka citlivá na červenou (620 – 850 nm). SPEKOL je schopen měřit v rozsahu vlnových délek 340 – 850 nm v intervalu 1 nm. Při měření extinkce se umísťuje kyveta se vzorkem přímo do dráhy paprsku vycházejícího ze zdroje a na fotonku dopadá záření v úhlu  $180^{\circ}$ . V případě měření fluorescence je přímá dráha od kyvety k fotonce zacloněna a odrazem od zrcadel se dostává pouze záření emitované od kyvety v úhlu  $90^{\circ}$  k excitačnímu paprsku. Do dráhy emitovaného paprsku se umísťují filtry dodané výrobcem.

Pro měření absorbance se používá běžný nástavec, jen je třeba nastavit požadovanou vlnovou délku, vložit kyvetu s referenčním vzorkem a na hodnotu absorbance tohoto vzorku přístroj vynulovat. Poté se změří absorbance požadovaného vzorku.

Při měření fluorescence je třeba použít měřicí nástavec FK na SPEKOL 11, nastavit požadovanou vlnovou délku, vložit sekundární filtr do držáku na měřicí násadě a vložit kyvetu s referenčním vzorkem nebo standard fluorescence dodávaný výrobcem. Při relativním měření fluorescence měříme transmitanci vzorků, a proto relativní fluorescenci standardu či referenčního vzorku položíme rovnu 100. Poté se změří relativní fluorescence požadovaného vzorku<sup>[27]</sup>.

Vzhledem k tomu, že přístroj nemá stabilizovaný zdroj světla, je nutné změřit absorbanci či relativní fluorescenci stejného vzorku alespoň třikrát a pro vyhodnocení použít průměrné hodnoty. Mezi jednotlivými měřeními je také vhodné neustále kontrolovat absorbanci referenčního vzorku rovnu 0, případně relativní fluorescenci standardu rovnu 100.

## **1.6 Metody studia vazby ligandů<sup>[28]</sup>**

V současné době se používá velké množství fyzikálně-chemických a biologických metod pro měření a studium vazby ligandů. Každá z těchto technik je založena na některém z následujících postupů: (1) stanovení koncentrace volného, případně vázaného ligandu, (2) detekce změny fyzikálně-chemické nebo biologické vlastnosti navázaného ligandu nebo (3) detekce změny fyzikálně-chemické nebo biologické vlastnosti receptoru.

(1) Nejpoužívanější metodou, která předchází stanovení koncentrace volného ligandu, je rovnovážná dialýza, během níž se měří distribuce ligandu mezi dvě fáze, z nichž pouze jedna obsahuje protein. Obě fáze jsou od sebe odděleny semipermeabilní membránou. Místo membrány je možné použít vzájemně nemísitelné kapaliny, jejichž rozhraní nahradí membránu. Alternativními metodami jsou ultrafiltrace nebo gelová filtrace.

(2) Po navázání ligandu na protein se často změní fyzikálně-chemické vlastnosti ligandu a tato změna se projeví modifikací spekter mnoha typů (změnou frekvence, amplitudy nebo obojího). Pro určení změny vlastností navázaného ligandu lze použít nejen UV/VIS spektroskopii, ale i NMR, IR či fluorescenční měření. Pokud nedojde k výrazné změně spektra vázaného a volného ligandu, nevíme, kolik molekul ligandu se navázalo na protein. Podíl ligandu v navázaném stavu ( $\alpha$ ) lze vypočítat podle následující rovnice:

$$A = \alpha A_b + (1 - \alpha) A_f,$$

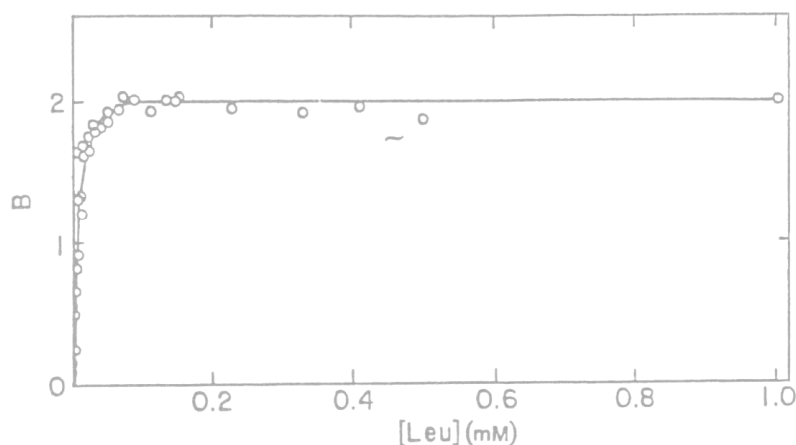
kde  $A$  je absorbance, index  $b$  označuje vázaný ligand a index  $f$  volný ligand. Hodnoty  $A_b$  a  $A_f$  je nutno zjistit experimentálně.

(3) Vazbou ligandu na protein se může změnit celá řada vlastností proteinu. Techniky detekce těchto změn nejsou použitelné obecně, protože jejich použití je závislé na vlastnostech proteinu, ale zároveň díky nim lze získat jiný náhled na komplex ligand-receptor. Díky těmto metodám se lze dozvědět, na které konkrétní místo na proteinu se ligand naváže. Příkladem těchto technik je měření biologické aktivity, osmotického tlaku nebo použití spektroskopie.

## 1.7 Grafické znázornění experimentálních dat

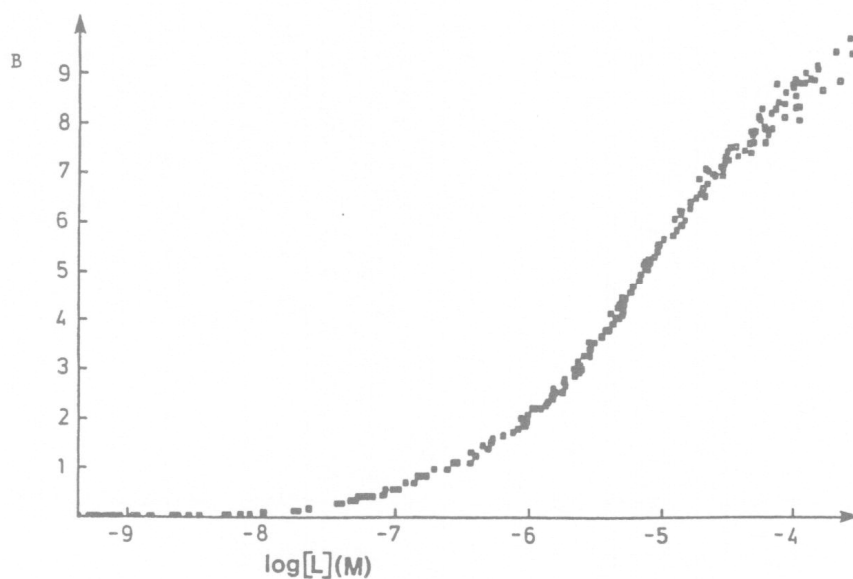
Při zjišťování vazby ligandu na protein potřebujeme znát množství navázaného ligandu (ozn. jako  $B$ ), které je funkcí koncentrace volného ligandu (ozn. jako  $[L]$ ), tj.  $B = g([L])$ . Získaná experimentální data mohou být graficky znázorněna mnoha způsoby, z nichž jsou nejčastější asi tři: (1) přímý lineární výnos, (2) semilogaritmický graf a (3) Scatchardův výnos.

(1) Nejjednodušší grafické znázornění vazby je lineární vynesení  $B$  proti  $[L]$ . Na Obr. 5 je jasně vidět, že při vyšších koncentracích ligandu  $B$  je hodnota  $[L]$  téměř konstantní, z čeho lze usoudit, že protein je saturován ligandem. Nevýhodou tohoto výnosu je, že velké množství experimentálních bodů je namačkáno na sobě v blízkosti osy  $y$  a není dobře rozpoznatelné, kterým hodnotám na ose  $x$  náleží.



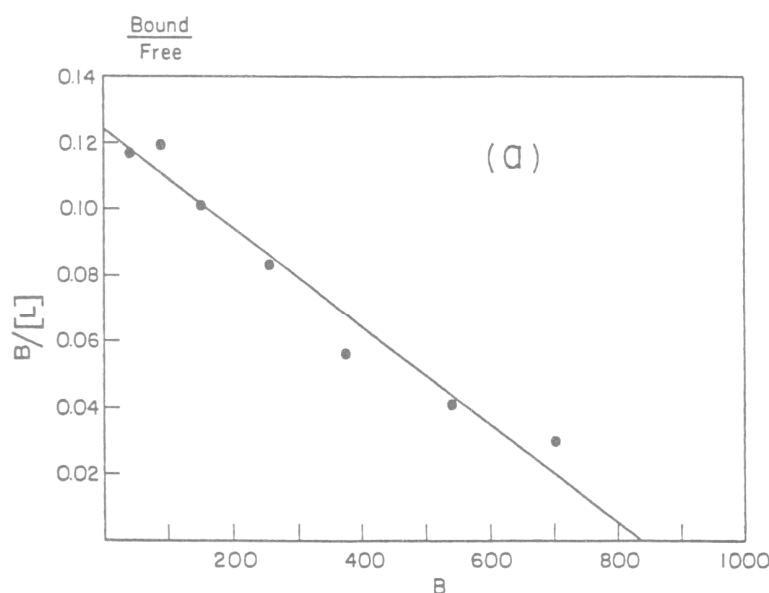
**Obr. 5 – Příklad lineárního vynesení B proti [L]<sup>[28]</sup>; vazba leucinu  $\alpha$ -isopropylmalát synthasou**

(2) Pokud vyneseme B jako funkci  $\log [L]$ , můžeme zjistit počet vazebných míst na receptoru. Z převážné většiny grafů, kde je vynesena B proti  $\log [L]$ , tuto informaci ale získat nelze, neboť křivka nedosáhne hodnoty asymptoty, tj. úrovně saturace. Velkou výhodou tohoto výnosu je, že jsou v grafu jednotlivé body rovnoměrně rozprostřeny, na rozdíl od přímého lineárního výnosu. Analogií tohoto výnosu jsou acidobazické titrační křivky.



**Obr. 6 – Příklad semilogaritmického vynesení B proti  $\log [L]$ <sup>[28]</sup>; vazba iontu kyseliny laurové na HSA**

(3) Zvláštností Scatchardova výnosu je vynesení  $B/[L]$  na svislé ose a  $B$  na vodorovné ose. Jeho výhodou je (pro jednoduchý systém identických vazebných míst) linearita. Průsečík s osou  $y$  udává hodnotu asociační konstanty a průsečík s osou  $x$  limitní hodnotu  $B$ . Tento výnos má ale řadu nedostatků, které mohou vést ke zkreslení výsledků experimentu. Často se prokládají vynesené body přímkou, přestože závěry vyvozené z tohoto lineárního prokládání bývají chybné. Je dobré proto srovnávat informace získané Scatchardovým výnosem ještě se semilogaritmickým vyhodnocením, neboť se tím vyvarujeme zbytečných chyb. Pokud body neleží v přímce, ale tvoří konkávní křivku, může to znamenat následující: (a) molekula receptoru má dvě nebo více vazebných míst s rozdílnou afinitou, která se ale nemění s rostoucím nasycením proteinu ligandem, nebo (b) afinita vazebných míst k ligandu klesá s rostoucím nasycením. Scatchardovým výnosem se tyto informace ale nedají získat<sup>[28]</sup>.



**Obr. 7 – Příklad Scatchardova výnosu<sup>[28]</sup>; vazba diazepamu na benzodiazepinový receptor**

### 1.7.1 Jobův výnos<sup>[29]</sup>

Jobův výnos je používán k určování stechiometrie vazby při vazebné studii. Celková molární koncentrace proteinu a ligandu zůstávají po celou dobu experimentu konstantní, mění se pouze molární zlomky složek směsi. Měřitelná veličina, která je úměrná tvorbě komplexu, je vynesena proti molárnímu zlomku jedné ze složek. Maximum vzniklé křivky koresponduje se stechiometrií vazby.

## 2. Materiál a metody

### 2.1 Použité chemikálie a přístroje

- Lidský albumin (20% roztok), č. výr. 17-1182, Sevac (Ústav sér a očkovacích látek o.p. Praha)
- Citronan sodný p. a., LACHEMA
- Kyselina citronová bezvodá p. a., LACHEMA
- Modř bromfenolová, LACHEMA
- Fluorescein, LACHEMA (zásobní roztok, 0,002%)
- Fyziologický roztok (zásobní roztok, 0,5% NaCl)
- Destilovaná voda
- Dialyzační trubice „Kalle“
- Magnetická míchačka s míchadlem
- pH metr ATI Orion 370
- Spektrofotometr SPEKOL 11 s fluorescenčním nástavcem FK, VEB Carl Zeiss Jena
- Spektrofotometr HP 8453
- Konduktometr Radelkis

### 2.2 Příprava roztoků a vzorků

#### 2.2.1 Zásobní roztok bromfenolové modři (BPB)

a) Navážka BPB (10,28 mg) byla rozpuštěna ve 200  $\mu\text{l}$  NaOH ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a koncentrace upravena 30 ml destilované vody<sup>[30]</sup>. Výsledná koncentrace roztoku byla  $4,56\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Z tohoto zásobního roztoku byly připraveny naředěním v pufrch roztoky BPB o koncentracích  $1,2\cdot 10^{-5}$  a  $4,56\cdot 10^{-5}$  pro optimalizační pokusy vazby BPB na albumin.

b) Dále byl připraven zásobní roztok o koncentraci  $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (9,94 mg BPB bylo rozpuštěno v 200  $\mu\text{l}$  NaOH a doplněno vodou na výsledný objem 30 ml), který byl zředěním na výslednou koncentraci  $5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  použit pro stanovení vazby BPB na albumin pomocí Jobova výnosu.



### 2.2.2 Citrátový pufr

Zásobní roztoky kyseliny citronové a citronanu sodného byly připraveny následovně:

- 5,88 g dihydrátu citronanu bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody (za vzniku roztoku o přibližné koncentraci  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ )
- 3,84 g bezvodé kyseliny citronové bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody (za vzniku roztoku o přibližné koncentraci  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ )<sup>[31]</sup>.

Při přípravě pufrů o požadované hodnotě pH bylo postupováno dle Tabulky 2. Po smísení roztoků bylo pH kontrolováno pH metrem a v případě potřeby upraveno na požadovanou hodnotu přidávkem roztoku kyseliny nebo soli.

Pro přípravu pufru o pH 3,3 byl použit postup jako pro přípravu pufru o pH 3,2, které bylo upraveno použitím roztoku soli.

**Tabulka 2 – Pufr o složení kyselina citronová – citronan sodný**<sup>[31]</sup>

pH	V <sub>kyselina</sub> (cm <sup>3</sup> )	V <sub>sůl</sub> (cm <sup>3</sup> )
3,0	8,20	1,80
3,2	7,75	2,25
3,4	7,30	2,70
3,6	6,85	3,15
3,8	6,35	3,65
4,0	5,90	4,10
4,2	5,40	4,60
4,4	4,95	5,15
4,6	4,45	5,55

Pozn.: V<sub>kyselina</sub> = objem 0,1 M roztoku kyseliny citronové, V<sub>sůl</sub> = objem 0,1 M roztoku citronanu sodného

### 2.2.3 Příprava roztoků pro kalibrační řadu fluoresceinu

Zásobní roztok fluoresceinu měl koncentraci  $2 \cdot 10^{-3}\%$ . Pro dosažení požadované koncentrace jsme jej naředili fyziologickým roztokem nebo vodou.

Koncentrace fluoresceinu po naředění vodou byly následující:  $1500 \cdot 10^{-6}$ ,  $1000 \cdot 10^{-6}$ ,  $500 \cdot 10^{-6}$ ,  $250 \cdot 10^{-6}$ ,  $200 \cdot 10^{-6}$ ,  $150 \cdot 10^{-6}$ ,  $100 \cdot 10^{-6}$ ,  $50 \cdot 10^{-6}$ ,  $40 \cdot 10^{-6}$ ,  $20 \cdot 10^{-6}$ ,  $10 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $4 \cdot 10^{-6}$ ,  $2 \cdot 10^{-6}$  a  $1 \cdot 10^{-6}\%$ .

Koncentrace fluoresceinu po naředění fyziologickým roztokem měly hodnoty:  $500 \cdot 10^{-6}$ ,  $250 \cdot 10^{-6}$ ,  $100 \cdot 10^{-6}$ ,  $50 \cdot 10^{-6}$ ,  $20 \cdot 10^{-6}$ ,  $10 \cdot 10^{-6}$  a  $5 \cdot 10^{-6}$ %.

#### 2.2.4 Příprava roztoků lidského albuminu

Původní 20% roztok lidského albuminu byl naředěn na koncentraci  $8 \cdot 10^{-3}$ % tak, že bylo rozpuštěno 20  $\mu$ l 20% albuminu v 50 ml citrátového pufru o pH 3,0. Do lékovky bylo odebráno 10 ml tohoto roztoku, 5 ml z něj pipetováno do další lékovky a ty rozpuštěny v 5 ml pufru o pH 3. Touto dělicí řadou bylo postupováno až ke koncentraci  $1,5625 \cdot 10^{-5}$ %. V Tabulce 3 jsou uvedeny koncentrace jednotlivých vzorků v % a  $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Tentýž postup byl aplikován při použití citrátových pufrů o pH 3,3 a 3,6. Pufry byly připraveny podle návodu v odst. 3.2.2 (jen byl zvýšen celkový objem z 10 na 50 ml).

Při vytváření nové úlohy pro biochemické praktikum byl roztok HSA připraven následovně: bylo naředěno 0,75 ml 20% HSA 44,25 ml citrátového pufru o pH 3,3. Roztok albuminu měl výslednou koncentraci  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

**Tabulka 3 – Koncentrace lidského albuminu v % a  $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$**

Číslo vzorku	w (%)	c ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )
1	$8 \cdot 10^{-3}$	$1,19 \cdot 10^{-6}$
2	$4 \cdot 10^{-3}$	$5,97 \cdot 10^{-7}$
3	$2 \cdot 10^{-3}$	$2,99 \cdot 10^{-7}$
4	$1 \cdot 10^{-3}$	$1,49 \cdot 10^{-7}$
5	$5 \cdot 10^{-4}$	$7,46 \cdot 10^{-8}$
6	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$3,73 \cdot 10^{-8}$
7	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$1,87 \cdot 10^{-8}$
8	$6,25 \cdot 10^{-5}$	$9,33 \cdot 10^{-9}$
9	$3,125 \cdot 10^{-5}$	$4,66 \cdot 10^{-9}$
10	$1,5625 \cdot 10^{-5}$	$2,33 \cdot 10^{-9}$

#### 2.2.5 Příprava vzorku fluoresceinu pro dialýzu

Bylo smícháno 25 ml 0,002% roztoku fluoresceinu s 25 ml 0,5% roztoku NaCl a nalito do připravené dialyzační trubice.

### 2.2.6 Příprava vzorků BPB v pufrch o různém pH

Citrátové pufrы o pH 3,0 až 4,6 byly připraveny dle Tabulky 2 (tj. od každého 10 ml). Z každého roztoku byly odebrány 2 ml a smíchány se 100  $\mu\text{l}$  BPB o koncentraci  $4,56 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

### 2.2.7 Příprava vzorků lidského albuminu s BPB pro spektrofotometrické stanovení vazby barviva na protein

Lidský albumin byl naředěn na výsledné koncentrace podle odst. 2.2.4. Do každého vzorku bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  roztoku BPB, v případě pufru o pH 3,0 měl roztok přidané BPB koncentraci  $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , v pufrch o pH 3,3 a 3,6 byla koncentrace BPB  $4,56 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Pro vyhodnocení pomocí Jobova výnosu jsme připravili vzorky bromfenolové modři a albuminu o shodné koncentraci  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , zásobní roztoky HSA a BPB jsme ředili pufrem o pH 3,3. Připravili jsme jedenáct vzorků o složení viz. Tabulka 4.

**Tabulka 4 – Složení roztoků pro Jobův výnos**

Číslo vzorku	$V_{\text{HSA}}$ (ml) ( $c=5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	$V_{\text{BPB}}$ (ml) ( $c=5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
1	0	5,0
2	0,5	4,5
3	1,0	4,0
4	1,5	3,5
5	2,0	3,0
6	2,5	2,5
7	3,0	2,0
8	3,5	1,5
9	4,0	1,0
10	4,5	0,5
11	5,0	0

### **2.3 Studium kinetiky dialýzy fluoresceinu**

Bylo postupováno přesně podle návodu na úlohu „Studium kinetiky dialýzy“ pro Pokročilé praktikum z biochemie I. Na přístroj SPEKOL 11 byl přidán fluorescenční nástavec FK a byly použity kyvety pro fluorescenční měření. Excitační vlnová délka byla nastavena na přístroji stejným způsobem jako při měření absorbancí, emisní vlnová délka byla vyfiltrována pomocí tyrkysového filtru. Jako standard byl použit skleněný hranol o konstantní fluorescenci dodávaný výrobcem. Hodnota jeho relativní fluorescence byla nastavena na přístroji jako 100% (byla měřena jako transmitance).

Při používání nástavce FK je nutné dávat pozor, aby kyveta se vzorkem nezapadla při měření příliš zprudka a nedošlo k případnému vyliší měřeného roztoku.

Dialýza byla provedena následujícím způsobem: do dialyzační trubice bylo nalito 25 ml 0,002% fluoresceinu a 25 ml 0,5% roztoku NaCl. Trubice byla ponořena do 500 ml destilované vody a po celou dobu bylo dialyzátem mícháno. Pomocí sondy konduktometru byla měřena konduktivita dialyzátu a po 18 minutách od začátku dialýzy také relativní fluorescence a absorbance dialyzátu.

Byla měřena relativní fluorescence a absorbance roztoků fluoresceinu pro kalibrační závislost o koncentracích uvedených v odst. 2.2.3.

### **2.4 Měření absorpčních spekter (spektrofotometr HP)**

Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Bylo nastaveno rozmezí vlnových délek od 350 do 650 nm v případě kalibračních roztoků BPB od 350 do 700 nm v případě vazby BPB na albumin. Absorbanci přístroj změřil vždy po změně vlnové délky o 1 nm. Pro měření byly odebrány do kyvety cca. 2 ml vzorku.

Při měření vzorků pro Jobův výnos bylo použito stejné nastavení přístroje, ale jiné vzorky (viz. odst. 2.2.7).

## 3. Výsledky a diskuse

### 3.1 *Dialýza fluoresceinu a NaCl*

V první části experimentální práce jsme se zaměřili na možnost rozšířit stávající úlohu z Pokročilého praktika z biochemie I. Úloha nese název „Studium kinetiky dialýzy“ a provádí se ve dvou modifikacích: 1. konduktometrické sledování průběhu dialýzy fyziologického roztoku a 2. fluorimetrické studium dialýzy roztoku fluoresceinu. Chtěli jsme rozšířit úlohu 2. tak, aby umožňovala studium vazby barviva (v našem případě fluoresceinu) na albumin. K tomu by bylo zapotřebí provést dialýzu pro několik roztoků s odlišnou koncentrací proteinu, nutnou podmínkou také je, aby dialýza probíhala prakticky do dosažení rovnováhy.

Proto jsme se zaměřili na zjišťování, (1) nakolik je postup měření fluorescence na přístroji SPEKOL s nástavcem FK přesný a reprodukovatelný (tj. zda by bylo možné takto získaných dat využít pro porovnání dialýzy při různých koncentracích proteinu) a (2) zda se při provedení dialýzy fluoresceinu postupem používaným v praktiku soustava dostatečně přiblíží k rovnováze.

#### 3.1.1 Měření kalibrační křivky fluorescence fluoresceinu

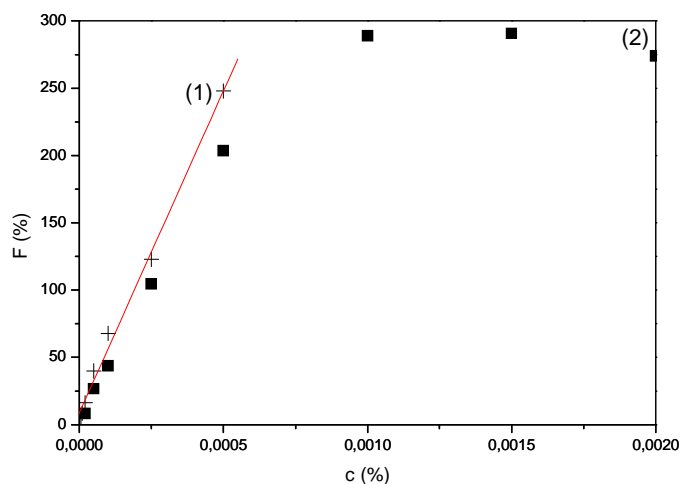
Kalibrační křivku relativní fluorescence fluoresceinu v závislosti na koncentraci jsme měřili opakovaně pro různé koncentrace fluoresceinu. Tato křivka by měla vykazovat lineární závislost, aby se z ní daly co nejsnadněji odečíst hodnoty, a zároveň by měla být vytvořena pro nižší hodnoty fluorescence fluoresceinu vzhledem k nízkým hodnotám fluorescence dialyzátu vzniklého dialýzou.

Na Obr. 8 jsou vynesena dvě měření, první (1) pro koncentrace fluoresceinu  $5 \cdot 10^{-6}$  až  $5 \cdot 10^{-4}$  % (ředěno vodou), druhá (2) pro koncentrace  $2 \cdot 10^{-5}$  až  $2 \cdot 10^{-3}$  % (ředěno fyziologickým roztokem).

Křivka označená jako (1) se jeví lineární (je proložena pro ilustraci přímkou). Avšak při stejných hodnotách koncentrace vzorků pro křivky (1) a (2) nejsou stejné hodnoty relativní fluorescence. Nepatrný vliv může mít to, že vzorky pro měření křivky (1) byly rozpuštěny ve zředěném fyziologickém roztoku a pro křivku (2) ve vodě. Výraznější roli ale budou hrát podmínky, za jakých byly hodnoty měřeny – při měření křivky (1) v laboratoři nebyla zapnuta většina přístrojů, tudíž nedocházelo k tak výraznému kolísání

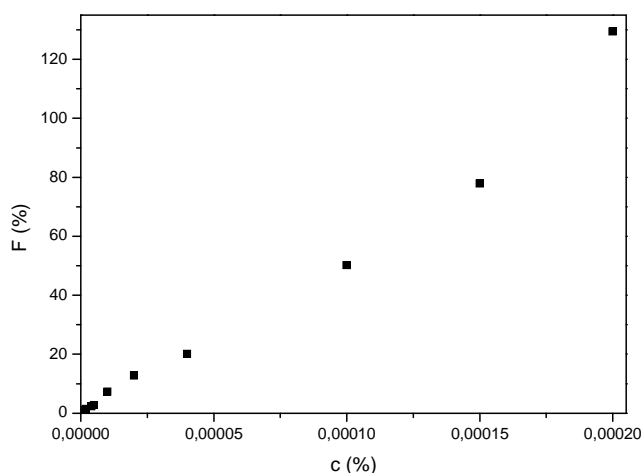
napětí v síti jako při měření křivky (2), které bylo prováděno v době, kdy probíhala praktická cvičení pro KATA. I přes lineární závislost je tato křivka pro kalibraci dialyzátu jen stěží použitelná, protože koncentrace vzorků jsou mnohem vyšší, než jakých lze dosáhnout při dialýze.

Hodnoty koncentrací pro křivku (2) jsou poměrně vysoké, tato křivka nejprve téměř lineárně vzrůstá a při vyšších koncentracích klesá. Můžeme tedy předpokládat, že u takto koncentrovaných roztoků dochází k jevu tzv. samozhášení fluorescence. Koncentrace vzorků jsou opět mnohem vyšší, než jakých lze dosáhnout při dialýze. Navíc nevíme, nakolik je měření přesné, když relativní fluorescence dosahuje hodnot až kolem 300%, a nakolik je lineární odezva přístroje.



**Obr. 8 – Závislost relativní fluorescence na koncentraci fluoresceinu;**  
 (1) koncentrace fluoresceinu  $5 \cdot 10^{-6}$  až  $5 \cdot 10^{-4}$  %, ředěno roztokem NaCl;  
 (2) koncentrace fluoresceinu  $2 \cdot 10^{-5}$  až  $2 \cdot 10^{-3}$  %, ředěno vodou

Výsledky dalšího měření relativní fluorescence pro nižší koncentrace fluoresceinu ( $1 \cdot 10^{-6}$  až  $2 \cdot 10^{-4}$  %, ředěno vodou) jsou uvedeny na Obr. 9. Na kalibrační křivce jsou patrné výrazné odchylky od linearity, zejména pro vyšší koncentrace fluoresceinu.

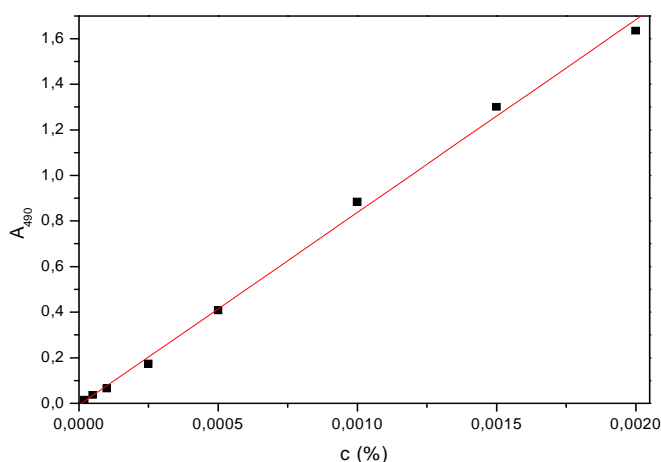


**Obr. 9 – Závislost relativní fluorescence na koncentraci fluoresceinu;** koncentrace fluoresceinu  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $2 \cdot 10^{-4}$ %, ředěno vodou

### 3.1.2 Měření kalibrační křivky absorbance fluoresceinu

Toto měření jsme nejprve provedli pro vzorky o nízkých koncentracích  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $2 \cdot 10^{-4}$ %. Většina absorbancí těchto vzorků ale měla zápornou hodnotu. Důvodem mohla být skutečnost, že kyvety pro fluorescenční měření používané v praxi obsahují nečistoty, které fluoreskují a nedají se odstranit (destilovaná voda v kyvetě měla relativní fluorescenci 0,7%). Vzhledem k záporným hodnotám absorbancí se jeví měření absorbance pro takto nízké koncentrace fluoresceinu značně nepřesné a dále jsme se jím nezabývali.

Sestrojili jsme ještě jednu kalibrační křivku závislosti absorbance vzorků fluoresceinu na jejich koncentraci, tentokrát pro vyšší hodnoty koncentrací  $2 \cdot 10^{-5}$  až  $2 \cdot 10^{-3}$  % (viz. Obr. 10). Tato závislost je sice lineární, ale koncentrace těchto vzorků jsou mnohem vyšší, než jakých se dá při dialýze dosáhnout. Pro naše měření se také nedá použít.



**Obr. 10 – Závislost absorbance fluoresceinu na koncentraci fluoresceinu;**  
koncentrace fluoresceinu  $2 \cdot 10^{-5}$  až  $2 \cdot 10^{-3}$  %, ředěno vodou

### 3.1.3 Měření absorbance a fluorescence odebíraného dialyzátu v čase

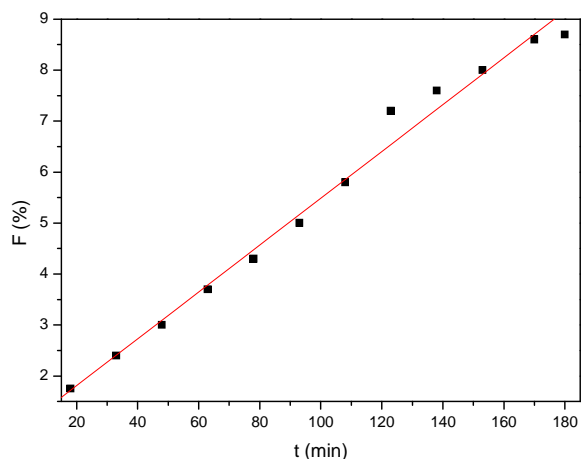
Hodnoty relativní fluorescence dialyzátu v průběhu dialýzy v závislosti na čase jsou znázorněny na Obr. 11. Získaná křivka je téměř lineární a za dobu, za kterou byla dialýza prováděna, hodnoty relativní fluorescence stále rostou. Dá se tedy předpokládat, že rovnovážné rozdělení koncentrace fluoresceinu ( $M_r = 332$ ) mezi dialyzátem a retenátem nastane mnohem později.

Absorbance odebíraného dialyzátu (viz. Tabulka 6) jsou velmi nízké a SPEKOL se ukázal jako příliš málo přesný přístroj, aby dokázal přesně změřit malé rozdíly mezi absorbancemi takto málo koncentrovaných roztoků fluoresceinu.

**Tabulka 6 – Hodnoty absorbance dialyzátu v čase**

t (min)	A	t (min)	A
18	0,002	108	0,009
33	0,002	123	0,009
48	0,006	138	0,010
63	0,004	153	0,014
78	0,008	170	0,014
93	0,007	180	0,014

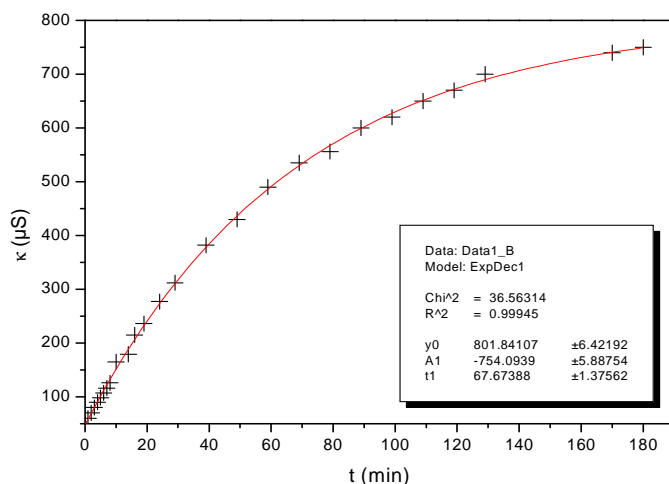




**Obr. 11 – Závislost relativní fluorescence odebíraného dialyzátu na čase; dialýza směsi fluorescein-fyziologický roztok v poměru 1:1**

### 3.1.4 Konduktometrické stanovení kinetiky dialýzy

Toto měření jsme prováděli z důvodu kontroly průběhu dialýzy. Pomocí naměřených hodnot jsme sestrojili graf závislosti konduktivity dialyzátu na čase (viz. Obr. 12). Podle grafu je zřejmé, že dialýza na počátku probíhala rychleji než na konci měření, neboť křivka ke konci měření tak výrazně jako na jeho začátku. Z toho lze soudit, že pokud jde o nízkomolekulární sloučeninu, jako je NaCl, dospěla soustava po třech hodinách již téměř k rovnováze.



**Obr. 12 – Závislost konduktivity odebíraného dialyzátu na čase; dialýza fyziologického roztoku ve směsi s fluoresceinem v poměru 1:1**

### 3.1.5 Dialýza fluoresceinu a NaCl - shrnutí

Konduktometrickým stanovením kinetiky dialýzy fyziologického roztoku jsme zjistili, že soustava během tří hodin dospěla téměř do rovnováhy. Při fluorimetrickém vyhodnocení dialýzy fluoresceinu jsme ale zjistili, že po třech hodinách ještě k rovnováze fluoresceinu nedošlo a nedalo se odhadnout, kdy se tak stane. Vzhledem k omezené době trvání praktika ale nelze výrazněji prodloužit dobu měření. Kromě toho je fluorimetrické měření málo přesné a výsledky získané na SPEKOLu by nebylo možné použít pro analýzu vazebných křivek. Spektrofotometrické vyhodnocení je vzhledem k velmi nízkým koncentracím fluoresceinu v dialyzátu velmi nepřesné, hodnoty absorbancí jsou příliš nízké a citlivost přístroje v tomto případě nedostatečná. Pro účely praktika tedy nelze tuto úlohu adaptovat.

## 3.2 Vazba bromfenolové modři na albumin

Alternativní možností bylo postavit zcela nově úlohu zaměřenou na studium vazby barviva na protein. Bylo třeba vybrat barvivo, které po navázání na protein mění barvu, aby bylo možné experimenty vyhodnotit spektrofotometricky. Pro tento experiment jsme využili informace z literatury (viz. <sup>[15]</sup>), kde je popisována vazba BPB na albumin a s ní související spektra.

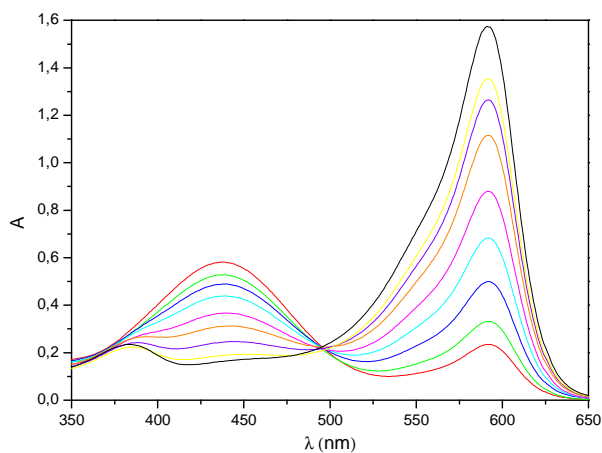
V dalších experimentech jsme zkoumali vazbu BPB na albumin a výsledky vyhodnotili graficky pomocí Jobova výnosu. Vzorky jsme měřili na spektrofotometru HP a pak také na SPEKOLu.

### 3.2.1 Porovnání polohy isosbestického bodu BPB v roztocích o různém pH a ve směsi s albuminem

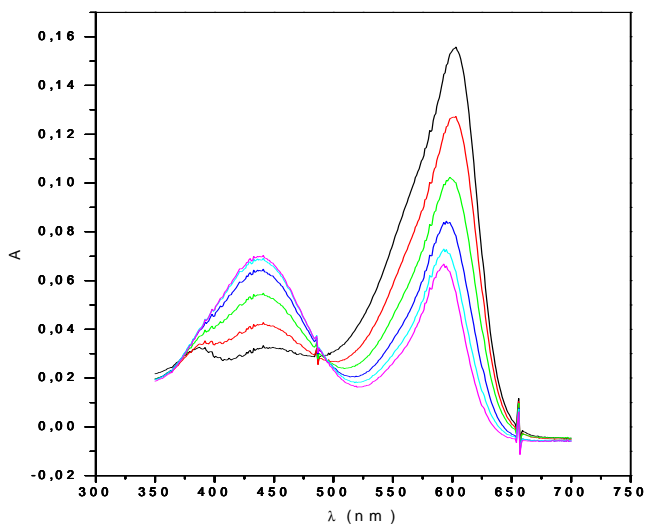
Absorpční křivky pro roztok BPB v oblasti pH 3,0 – 4,6 jsou vyneseny na Obr. 13. Jak je patrné, se zvyšujícím se pH klesá hodnota absorbance v krátkovlnné části spektra (absorpční maximum zde mění tvar i efektivní hodnotu a při pH 4,6 téměř zaniká). Naproti tomu absorpční maximum v dlouhovlnné oblasti se pouze mírně posunuje k delší vlnové délce (z 592 na 594 nm), ale výrazně se zvyšuje jeho intenzita. Systém vykazuje isosbestický bod při 499 nm, jeho přítomnost ukazuje na fakt, že měření reálně odrazí přechod mezi kyselou a bazickou formou BPB a není ovlivněno dalšími faktory.

Obdobně vypadají absorpční křivky BPB také po navázání tohoto barviva na albumin (Obr. 14), pouze se poněkud mění polohy absorpčních maxim. Zvyšování koncentrace

albuminu vede k podobným změnám ve spektrech jako zvyšování pH (Obr. 13). Tento jev je základem tzv. proteinové chyby BPB (jako acidobazického indikátoru) a využití BPB pro stanovení proteinů v moči.



**Obr. 13 – Závislost absorbance na vlnové délce roztoků BPB o různém pH;** koncentrace BPB konstantní ( $c = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ), pH 3,0; 3,2; 3,4; 3,6; 3,8; 4,0; 4,2; 4,4 a 4,6 (pořadí podle stoupající absorbance při  $\lambda=592 \text{ nm}$ )



**Obr. 14 – Směs HSA a bromfenolové modři v pufru o pH 3,3;** koncentrace BPB konstantní ( $c = 4,56 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ), koncentrace HSA  $1,19 \cdot 10^{-6}$ ,  $5,97 \cdot 10^{-7}$ ,  $2,99 \cdot 10^{-7}$ ,  $1,49 \cdot 10^{-7}$ ,  $7,46 \cdot 10^{-8}$  a  $3,73 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$  (pořadí podle klesající absorbance při  $\lambda=603 \text{ nm}$ )

### 3.2.2 Porovnání spekter BPB navázané na albumin v pufrch o různém pH

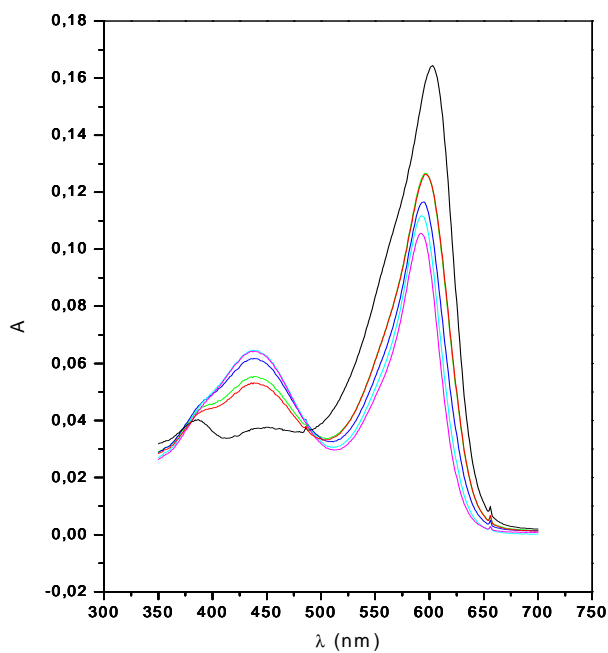
Abychom mohli provést vazbu BPB na albumin v praktiku, museli jsme optimalizovat podmínky pokusu. Nejprve jsme vycházeli z informací z literatury, kde byla použita BPB o koncentraci  $c = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  a pufr o pH 3,3.

Pro naše měření jsme zvolili pufrы o pH 3,3, 3,0 a 3,6. Na experimenty v roztocích o pH 3,0 jsme použili BPB o koncentraci  $c = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , pro roztoky o pH 3,3 a 3,6 jsme koncentraci BPB zvýšili na  $c = 4,56 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , protože při nižších hodnotách koncentrace BPB nebyly absorpční křivky tak dobře rozlišené.

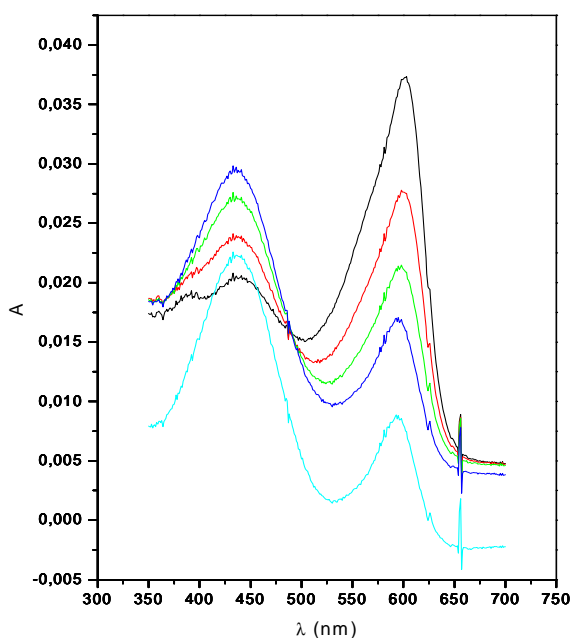
Také koncentrace albuminu v jednotlivých roztocích se lišily. V roztoku o pH 3,0 byly koncentrace albuminu  $2,99 \cdot 10^{-7}$  až  $1,87 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ , v roztocích o pH 3,3 a 3,6 jsme koncentraci HSA zvýšili, a to na  $1,19 \cdot 10^{-6}$  až  $3,73 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ . Zvýšení koncentrací HSA jsme provedli, neboť jsme se chtěli vyhnout situaci patrné na Obr. 15 – absorpční křivka odpovídající koncentraci albuminu  $1,87 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$  se již neprotíná v isosbestickém bodě a je proti ostatním posunutá směrem dolů, jako by v roztoku žádný albumin přítomen nebyl.

Při vyšších koncentracích albuminu a BPB dosahují absorpční maxima křivek vyšších hodnot absorbancí (Obr. 14 a 16), což je výhodnější pro měření na SPEKOLu v praktiku. Při pH roztoku 3,0 a 3,3 jsou absorpční maxima křivek v dlouhovlnné oblasti odpovídající jednotlivým koncentracím albuminu dále od sebe a lépe rozlišené. Při pH 3,6 jsou kromě píku odpovídajícímu koncentraci  $1,19 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  všechny píky příliš blízko sebe.

Z toho vyplývá, že nejlepší pro tento experiment je použití pufru o pH 3,0 až 3,3 a koncentrací albuminu v řádech  $10^{-7}$  až  $10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$  a koncentraci bromfenolové modři kolem  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ .



**Obr. 15 – Směs HSA a bromfenolové modři v pufru o pH 3,6;** koncentrace BPB konstantní ( $c = 4,56 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ), koncentrace HSA  $1,19 \cdot 10^{-6}$ ,  $5,97 \cdot 10^{-7}$ ,  $2,99 \cdot 10^{-7}$ ,  $1,49 \cdot 10^{-7}$ ,  $7,46 \cdot 10^{-8}$  a  $3,73 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$  (pořadí podle klesající absorbance při  $\lambda=603 \text{ nm}$ )



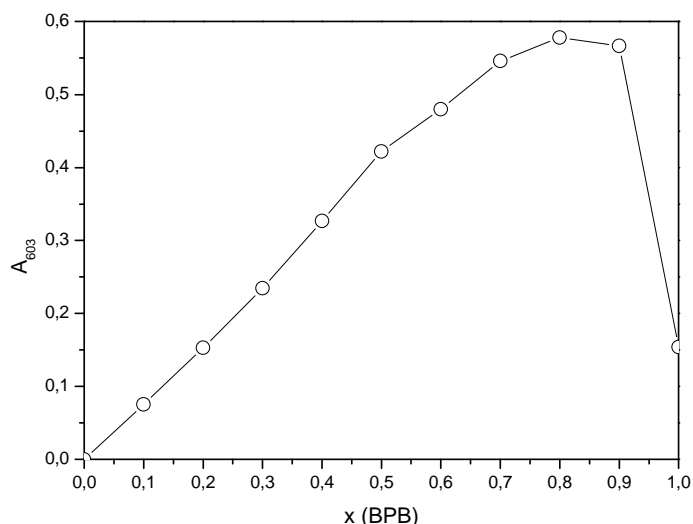
**Obr. 16 – Směs HSA a bromfenolové modři v pufru o pH 3,0;** koncentrace BPB konstantní ( $c = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ), koncentrace HSA  $2,99 \cdot 10^{-7}$ ,  $1,49 \cdot 10^{-7}$ ,  $7,46 \cdot 10^{-8}$ ,  $3,73 \cdot 10^{-8}$  a  $1,87 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$  (pořadí podle klesající absorbance při  $\lambda=603 \text{ nm}$ )

### 3.2.3 Vyhodnocení vazby BPB na albumin pomocí Jobova výnosu

Jobův výnos se používá při zjišťování poměru, v němž se dvě látky na sebe vážou. Směs látek A a B jako celek má stále stejnou celkovou koncentraci ( $A + B$ ), přičemž se mění molární poměr obou složek. Při spektrofotometrickém vyhodnocení je na ose y vynesena absorbance (či její změna) a na ose x molární zlomek jedné ze složek.

Vyhodnocení jsme prováděli pro směs BPB a lidského albuminu o koncentraci  $c(\text{BPB}) = c(\text{HSA}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  v pufru o pH 3,3. Nejprve jsme měřili jednotlivé vzorky na spektrofotometru HP a pro vyhodnocení jsme vybrali hodnoty absorbancí při vlnové délce 603 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu (viz. Obr. 17).

Při pH roztoku 3,3 je vidět, že maximum Jobovy křivky odpovídá poměru albumin:BPB 1:4. Pro srovnání při pH 8,0 má tento poměr hodnotu 1:2<sup>[18]</sup>. Z toho plyne, že v přítomnosti BPB v aniontové formě (v kyselém pH) je navázáno na albumin v průměru více molekul BPB než v bazickém pH.



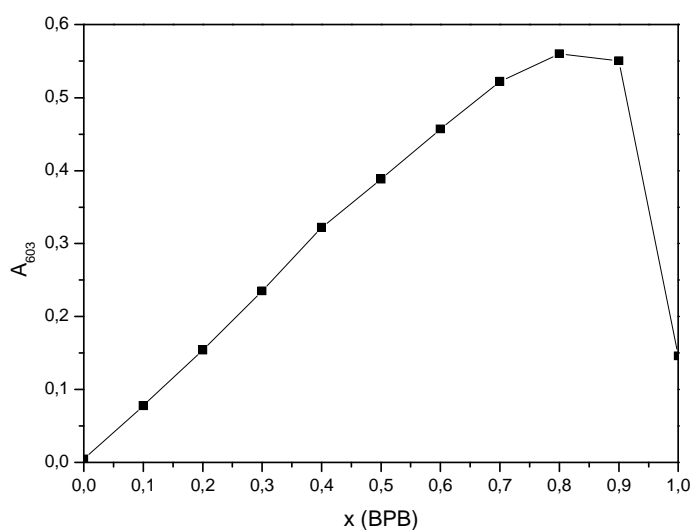
**Obr. 17 – Závislost absorpčního maxima směsi BPB a HSA na molárním zlomku BPB;  $c(\text{BPB}) = c(\text{HSA}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $\lambda = 603 \text{ nm}$ , HP, body pro ilustraci proložené křivkou**

### 3.2.4 Ověření postupu vyhodnocení vazby BPB na albumin pomocí Jobova výnosu pro biochemické praktikum

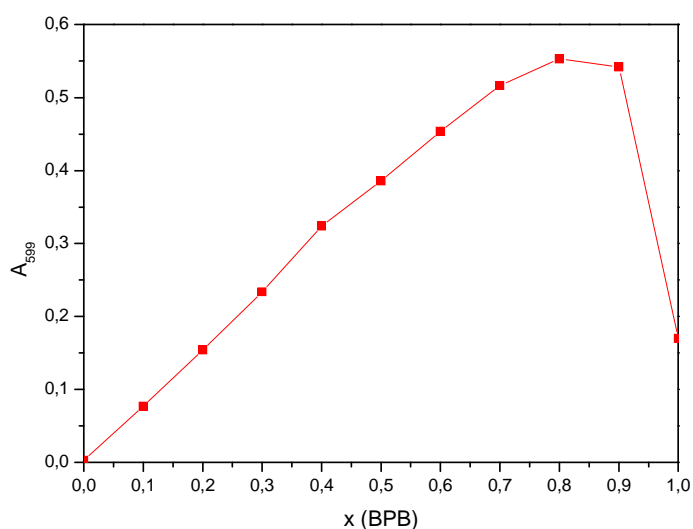
Jak již bylo uvedeno, pro vyhodnocení měření na spektrofotometru HP jsme vybrali vlnovou délku 603 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu. Toto maximum je ale poměrně ostré. Protože na přístroji SPEKOL nelze nastavit vlnovou délku s takovou přesností a nastavení se může lišit mezi jednotlivými přístroji, provedli jsme několik

měření při odlišných hodnotách vlnové délky, abychom ověřili, zda je měření v tomto rozsahu vlnových délek dostatečně „robustní“.

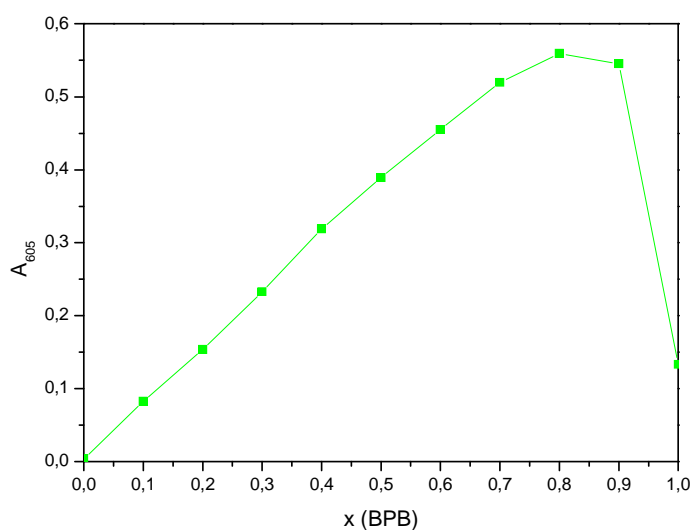
Měření na SPEKOLu jsme provedli pro vlnové délky 599, 603 a 605 nm. Při porovnání obrázků 18, 19 a 20 zjistíme, že se mezi sebou výrazněji neliší i přesto, že jsme měřili absorbance vzorků pokaždé při jiné vlnové délce. Je tedy vhodné nastavit na přístroji vlnovou délku kolem 600 nm, abychom získali podobné výsledky jako na spektrofotometru HP. (Pozn.: Body na obrázcích 18, 19 a 20 jsou proloženy křivkou jen pro ilustraci, nejedná se o experimentální křivku.)



**Obr. 18 – Závislost absorpčního maxima směsi BPB a HSA na molárním zlomku BPB;  $c(\text{BPB}) = c(\text{HSA}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $\lambda = 603 \text{ nm}$ , SPEKOL, body pro ilustraci proložené křivkou**



**Obr. 19 – Závislost absorpčního maxima směsi BPB a HSA na molárním zlomku BPB;  $c(\text{BPB}) = c(\text{HSA}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $\lambda = 599 \text{ nm}$ , SPEKOL, body pro ilustraci proložené křivkou**



**Obr. 20 – Závislost absorpčního maxima směsi BPB a HSA na molárním zlomku BPB;  $c(\text{BPB}) = c(\text{HSA}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $\lambda = 605 \text{ nm}$ , SPEKOL, body pro ilustraci proložené křivkou**

### 3.2.5 Vazba bromfenolové modři na albumin – shrnutí

Podarilo se nám nalézt nejvhodnější koncentrace albuminu a bromfenolové modři a nejvhodnější pH pufru pro spektrofotometrické stanovení vazby BPB na albumin a vyhodnocení pomocí Jobova výnosu. Po proměření vzorků na SPEKOLu se také ukázalo,



že přístroj dokáže měřit s dostatečnou přesností. Tento pokus se jeví jako vhodný pro provedení v rámci Pokročilého praktika z biochemie I.

#### 4. Závěr

Stávající úloha z Pokročilého praktika z biochemie se ukázala jako nevhodná pro rozšíření o vazbu fluoresceinu na albumin, neboť není dostatečně citlivá a měření na SPEKOLu není tak přesné, jak by bylo potřeba. Přesnost přístroje je při měření fluorescence příliš závislá na kolísání napětí v síti a pro měření absorbancí je zase zapotřebí poměrně vysoké koncentrace vzorku.

Vazba BPB na albumin a její vyhodnocení pomocí Jobova výnosu se naopak jeví jako vhodné pro praktikum, protože koncentrace vzorků jsou dostatečné pro citlivost přístroje a u měření absorbancí nedochází k tolika výkyvům kvůli kolísání napětí v síti. I přesto je vhodné vzorek proměřit třikrát a z těchto tří hodnot vypočítat průměr.

Teoreticky by také bylo možné realizovat v praktiku také experiment, díky němuž by bylo možné ukázat rozdíly v poloze isosbestického bodu a absorpčního maxima BPB před a po navázání albumin, ale ne na spektrofotometru SPEKOL. Spektrofotometr SPECORD by se dal při této příležitosti využít lépe, protože je schopen proměřit absorbance při více vlnových délkách najednou.

Příloha bakalářské práce obsahuje návod na novou úlohu pro Pokročilé praktikum z biochemie I „Vazba bromfenolové modři na sérový albumin“.

## 5. Seznam citací a internetových zdrojů obrázků

- [1] Peters, T., jr.: All about albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications, American Elsevier, New York (1995)
- [2] Peters, T., jr.: Serum albumin: Recent Progress in the Understanding of Its Structure and Biosynthesis, *Clin. Chem.* 23, 5 – 12 (1977)
- [3] Curry, S., Brick, P., Franks, N. P.: Fatty acid binding to human serum albumin: New insights from crystallographic studies, *Biochim. Biophys. Acta* 1441, 131 – 140 (1999)
- [4] Behrens, P. Q., Spiekerman, A. M., Brown, J. R.: Structure of human serum albumin, *Fed. Proc.* 34, 591 (1975) – citováno dle [3]
- [5] Brown, J. R.: Structure of bovine serum albumin, *Fed. Proc.* 34, 591 (1975) – citováno dle [3]
- [6] Meloun, B., Morávek, L., Kostka, V.: Complete amino acid sequence of human serum albumin, *FEBS Lett.* 58, 134 – 137 (1975)
- [7] Carter, D. C., He, X-M., Munson, S. H., Twigg, P. D., Gernert, K. M., Broom, M. B., Miller, T. Y.: Three-dimensional structure of human serum albumin, *Science* 244, 1195 – 1198 (1989)
- [8] Quagraine, E. K., Kraatz, H.-B., Rcid, R. S.: Peptides mimicking the N-terminal Cu(II)-binding site of bovine serum albumin: synthesis, characterization and coordination with Cu(II) ions, *J. Inorg. Biochem.* 85, 23 – 32 (2001)
- [9] 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)
- [10] Shen, X-C., Liang, H., Guo, J-H., Song, C., He, X-W., Yuan, Y-Z.: Studies on the interaction between  $\text{Ag}^+$  and human serum albumin, *J. Inorg. Biochem.* 95, 124 – 130 (2003)
- [11] Liang, H., Huang, J., Tu, C-Q., Zhang, M., Zhou, Y-Q., Shen, P-W.: The subsequent effect of interaction between  $\text{Co}^{2+}$  and human serum albumin or bovine serum albumin, *J. Inorg. Biochem.* 85, 167 – 171 (2001)
- [12] Ohyoshi, E., Kohata, S.: The binding of Yb(III) and Gd(III) to bovine serum albumin by a competitive spectrophotometry, *J. Inorg. Biochem.* 52, 157 – 163 (1993)
- [13] Trynda, L., Kuduk-Jaworska, J.: Impact of  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  on the structure of human serum albumin and its binding ability of heme and bilirubin, *J. Inorg. Biochem.* 53, 249 – 261 (1994)
- [14] Marshall, T., Williams, K. M.: Total protein determination in urine: Elimination of a differential response between the coomassie blue and pyrogallol red protein dye-binding assay, *Clin. Chem.* 46, 392 – 398 (2000)

- [15] Wei, Y.-J., Li, K.-A., Tong, S.-Y.: The interaction of Bromphenol Blue with proteins in acidic solution, *Talanta* **43**, 1 – 10 (1996)
- [16] <http://canov.jergym.cz/indikato/priklady/acidobaz.html>, 3. 5. 2010, 21:39 hod
- [17] Kreft, S., Kreft, M.: Physicochemical and physiological basis of dichromatic colour, *Naturwissenschaften* **94**, 935 – 939 (2007)
- [18] 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)
- [19] Cao, W. G., Jiao, Q. C., Fu, Y., Chen, L., Liu, Q.: Mechanism of the interaction between bromphenol blue and bovine serum albumin, *Spectrosc. Lett.* **36**, 197 – 209 (2003)
- [20] Schosinsky, K. H., Vargas, M., Esquivel, A. L., Chavarria, M. A.: Simple spectrophotometric determination of urinary albumin by dye-binding with use of bromphenol blue, *Clin. Chem.* **33**, 223 – 226 (1987)
- [21] Lepper, E. H., Martin, C. J.: The protein error in estimating pH with neutral red and phenol red, *Biochem. J.* **21**, 356 – 361 (1927)
- [22] Klotz, I. M.: The effects of salts and proteins on the spectra of some dyes and indicators, *Chem. Rev.* **41**, 373-399 (1947)
- [23] de Meijere, A.: Adolf von Baeyer: Winner of the Nobel Prize for chemistry 1905, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 7836 – 7840 (2005)
- [24] Käss, W.: Tracing technique in geohydrology, A. A. Balkema, Rotterdam (1998)
- [25] Alford, R., Simpson, H. M., Duberman, J., Hill, G. C., Ogawa, M., Regino, C., Kobayashi, H., Choyke, P. L.: Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging: Literature review, *Mol. Imaging* **8**, 341 – 354 (2009)
- [26] [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5a/ZnCl2\\_fluorescein.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5a/ZnCl2_fluorescein.png), 25. 8. 2010, 10:00 hod.
- [27] Zeiss Spekol 11 – Gebrauchsanleitung
- [28] Creighton, T. E.: Protein function, a practical approach, (Klotz, I. M.), IRL Press at Oxford University Press, 25 - 54 (1989)
- [29] Hill, Z. D., MacCarthy, P.: Novel approach to Job's method, *J. Chem. Educ.* **63**, 162 – 167 (1986)
- [30] Kolektiv autorů: Handbook of Chemistry and Physics, CRC Publishing, Cleveland (1955)
- [31] Ferenčík, M., Škárka B., a kol: Biochemické laboratórné metódy, (Čársky, J.), ALFA Bratislava, 39-86 (1981)



## **Příloha 1 – Návod úlohy pro Pokročilé praktikum z biochemie I**

### Vazba bromfenolové modři na sérový albumin

#### **Princip úlohy**

Albumin má unikátní vlastnost vázat menší molekuly mnoha typů. Díky struktuře, která je tvořena třemi doménami, poskytuje množství míst, kam mohou se ligandy vázat. Interaguje s velmi širokým spektrem látek: nejsilněji se vážou hydrofobní organické anionty střední velikosti, 100 až 600 Da dlouhé řetězce mastných kyselin, hematin a bilirubin. Menší a méně hydrofobní látky, jako je tryptofan a kyselina askorbová, jsou vázány méně silně, avšak jejich vazba může být vysoce specifická.

Bromfenolová modř (BPB) se používá jako acidobazický indikátor a barvivo při provádění gelových elektroforéz. Chemickou povahou je BPB slabá kyselina ( $pK_A = 3,85$ ). Při acidobazických titracích mění barvu v úzkém rozmezí pH: 3 (žlutá barva) až 4,6 (fialová barva).

Po navázání barviv na některé proteiny můžeme pozorovat zajímavý jev, zvaný proteinová chyba indikátoru. Tento jev může značně zkomplikovat situaci, když se má stanovit hodnota pH kolorimetricky. Např. roztok neutrální červeně má bez přidání globulinu pH 6,6. Po přidání pětiprocentního globulinu se ale jeho pH jeví jako 6,0. Ne všechny proteiny ale způsobí stejně velkou proteinovou chybu indikátoru. Příkladem takového proteinu je čistý vaječný albumin, u kterého se až do jeho 7% koncentrace ve směsi s neutrální či fenolovou červení proteinová chyba neprojevuje.

Při zjišťování vazby ligandu na protein potřebujeme znát množství navázaného ligandu (ozn. jako B), které je funkcí koncentrace volného ligandu (ozn. jako [L]), tj.  $B = g([L])$ . Získaná experimentální data mohou být graficky znázorněna mnoha způsoby, z nichž jsou nejčastější asi tři: (1) přímý lineární výnos, (2) semilogaritmický graf a (3) Scatchardův výnos. Jednou z dalších možností, jak graficky znázornit experimentální data, je Jobův výnos.

Jobův výnos je používán k určování stechiometrie vazby při vazebné studii. Celková molární koncentrace proteinu a ligandu zůstávají po celou dobu experimentu konstantní, mění se pouze molární zlomky složek směsi. Měřitelná veličina, která je úměrná tvorbě komplexu, je vynesena proti molárnímu zlomku jedné ze složek. Maximum vzniklé křivky koresponduje se stechiometrií vazby.

#### **Pomůcky a chemikálie**

- Bromfenolová modř ( $M_r = 667$ ), hovězí ( $M_r = 66\ 000$ ) nebo lidský ( $M_r = 67\ 000$ ) sérový albumin, kyselina citronová a citronan sodný pro přípravu pufru, destilovaná voda,  $0,5\ \text{mol.l}^{-1}$  roztok NaOH
- Kádinky pro přípravu zásobních roztoků, odměrné válce, lékovky, automatické pipety, skleněné květy
- Spektrokolorimetr SPEKOL 11, pH metr

## Pracovní postup

- 1) Připravte zásobní roztok bromfenolové modři: navažte na analytických vahách přesně přibližně 10 mg barviva, rozpustíte ve 200  $\mu\text{l}$  0,5 M NaOH a přidejte destilovanou vodu, aby výsledný roztok měl koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ .
- 2) Připravte zásobní roztoky kyseliny citronové a citronanu sodného o přibližné koncentraci  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  v dostatečném množství (poměr 21,01 g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  na 1 l vody a 29,41 g  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  na 1 l vody).
- 3) Ze zásobních roztoků kyseliny citronové a citronanu sodného namíchejte pufr o pH mezi 3,0 až 3,3 (poměr roztoků kyseliny: soli asi 8:2). Postupujte tak, že nejprve odlijete požadované množství roztoku kyseliny a soli a podle potřeby dotitrujte roztokem kyseliny nebo soli na požadované pH.
- 4) Připravte roztok albuminu o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  a objemu 45 ml. Protein rozpouštějte v připraveném pufru.
- 5) Ze zásobního roztoku BPB odeberte takový objem, abyste získali roztok o výsledné koncentraci  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  a objemu 45 ml. Odebraný objem zásobního roztoku rozpouštějte v připraveném pufru.
- 6) Namíchejte do lékovek 11 roztoků o následujícím složení:

Číslo vzorku	$V_{\text{albuminu}}$ (ml)	$V_{\text{BPB}}$ (ml)
1	0	5,0
2	0,5	4,5
3	1,0	4,0
4	1,5	3,5
5	2,0	3,0
6	2,5	2,5
7	3,0	2,0
8	3,5	1,5
9	4,0	1,0
10	4,5	0,5
11	5,0	0

- 7) Na SPEKOLu nastavte vlnovou délku 603 nm a změřte absorbanci jednotlivých vzorků. Jako slepý vzorek použijte destilovanou vodu, absorbanci každého vzorku změřte třikrát a pro vyhodnocení použijte jejich průměrnou hodnotu.

## Vyhodnocení

Zprůměrované hodnoty absorbancí vyneste do grafu proti molárnímu zlomku jedné ze složek. Maximum vzniklé křivky koresponduje se stechiometrií vazby.