

## Úvod

Gelová chromatografia umožňuje deliť bielkoviny podľa veľkosti molekúl, ktorá u globulárnych bielkovín odpovedá molekulovej hmotnosti. Menšie molekuly sa ľahšie adsorbujú na častice gélu a prechádzajú kolónou pomalšie. Veľké molekuly prechádzajú medzerami medzi časticami gélu a eluujú rýchlejšie. Závislosť elučného objemu  $V$  a molekulovej hmotnosti je daná vzorcom

$$M = a \cdot e^{-b \cdot V}$$

kde  $a$  a  $b$  sú nejaké kladné konštanty, ktoré určíť z dát získaných kalibráciou aparatury hovädzím séroalbumínom a cytochrómom C.

Úlohou bolo určiť molekulovú hmotnosť vzorku bielkoviny "O". Eluovaná bielkovina je bezfarebná, preto ju treba v jednotlivých frakciách určiť Lowryho metódou. Orientačne sa však dá určiť obsah bielkovín meraním absorbancie pri 280 nm.

Lowryho metóda využíva Folinovo fenolové činidlo, ktoré poskytuje s tyrozylovými zbytkami bielkovín modrofialové zafarbenie, ktoré sa meria spektrofotometricky pri 500 nm.

## Aparatúra

Chromatografická kolóna s gélom Sephadex G-100 a elučným roztokom NaCl 0,15 M

Automatický zberač frakcií + stojan s kalibrovanými skúmavkami

Automatická pipeta do 1 ml, delená pipeta 5 ml, kadičky

Proteín 5 mg

Lowryho metóda: Folinovo fenolové činidlo, 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  v 0,1 M NaOH, 0,5%  $\text{CuSO}_4$  v 1%  $(\text{CHOHCOO})_2\text{Na}_2$ , hovädzí séroalbumín.

## Postup

5 mg neznámeho proteínu "O" som rozpustil priamo v eppendorfovej skúmavke v 0,2 ml elučného roztoku NaCl. Tento roztok som aplikoval na povrch gélu v kolóne, nechal vsiaknúť a prevrstvil elučným roztokom. Nasadil som chromatografickú hlavu spojenú hadičkou so zásobnou Erlenmayerovou bankou so zásobným roztokom. Prvých 5,5 ml som zachytával do odmerného valca. Nastavil som zberač frakcií na 15 minútový interval, čím sa v kalibrovaných skúmavkách zachytávalo po cca 2,5 ml. Na frakciách som hneď meral absorbanciu pri 280 nm. V 9. skúmavke už klesla absorbancia na pôvodnú hodnotu. Po 12. skúmavke som nechal kvôli vyčisteniu gélu eluovať ešte 10 ml roztoku NaCl, ktorý som už nemeral.

### *Kalibrácia Lowryho metódy*

Pripravil som si 20 ml zriedeného Folinovho fenolového činidla 1:1 s destilovanou vodou. Pripravil som roztok C zmiešaním 75 ml roztoku 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  v 0,1 M NaOH a 1,5 ml 0,5%  $\text{CuSO}_4$  v 1%  $(\text{CHOHCOO})_2\text{Na}_2$ . Rozpustil som 5 mg hovädzieho séroalbumínu v 10 ml vody a odpipetoval do označených skúmaviek po 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ml a doplnil destilovanou vodou na 1 ml. K týmto roztokom som pridal po 5 ml roztoku C, zamiešal, nechal stáť 10 minút, pridal po 0,5 ml Folinovho činidla, rýchlo premiešal a nechal stáť 30 minút. Potom som zmeral absorbanciu jednotlivých roztokov pri 500 nm (spektrofotometer nulovaný 1. roztokom) a vyniesol kalibračný graf 1. Pre štandardy s 0,8 ml a 1 ml už absorbancia nerástla lineárne. Odmeral som si orientačne absorbanciu kalibračného roztoku séroalbumínu pri 280 nm - 0,390, to znamená, že Lowryho metóda je použiteľná pre roztoky

bielkovín s absorpciou pri 280 nm do  $0,390 \cdot \frac{0,6}{1,0} = 0,234$  (ekvivalentné 0,6 ml kalibračného roztoku zriedeného na 1 ml, u ktorého bola ešte absorbanca úmerná koncentrácii).

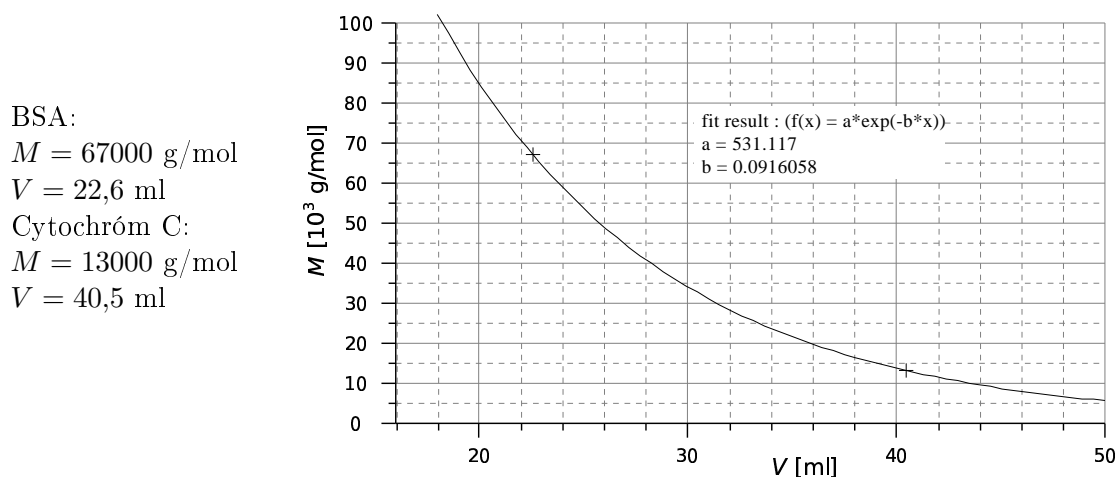
#### Lowryho metóda u frakcií

Zvýšená absorbanca pri 280 nm bola u skúmaviek 3 až 8 (nepresiahla však 0,234), z ktorých som odoberal po 1 ml (+ slepá vzorka s 1 ml elučného roztoku) a postupoval analogicky ako pri kalibrácii.

## Výsledky

Kalibračné parametre a graf gélovej chromatografickej kolóny:

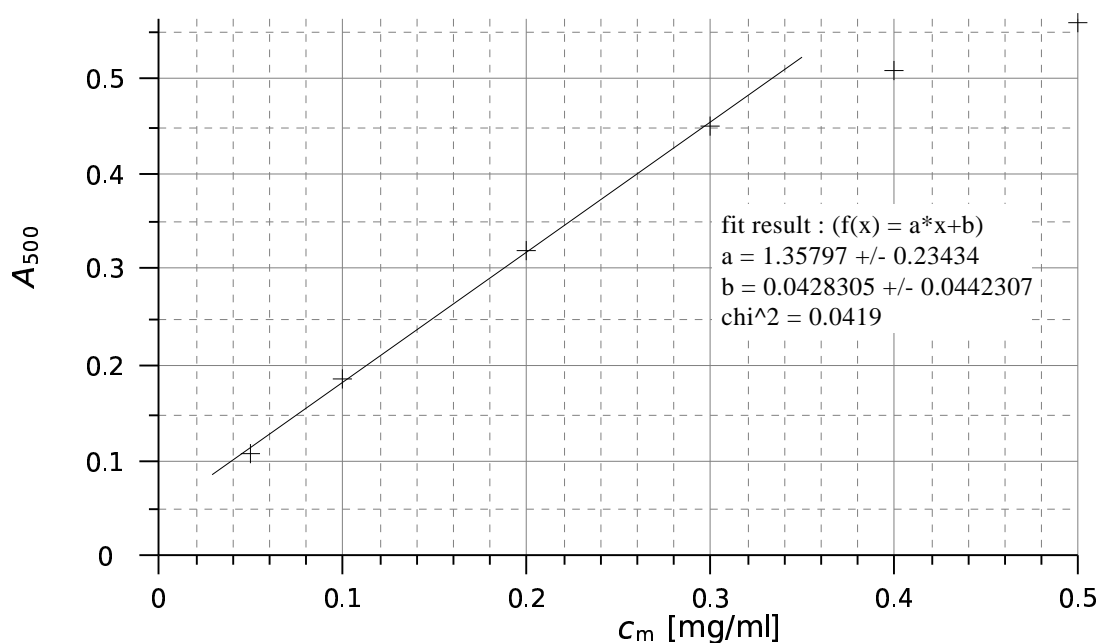
Graf 1: Kalibračná krivka chromatografickej kolóny



Kalibrácia Lowryho metódy:

$c_m$ [mg/ml]	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
$A_{500}$	0,105	0,184	0,318	0,447	0,505	0,555

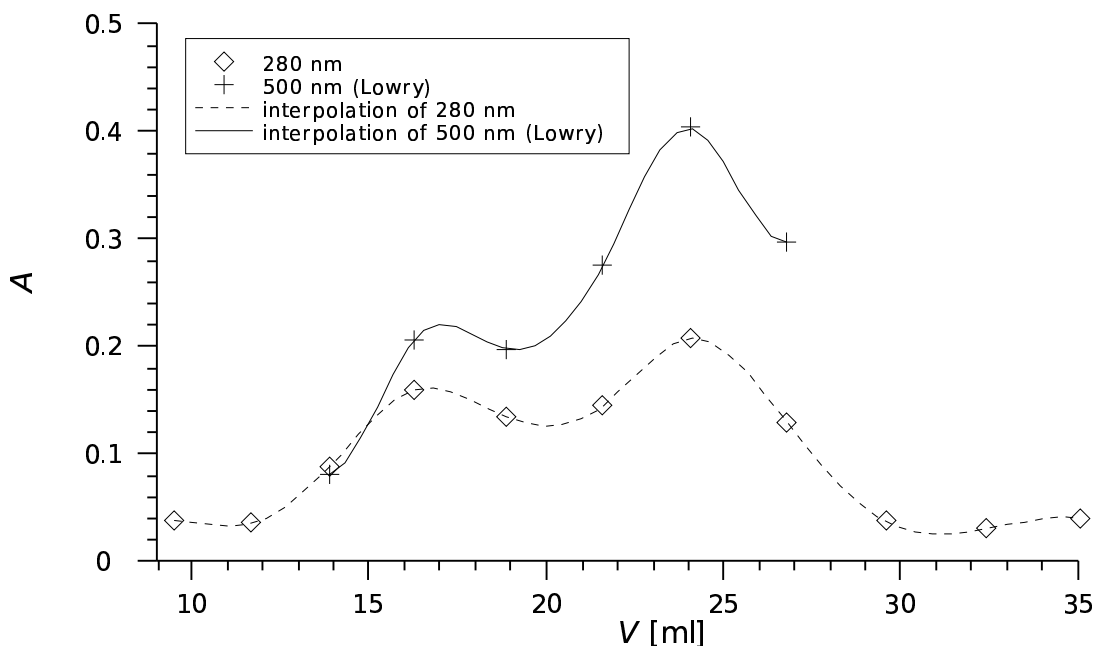
Graf 2: Kalibračná priamka Lowryho metódy



Frakcie z gélovej chromatografie:

č.fr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$\Delta V$ [ml]	4,0	2,2	2,2	2,4	2,6	2,7	2,5	2,7	2,8	2,8	2,7	2,6
$V$ [ml]	9,5	11,7	13,9	16,3	18,9	21,6	24,1	26,8	29,6	32,4	35,1	37,7
$A_{280}$	0,037	0,034	0,087	0,158	0,133	0,143	0,206	0,128	0,036	0,029	0,039	0,037
$A_{500}$			0,080	0,205	0,196	0,274	0,402	0,296				

Graf 3: Absorbancia frakcií



Najvyššia koncentrácia enzýmu bola vo frakcii číslo 7, čo odpovedá elučnému objemu medzi frakciou 6 a 7 (vzhľadom na symetriu vrcholu): 23 ml. Po prepočte podľa kalibračného grafu 1 vychádza pre neznámy proteín molekulová hmotnosť zhruba 65000 g/mol. Koncentrácie proteínu v meraných frakciách podľa tabuľky frakcií a grafu 2:

č.fr.	$\Delta V$ [ml]	$A_{500}$	$c_m$ [mg/ml]	$m$ [mg]
3	2,2	0,080	0,027	0,06
4	2,4	0,205	0,119	0,29
5	2,6	0,196	0,113	0,29
6	2,7	0,274	0,170	0,46
7	2,5	0,402	0,265	0,66
8	2,7	0,296	0,186	0,50

Spolu to dáva 2,3 mg, čo znamená, že kolónou prešla iba polovica pôvodnej navážky.

## Záver

Gelová chromatografia sa ukázala ako nie príliš vhodná metóda separácie proteínov (široký rozptyl elučných objemov), straty boli tiež značné, čo však možno vysvetliť nízkomolekulárnou prímiesou vo vzorke. O presnosti z hľadiska stanovenia molekulovej hmotnosti som sa nemal možnosť presvedčiť, pravdepodobne by však bola presnejšia SDS elektroforéza.