

**Téma:** Spektrofotometrické metody

## **Studium vlivu teplotní denaturace na strukturu fykoobiliproteinů ze spiruliny pomocí UV-Vis spektrofotometrie**

**Úkol:** Připravte roztok proteinu ze spiruliny a sledujte jeho strukturální změny vyvolané teplotní denaturací pomocí UV-Vis spektrofotometrie.

### **Teorie:**

Funkce proteinu je dána jeho strukturou a konformací, kterou stabilizují nekovalentní síly a některé slabé kovalentní vazby, jako jsou disulfidové vazby. Nekovalentní síly zahrnují vodíkové vazby, elektrostatické interakce, síly van der Waals a hydrofobní interakce. Zánik nekovalentních sil může změnit konformaci proteinu a způsobit jeho denaturaci. Existuje několik faktorů, které jsou zodpovědné za denaturaci bílkovin, např. teplota, pH, přidání organických rozpouštědel a chaotropních činidel, jako je močovina a thiokyanatan draselný.

Spirulina (sladkovodní sinice) je fotosyntetický organismus, který je považován za slibný zdroj proteinů a je rovněž považována za zdroj bílkovin, které jsou vhodné pro studium strukturálních změn, ke kterým dochází v důsledku denaturace. Má fotosyntetickou membránu, která obsahuje část absorbující světlo tvořenou různými třídami proteinů, včetně dvou fykobiliproteinů nazývaných alofykocyanin a fykocyanin. Oba tyto proteiny obsahují chromofor nazývaný fykocyanobilin, který je v rovinné konformaci, když je protein ve své nativní formě. Když je protein denaturován, tento chromofor prochází konformační změnou, což vede ke změně absorpčního spektra, které se zaznamenává pomocí UV-Vis spektrofotometru. Při denaturaci fykocyanobilinu dochází ke změně konformace, což vede k poklesu absorbance při vyšší vlnové délce (při 625 nm) a ke zvýšení absorbance v blízkosti ultrafialových vlnových délek. Tento experiment zkoumá strukturální změny, ke kterým dochází u fykobiliproteinů při teplotní denaturaci za použití UV-Vis spektrofotometrie.

### UV-Vis spektrofotometrie

Pro získání absorbančních spekter látek rozpuštěných v roztoku se používá UV-Vis spektrofotometrie, kdy je vzorek ozařován světlem z ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického spektra, díky čemuž dochází k přechodu elektronů mezi orbitály. Část záření projde přes vzorek a část se absorbuje. Absorbovaná záření je zakreslena proti vlnové

délce a nazýváme jej absorpční spektrum. UV-Vis spektrum závisí na určitých faktorech, jako je rozpouštědlo, ve kterém je vzorek rozpuštěn, koncentraci a tloušťce kyvety.

UV-Vis spektrofotometrická data mohou poskytnout kvalitativní a kvantitativní informace o dané sloučenině nebo molekule. Je nutné použít referenční vzorek (slepý vzorek) k vynulování přístroje pro rozpouštědlo, v němž je sloučenina rozpuštěna. Pro kvantitativní informace lze aplikovat Lambertův-Beerův zákon ( $A=c \cdot l \cdot \epsilon$ , kde  $A$  – absorpance,  $c$  – molární koncentrace ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ),  $l$  – tloušťka kyvety (cm),  $\epsilon$  – absorpční koeficient ( $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### **Přístroje:**

Centrifuga Eppendorf 5430, UV-Vis spektrofotometr Specord® 210 PLUS s teplotní celou VARIALUX T200

### **Materiál a pomůcky:**

spirulina tablety, Erlenmeyerova baňka, 100 ml kádinka, kyvety, nálevka, magnetická míchačka s plotýnkou, míchadlo, pipeta, plastové zkumavky Eppendorf 4x15 ml, sonikátor, špachtle, třecí miska s tloučkem, váhy

100 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7 (viz příprava str. 7)

Práškový síran amonný

### **Pracovní postup:**

#### *Příprava rostlinného extraktu*

1. Navažte 1 g práškové spiruliny a poté přeneste zpět do třecí misky obsahující 5 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7 (viz příprava str. 7).
2. Po dobu 10 minut v třecí misce roztírejte spirulinu na homogenní kaši, aby došlo k rozbití buněk a uvolnění bílkovin do roztoku. Přidejte 30 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7 a důkladně rozmíchejte a zahřejte na 40 °C.
3. Suspenzi centrifugujte v odstředivce při 2400 RPM (ot./min) po dobu 20 minut. Vzorky do centrifugy se dávají vždy naproti sobě a musí mít stejnou váhu, aby se nezničil rotor (suspenzi v Eppendorf zkumavkách proto nejprve zvažte i s víčkem!).
4. Supernatant převed'te do kádinky a doplňte opět na 30 ml přidáním 0,1 M fosfátového pufru.
5. Do roztoku supernatantu přidejte 14,25 g síranu amonného, aby došlo k vysrážení fikobiliproteinů. Míchejte 15 minut a zahřejte na 40 °C.
6. Centrifugujte roztok v odstředivce při 2400 RPM (ot./min) po dobu 20 minut.

7. Proteinovou peletu resuspenduje v 15 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7. Tento resuspendovaný proteinový roztok převedte do Erlenmayerovy baňky a použijte pro měření.

#### *Studie denaturace proteinů*

- Zapněte UV-Vis spektrofotometr.
- Napipetujte 3 ml 0,1M fosfátového pufru do kyvety, která se použije jako slepý vzorek.
- Napipetujte 3 ml fosfátového pufru do druhé kyvety.
- Do této druhé kyvety přidejte 100  $\mu$ l proteinového roztoku z Erlenmayerova baňky a dobře promíchejte pipetou.
- Obě kyvety vložte do UV-Vis spektrofotometru. Změřte absorbanci proteinového roztoku v rozsahu 400–780 nm při teplotách 25, 40, 50 a 60 °C.
- Vyjměte kyvety z UV spektrofotometru a řádně je umyjte.
- Získané výsledky přehledně zpracujte a diskutujte.

#### **Literatura**

1. <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=64&sim=792&cnt=1>
2. <https://epub.ub.uni-muenchen.de/2574/1/2574.pdf>

## Příloha 1:

### Ovládání UV/VIS a termostatu

1. Na ploše si udělejte složku se svým jménem, tam si budete ukládat své soubory.
2. Zapněte termostat a nastavte si ho na výchozí teplotu:

- a. Na dotekovém display klikněte na *SET*



- b. Klikněte na *Enter* pro nastavení žádoucí teploty.



- c. Teplotu nastavíte šipkami nahoru a dolů.

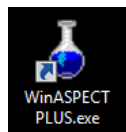


- d. Poté opět zmáčkněte *Enter* pro potvrzení.

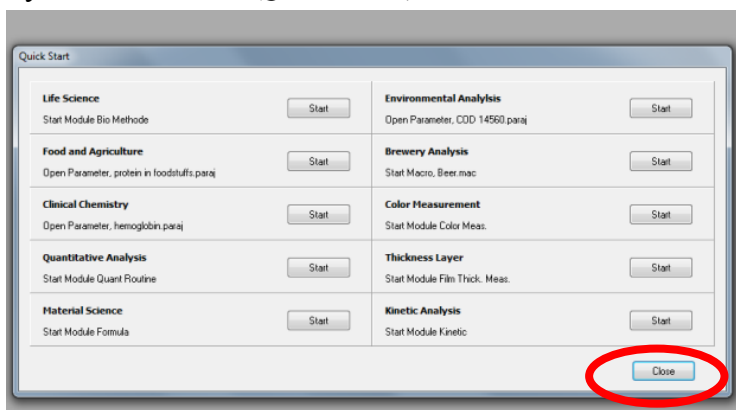


- e. Následně stiskněte *Esc* a čekejte na dosažení požadované teploty.
- f. Tyto kroky opakujete pro každé nastavení teploty.
- g. Po posledním měření na 60 °C nastavte zpět 25 °C pro další skupinu - trvá, než se termostat ochladí.

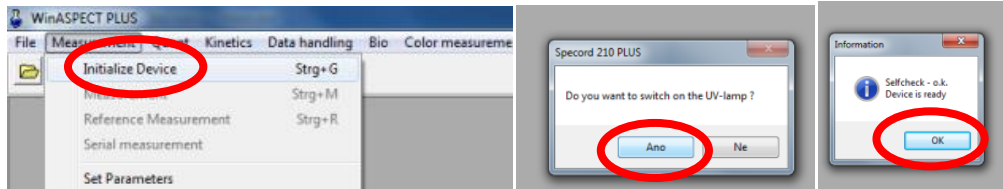
3. Otevřete program WinASPECT PLUS



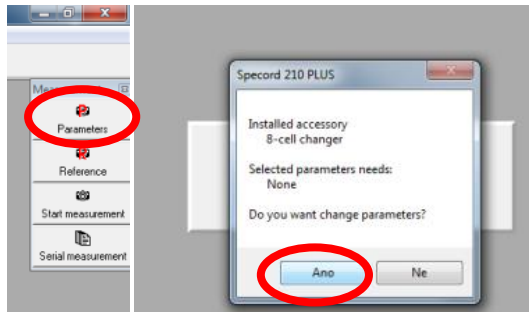
4. Vyskočí Vám okno *Quick Start*, to zavřete.



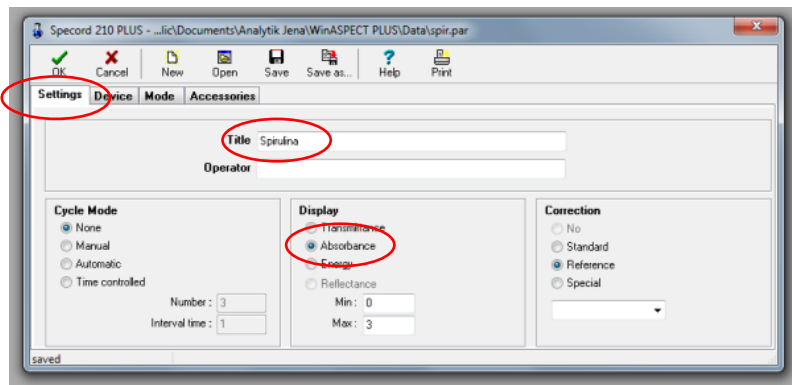
5. V záložce *Measurement* klikněte na *Initialize Device*. A poté zmáčkněte *ANO*. Tím spektrofotometr připravíte k použití. Vyčkejte, dokud nevyskočí „*device is ready*“ a dejte *OK*. Může to chvíli trvat. Tento krok lze vynechat, pokud ho již někdo před Vámi provedl.



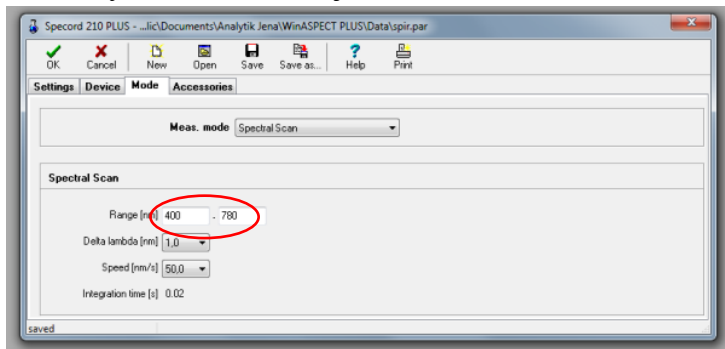
6. Poté je třeba nastavit správně parametry pro měření. Vyskočí okno *Specord 210 PLUS* – klikněte na *ANO* (pokud okno nevyskočí, stačí kliknout vpravo na panelu na *Parameters*). Následně si zkontrolujte, zda máte nastavené parametry pro „Spirulinu“. Pokud něco nesedí, opravte si to (viz body 7 až 9).



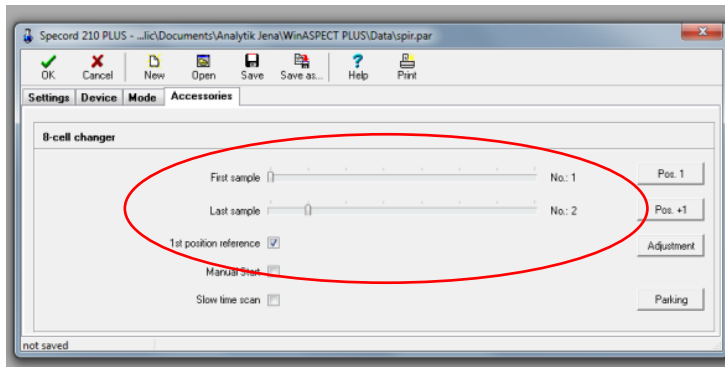
7. U záložky *Settings* v okně *Display* zkontrolujte, zda máte nastavené měření pro Absorbanci.



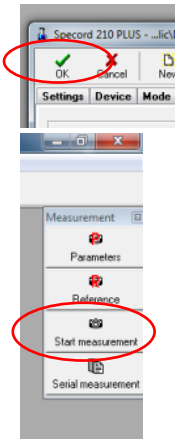
8. U záložky *Mode* zkontrolujte rozsah měření (viz **Studie denaturace proteinů bod 4**).



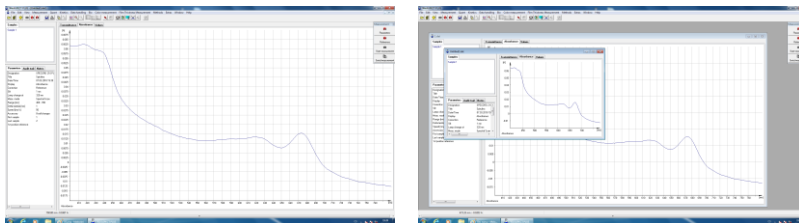
9. U záložky *Accessories* nastavte rozsah používaných cel 1 až 2. Zaklikněte, že první vzorek je referenční (blank).



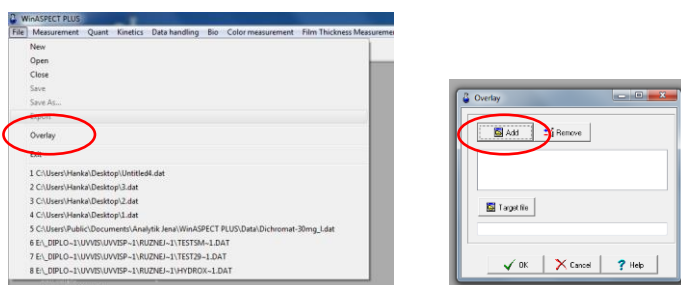
10. Poté dejte OK. A následně můžete začít měřit – *Start measurement*.



11. Po změření se Vám zobrazí spektrum, které je třeba si uložit. Po každém měření si výsledek uložte (např. pojmenujte soubory podle teplot).



12. Nakonec všechny Vaše spektra spojte do jednoho souboru: *File > Overlay*. Poté *Add* (zvolte všechna Vaše naměřená spektra) a následně vyberte *Target File* (opět Vaše složka).



13. Spektrum si lze vytisknout, případně si udělejte print screen a uložte si ho přes malování na flash disk. Nebo uložte jako csv a grafy si znovu vytvořte v Excelu.

## Příloha 2:

### Příprava 0,1M fosfátového pufru (pH 5.8–8.0 při 25°C)

1. Připravte si roztok A .... 0,2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (hydrogen fosforečnan disodný, dihydrát)

- 3,5 g hydrogen fosforečnanu rozpusťte v  $\text{H}_2\text{O}$  tak, aby finální objem byl 100 ml
- pro lepší rozpuštění je možno zahřát

2. Připravte si roztok B ... 0,2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (dihydrogen fosforečnan sodný, monohydrát)

- 2,7 g dihydrogen fosforečnanu rozpusťte v  $\text{H}_2\text{O}$  tak, aby finální objem byl 100 ml

3. Pro přípravu 100 ml 0,1 M fosfátového pufru smíchejte roztok A s roztokem B dle tabulky a doplňte do objemu 100 ml.

pH při 25°C	Roztok A (ml)	Roztok B (ml)
5.8	4.0	46.0
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.5	25.5
7.0	30.5	19.5
7.2	36	14
7.4	40.5	9.5
7.6	43.5	6.5
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65