

5. UYGULAMALI PROTEİN MİKTAR TAYİNİ YÖNTEMLERİ

A. BİLGİ

Protein miktarının belirlenmesinde kullanılan bazı yöntemler aşağıda sıralanmıştır

- Warburg-Christian yöntemi
- Biuret yöntemi
- Lowry yöntemi
- Bikinkoninik (BCA) asit yöntemi
- Boya-bağlama(Bradford) yöntemi

Warburg-Christian yöntemi protein çözeltisinin UV absorpsiyonunun ölçülmesi, diğer yöntemler ise bir belirteç ile reaksiyon sonucu oluşan renkli bir bileşiğin görünür alanda spektral olarak belirlenmesi esasına dayanır.

Renk oluşma esasına dayalı yöntemler bağıl yöntemlerdir. Oluşan rengin şiddeti ile protein yoğunluğu arasında bir orantı vardır. Bu orantının kurulması için konsantrasyonu bilinen standartlara ihtiyaç duyulur. Standartlarla bir girafik oluşturulur ve bu grafiğin eğiminden yararlanılarak protein miktarları bağıl olarak hesaplanır. En yaygın kullanılan standar ise Bovin serum albumindir (BSA).

Warburg-Christian yöntemi

- ✓ Tirozindeki fenolik gruplar ve triptofandaki indolik gruplar nedeniyle proteinler 280 nm'de maksimum absorpsiyon gösterirler. Proteinler bu özelliğinden yararlanarak hızlı sonuç veren bir yöntemdir.
- ✓ Kolaydır ve hızlı sonuç verir ancak çok duyarlı değildir
- ✓ Nükelik asitler 260 nm'de maksimum absorpsiyon gösterirler ve 280 nm'de de absorpsiyonları yüksektir. Bu nedenle incelenecek protein çözeltisi mümkün olduğunca saf olmalıdır aksi halde sonuç hatalı olur. Bunun önüne geçmek için Warburg ve Christian tarafından tablo haline getirilmiş bir seri hata düzeltme faktörü kullanılır.
- ✓ Bu yöntem bulunan sonuçlar; protein konsantrasyonu (mg/ml) = Faktör x A₂₈₀ formülünde yerine konular. Formüldeki faktör değeri A₂₈₀ / A₂₆₀ oranının tablodaki değeridir.

- ✓ Diğer bir formül ise Schleif ve Wensink tarafından geliştirilmiştir. Protein konsantrasyonu (mg/ml) = 1.5 x A280 - 0.75 x A260 formülü ile sadece 280 nm ve 260 nm'de ölçülen absorbanlardan giderek yaklaşık protein miktarının hesaplanabilmektedir.

Biüret Yöntemi

- ✓ Yöntem biüret ayırıcındaki bakır iyonlarının (Cu^{+2}) peptid azotlarına bağlanması (biüret reaksiyonu) sonucu alkali çözeltide 540-560 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren renkli bir kompleks (mavi renk) oluşturması esasına dayanır.
- ✓ Bu yöntemde bakır iyonları peptid ana zinciri üzerine bağlanır bu nedenle aminoasit çeşitlerinin farklı olmasının hiçbir önemi yoktur
- ✓ Pratik olması sebebi ile yaygın kullanılır ancak duyarlılığı 1-10mg/ml arasındadır

Lowry Yöntemi

- ✓ Bu yöntemde iki farklı reaksiyon meydana gelir.
- ✓ Birinci reaksiyon Biüret reaksiyonudur. Cu^{+2} iyonları peptid azotlarına bağlanır ve Cu^{+1} iyonunu indirgenirler
- ✓ İkinci reaksiyonda ise bu indirgenmiş Cu^{+1} iyonları varlığındaki alkali koşullarda, fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisi (Folin-Ciocalteu reaktifi) proteinlerdeki fenolik amino asitlerle (Tyr, Trp, Cys) tepkime göstererek renk oluşturur.
- ✓ Oluşan rengin şiddeti protein yoğunluğu ile doğru orantılıdır ve 660nm'de maksimum absorpsiyon verir
- ✓ Fenolik aminoasitlerle tepkime olduğu için bu aminoasitlerce zengin proteinler ile daha iyi sonuç alınır. Bu nedenle aminoasit bileşeninin ölçümler üzerinde etkisi vardır. Ayrıca amino türevleri, deterjanlar, lipitler, şelatlayıcı ajanlar vb., maddeler ölçümleri etkileyebilemetedir.

Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi

- ✓ Yeni bir yöntemdir ve reaktif maddesi BCA'dır.

- ✓ Lowry yöntemine farklı bir uygulamasıdır. Yine iki reaksiyon vardır.
- ✓ Birinci reaksiyonda biüret reaksiyonudur. Cu^{+2} iyonları peptid azotlarına bağlanır ve Cu^{+1} iyonunu indirgenirler.
- ✓ İkinci reaksiyonda ise bu indirgenmiş Cu^{+1} iyonları BCA ile renkli bir kompleks oluştururlar ve bu rengin şiddeti protein yoğunluğu ile orantılıdır.
- ✓ Oluşan bu renk kompleksi 562 nm'de maksimum absorbands gösterir.
- ✓ Yöntemin duyarlılığı Lowry yöntemininkine yakındır ancak mikro ölçüm işlemi ile bu duyarlılık çok daha fazla artırılabilir.
- ✓ İndergen şekerler ve EDTA gibi Cu^{+2} şelatlayıcı maddeler ölçüm sonuçlarına etki edebilir. Bunlar dışında diğer maddelerle etkileşimi Lowry yöntemine göre daha azdır.

Bradford (Coommassie Brilliant Blue) Yöntemi

- ✓ 1976 yılında Bradford isimli araştırmacı tarafından geliştirilmiştir. Reaktif olarak genellikle Coommassie Brilliant Blue boyası kullanılır
- ✓ Yöntemin esası boyanın proteinlere bağlanarak renk oluşturması esasına dayanır. Rengın şiddeti protein yoğunluğu ile doğru orantılıdır.
- ✓ Bu boya arginin gibi bazik ve aromatik aminoasitlere bağlanmaktadır. Bu nedenle bu aminoasitlerce zengin proteinlerle etkileşim daha fazladır
- ✓ Bu yöntemde örnek miktarı ile kullanılan boyanın hacmi ayarlanarak çok hassas ölçümler yapılabilmektedir. Genel olarak kuvetli spektrometrik ölçümlerde örnek boya oranı 1:49'dur.
- ✓ Yöntem oldukça kolay ve hassas bir yöntemdir. 595nm'de maksimum absorbands verir. Duyarlılık 150-750µg arasındadır ve ayrıca değişik tekniklerle hassaslık artırılabilir. Bu nedenler oldukça yaygın kullanılmaktadır
- ✓ Bazı maddelerle ve özellikle deterjanlarla (Np40, Triton X...) etkileşimi fazladır. Bu nedenle kullanılmadan önce proteinlerin çözündüğü tamponlardaki (Lizis tamponu, rehidratasyon tamponu...) maddeler bilinmeli ve etkileşim gösterdiği maddeler araştırılmalıdır. Örneklerin seyreltilmesi bu etkileşimi giderebilir. Genellikle 10 kat ve üzeri seyreltmeler etkileşimi ortadan kaldırmaktadır.

Tablo. Bazı boyama yöntemleri ve özellikleri (<http://www.protein.ege.edu.tr/Konular/Protein%20tay.pdf>)

Yöntem	Duyarlılık	Mekanizma	Avantajlar	Dezavantajlar
UV yöntemi (280nm)	0.02-3.0 mg/ml	Aromatik amino asitlerin (Tyr, Trp ve az oranda Phe) ışığı 280 nm de absorblar	Basit ve hızlı Örnekte kimyasal bir işlem yok	Düşük duyarlılık Amino asit kompozisyonuna bağımlı
Uzak UV yöntemi (205nm)	1.0-100 µg/ml	Peptid bağına spesifik	Basit, hızlı Örnekte kimyasal bir işlem yok	Özel ekipmana ihtiyaç, Tamponlar ile girişim
Bikinkoninik asit yöntemi	20-100 µg/ml	Bakır içeren reaktif, protein ile indirgenerek Bicinchonic asit ile reaksiyon sonrası 562 nm de ölçüm	Duyarlı ve güvenli, Diğer yöntemlere göre girişim daha az	Reaktif pahalı, Tekrarlanabilirlik düşük
Biüre yöntemi	1-10 mg/ml	Bakır içeren reaktif, protein ile reaksiyon sonrası 550 nm de ölçüm	Reaktifler ucuz ve hazırlaması kolay, Diğer yöntemlere göre girişim az	Duyarlılık düşük
Bradford yöntemi	150-750 µg/ml	Coomassie brilliant blue G-250 ile proteinin pH bağımlı geri dönüşümlü bağlanması 595 nm de ölçüm	Duyarlılık iyi, kolay ve hızlı	Alkali pH, tamponlar ve deterjanlar(SDS) ile girişim
Lowry yöntemi	30-150 µg/ml	Bakır ve fosfo molibdik/fosfotunsgtik asit bileşiminin protein ile reaksiyonu sonucu oluşan rengin 750 nm de ölçümü	Duyarlılık iyi	Zahmetli, deterjan ve şelatlayıcı ajanlara karşı girişime açık

B.UYGULAMA

Bradford Yöntemi

Kit : Bio-Rad Protein Assay Cat:500-0006

Standart Bradford Yöntemi

- ✓ Bradford belirteci(ayıraç, reagent) 1:4 oranında seyreltilir (1 ayıraç, 4 dd su). Daha sonra Whatman-1 filtre kâğıdı ya da benzeri bir kağıt ile filtre edilir ve partikullerden arındırılır. Bu seyreltilmiş ayıraç oda sıcaklığında yaklaşık 2 hafta durabilir.
- ✓ BSA'dan 250, 500, 750 ve 1000µg/ml'lik standartlar hazırlanır. BSA'nin lineer çalışma aralığı 0.2 ile 0.9 mg/ml'dir.
- ✓ 100µl örnek ve standart temiz tüpe (kör için ddsu ya da proteinin çözüldüğü tampon) pipetlenir daha sonra 4,9 ml seyreltilmiş ayıraç üzerine eklenir ve vortekslenir.

- ✓ En az 5 dakika oda sıcaklığında beklenmelidir. Bekleme arttıkça absorbans artar ancak bekleme süresi 1 saati geçmemelidir.
- ✓ Biorad Smart Spektrofotometresi ile 595 nm'de küvetlerle spektrometrik ölçüm yapılır. Ölçümler iki ya da 3 tekrarlı olmalıdır.

Microtiter Plate (Elisa Plate) ile Bradford Yöntemi

Kit : Bio-Rad Protein Assay Cat:500-0006

- ✓ Bradford belirteci(ayıraç, reagent) 1:4 oranında seyreltilir (1 ayırac, 4 dd su). Daha sonra Whatman-1 filtre kağıdı ya da benzeri bir kağıt ile filtre edilir ve partikullerden arındırılır. Bu seyreltilmiş ayıraç oda sıcaklığında yaklaşık 2 hafta durabilir.
- ✓ BSA'dan 100, 200, 300, 400 ve 500µg/ml'lik standartlar hazırlanır. Standartlar ve örnekler en az 2 ya da 3 tekrarlı okunmalıdır.
- ✓ Protein örneklerinin konsantrasyonları yüksek ise değişik oranlarda sulandırılarak okuma aralığı sınırlarına çekilmelidir. Bunun için örnekler değişik sulandırma oranlarında plate kuyucuklarını yüklenerek denenmelidir.
- ✓ Her plate kuyucuğuna 10µl örnek ya da standar tekrarları ile birlikte konulur. Kör(blank) kuyucuğuna 10µl dd su ya da proteinin çözöldüğü tampon konulmalıdır. Daha sonra üzerlerine 200µl bradford ayıraca eklenir ve plate mikropate mikseri kullanılarak çalkalanır. Çok sayıda örnek çalışılıyorsa bekleme zamanlarının aynı olması için ayıraç multikanal pipetlerler konulmalıdır.
- ✓ En az 5 dakika oda sıcaklığında beklenmelidir. Bekleme arttıkça absorbans artar ancak bekleme süresi 1 saati geçmemelidir.
- ✓ Uygun bir elisa okuyucundan 595 nm'de absorbanslar okunur.

Kaynaklar

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2014, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2013, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-117-8, 2013.