

2. Hafta: Protein Tayin Yöntemleri: Lowry, Bradford, Biüre, Kolloidal altın yöntemi, Bikinkoninik asit yöntemi, florimetrik ve spektrofotometrik yöntemler.

Prof. Dr. Şule Pekyardımcı

Bir enzim veya protein saflaştırılması işleminde saflaştırmanın gidişinin izlenebilmesi amacıyla her adımda protein tayini yapılması gerekir. Ancak bu sayede çalışmanın verimi ile ilgili yorum yapılabilir. Buna ilave olarak enzimin aktivite tayinlerinin de yapılması gerekir. Çünkü saflaştırılacak enzimin saflaştırma aşamalarında aktivitesini kaybetmesi istenmeyen bir durumdur. Bir saflaştırma işlemindeki her bir adımın sonunda toplam protein ölçümlerinden elde edilen sonuçlar, ilgilenilen enzimin aktivitesi ile kıyaslanarak spesifik aktivite belirlenir ve böylece saflaştırma derecesi hakkında bilgi edinilir. Bu yöndeki çalışmalarda amaç ölçümün basit ve hızlı, spesifikliğinin yüksek olmasıdır. Hızlı ölçümler, saflaştırma adımları arasındaki bekleme zamanını azaltarak proteolizin olumsuz etkisini önler.

Saflaştırma işlemlerinde dikkat edilecek önemli bir konu, çıkış kaynağından veya saflaştırma adımlarından ortama katılan bazı maddelerin enzim aktivitesi ve protein tayini yöntemlerine etkisinin olup olmadığıdır. Doğru ölçümler için tayinden önce girişim yapan maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması şarttır. Ancak, proteinin aktivitesi için gerekli bir faktörün saflaştırma adımları sırasında ortamdaki uzaklaştırılması da sakıncalıdır.

Toplam protein tayini, genel bazı yöntemlere dayanır. Bunun için günümüze kadar çok çeşitli direkt ve indirekt teknikler geliştirilmiştir. Bu yöntemler Kjeldahl metodu, infrared spektroskopisi, turbidimetri, florimetri, refraktometri polarimetri olarak sayılabilir. Günümüzde, protein tayinleri genellikle UV-spektrofotometrik temellidir veya proteinin görünür bölgede oluşturduğu ürünün kimyasal yöntemlerle belirlenmesine dayanmaktadır.

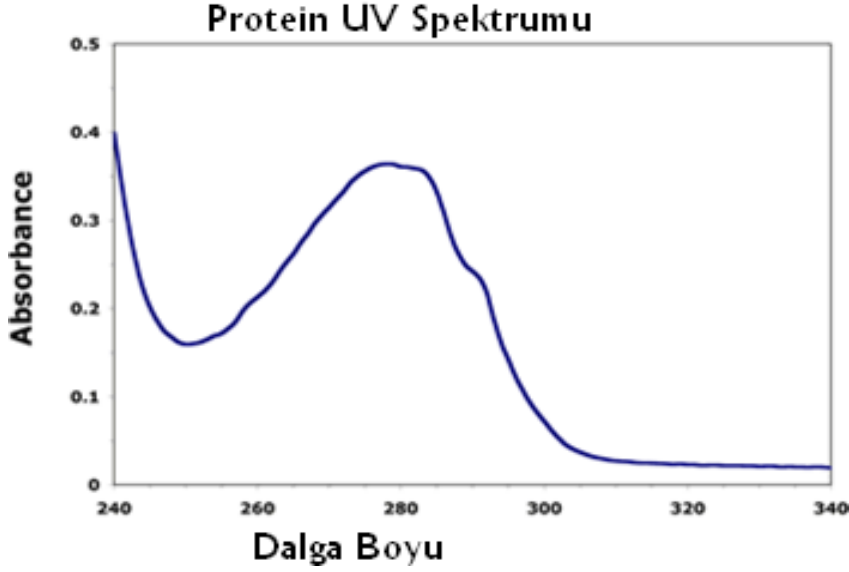
Ultraviyole Bölgedeki Spektrofotometrik Ölçümler

280 nm deki Ölçümler

Proteinlerin içerdiği fenilalanin, tirozin (fenol halkası) ve triptofan (indol halkası) amino asitlerinden dolayı 280 nm de absorban göstermesinden yararlanılarak tayin yapılır. Bu yöntemle 0,05-2.0 mg protein ml⁻¹ aralığında tayin yapılabilir ve ayrıca 280 nm de

absorpsiyon veren çeşitli maddelerin girişiminden de etkilenir. Özellikle ortamda purin ve pirimidin bazlarını içeren DNA ve RNA olduğu zaman bu etki oldukça önemlidir. Böyle bir durumda, 280 nm ve 260 nm de spektrofotometrik olarak ölçümler alınır ve aşağıda verilen düzeltme faktörü kullanılarak hesaplama yapılır.

$$\text{Protein(mg/ml)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$



Uzak UV Bölgedeki Ölçümler

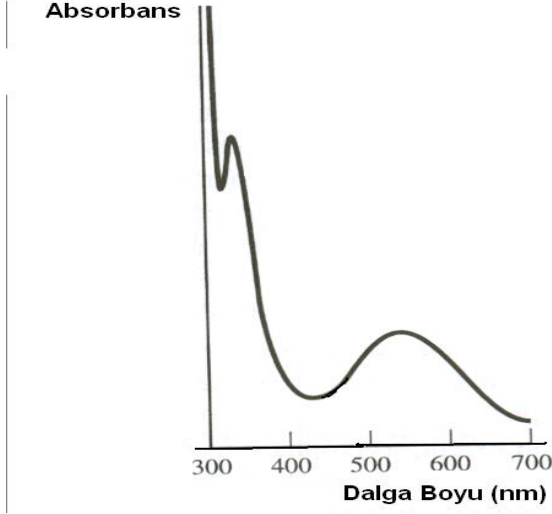
Protein ve peptitlerdeki peptit bağları **191-194 nm** de önemli bir absorbans gösterirler. Bu yöntemle 0,01-0,05 mg/ml arasındaki proteinler tayin edilebilir. Bu yöntem proteindeki amino asit bileşiminden bağımsız olduğu için 280 nm deki ölçümlere göre çok daha avantajlıdır. Bu dalga boylarında oksijen de absorbans verdiği için özel spektrofotometreler kullanılması gerekir. Ancak ölçümler 205 nm de yapılır ve 280 nm deki ölçümlerle birleştirilirse bu formülle çok daha kesin sonuçlar alınabilir. Bu yöntemde saflaştırılacak enzim karışımına bir ön işlem yapılmasına gerek yoktur.

Görünür Bölgedeki Spektrofotometrik Ölçümler

Biüre Yöntemi

Bu yöntemde alkali ortamda **Cu⁺²** iyonlarının protein ve peptitlerdeki peptit bağı azotuyla verdiği reaksiyon sonucu oluşan mavi-mor rengin 540-560 nm deki absorbansından yararlanır. Bu yöntemin duyarlılığı fazla değildir (0.05-5.0 mg

protein/ml).Yöntem serbest amino asitlerden etkilenmez. Ancak tris gibi tamponlar ve amonyum sülfat çöktürmesinden sonra kalan amonyum girişim yapar.



Lowry Yöntemi

Protein tayininde en yaygın olarak kullanılan yöntem **Folin-Lowry** yöntemidir. Biüre reaktifi kullanılarak oluşan Cu-protein kompleksi, fosfomolibdik fosfotungstik asit ile **heteropolimolibden** mavisine indirgenir ve sonuçta koyu mavi bir renk oluşur. Yöntem çok duyarlıdır (0.05-0.5mg protein.ml-1) ancak pH'ya bağımlıdır. Absorbans cam veya polistiren küvetler kullanılarak 750 nm de yapılır. Bu yöntemde proteinin amino asit bileşiminin etkisi orta düzeydedir. Ancak amino türevleri, tamponlar, deterjanlar, ilaçlar, lipitler, şekerler ve nükleik asitler girişim yapar. Enzim saflaştırmasında kullanılan birçok reaktif de bu metodu interfere edebilir, bunun sonucu olarak her bir sorunu çözebilmek amacıyla bu yöntemin farklı modifikasyonları bulunmaktadır.

Smith (BCA) Yöntemi

Diğer protein tayin yöntemlerine göre daha yeni olan bu yöntemde bikinkoninik asit (BCA) reaktif olarak kullanılır. 562 nm de absorbans veren koyu mor renk ile karakterize olur.

BCA yöntemi proteinin amino asit kompozisyonundan az etkilenir ve girişim etkisi gösteren çok fazla bileşik yoktur. Ancak BCA reaktifi pahalıdır ve tekrarlanabilirlik düşüktür. Amino asitler, deterjanlar, lipitler, şekerler ve nükleik asitler Lowry metoduna göre daha iyi tolere edilir. İndirgen şekerler ve bakır şelatlayıcı maddeler bu yöntemde girişim etkisi gösterir. Cu^{+2} iyonları ile şelat oluşturan EDTA gibi maddeler de girişime yol açar.

Bradford (Coomassie Brilliant Blue) Yöntemi

Bu yöntem oldukça fazla kullanılmaktadır ve oldukça hassastır. Yöntem, organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturması esasına dayanır. Boya bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Bu boya kuvvetli bir asitte çözüldüğü zaman, protonlanmadan dolayı kırmızı-kahverengi arası bir renge dönüşür. Bu boya, (+) yüklü bir proteine bağlandığında ise renk maviye dönüşür. Bu yöntem oldukça duyarlıdır ancak duyarlılık daha da arttırılabilir (0.01-0.05 mg protein/ml).

Yöntem bu boyanın farklı konsantrasyondaki protein çözeltilerinde farklı şiddette mavi renk oluşturmasından yararlanılarak geliştirilmiştir.

Boya özellikle arginin gibi bazik ve bazı aromatik amino asitlere bağlanmaktadır.

Spector isimli bilim adamı protein örneği ile kullanılan boyanın hacmini uygun şekilde oranlayarak çok daha hassas protein tayinleri yapılabileceğini belirtmiştir .

Bu yöntemle oldukça geniş bir aralıkta protein tayini yapmak mümkündür. Kolay ve hassas bir yöntemdir.

Bu boyayla arginin amino asidi diğer amino asitlere göre daha fazla cevap verir. Arginin zengin bir proteinin miktar tayini yapıldığında standardın da aynı şekilde arginin zengin olması gerekir.

G-250 boyası sulu ortamda kırmızı(A) ve mavi(B) olmak üzere iki şekilde bulunur. Asidik ortamda kırmızı renkli A şekli fazladır ve 470 nm de maksimum absorpsiyon yapar. Bu boya, (+) yüklü bir proteine bağlandığında ise 595 nm de mavi bir renk oluşur. Renk oluşumu 5 dakikada tamamlanır, ancak 10-15 dakika içinde çökmeler olabilir.

Sedmak ve Grossberg, boya-protein kompleksinin boyanın kaynağına bağlı olarak maksimum absorbans aralığının 595-620 nm arasında değiştiğini bildirmiştir.

Bu araştırmacılar protein miktarının belirlenmesi için 620 ve 464 nm deki absorbanların oranının kullanılmasının daha uygun olacağını ve asidik bir ortam oluşturmak için fosforik asit yerine perklorik asit veya HCl kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Bu yöntemde duyarlık 150-750 µg protein/ml civarındadır. Bu duyarlık mikro tayinlerle daha da arttırılabilir (25-200 µg protein/ml).

Numunenin absorbanı lineer bölgenin üstüneyse toplam hacim 5 ml oluncaya kadar Bradford çalışma tamponuyla seyreltilebilir. Blank de aynı hacime seyreltilmelidir (Spector, 1978).

Bu yöntem için alternatif bir standart olarak ovalbümin kullanılabilir.

Renk oluşumunda proteinin amino asit bileşiminin (arginin gibi bazı amino asitlerle aromatik amino asitler) reaksiyon üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir.

Bradford yönteminde 595 nm de absorban veren mavi rengin ölçümü esnasında cam ve polistiren küvetler kullanılabilir. Ancak cam küvetlerde renk cam yüzeyine absorbe olduğundan bir kullanımlık polistiren küvetler tercih edilmektedir. Cam küvetlerin kullanılması durumunda 0,1 M HCl de bekletme işleminin ardından su ve asetonla yıkanmalıdır.

Protein Tayinlerinde Dikkat Edilmesi Gereken Konular

Protein Standartları

Birçok protein tayin yönteminde bilinen bir proteinin kullanılmasıyla çizilen standart grafikler yardımıyla bilinmeyen örneğin miktarı bulunur. Protein tayinlerinde kullanılan proteinin amino asit bileşimi ve eğer varsa protein olmayan prostetik grupların (örneğin glikoproteinlerde karbohidrat grupları gibi) varlığı spektrofotometrik bir ölçümde renk oluşumunu etkileyebilir. Bu nedenle eğer mümkünse, saflaştırılmak istenen proteinin saf bir örneğiyle ölçümü kalibre etmek, benzer renk verimine ulaşmak açısından en iyi çözümdür. Böyle bir çözümün mümkün olmadığı durumlarda en yaygın kullanılan protein standardı sığır serum albuminidir (BSA).

Küvetler

Protein tayinlerinde farklı koşullarda farklı özellikteki küvetlerden yararlanılır. Cam küvetlerle 320 nm nin üzerinde, kuartz küvetlerle görünür ve UV bölgede çalışmak

mümkündür. Ancak görünür bölgede cam küvetlerden yararlanmak mümkünken ekonomik değeri oldukça yüksek olan kuartz küvetleri kullanmak doğru bir seçim değildir.

PROTEİN TAYİNİNDE SPESİFİK YÖNTEMLER

Herhangi bir kaynaktan belirli bir protein veya enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu, gelişmiş teknik ve cihazlara rağmen oldukça güçtür. Bu güçlük protein karışımlarının kompleks olmasından, elde edilen proteinin çok düşük konsantrasyonda olmasından, protein veya enzimin kararsızlığından ve saflaştırmanın her aşamasında saflığın kontrol edilmesi gerekmesinden kaynaklanır. Elde edilen saf bir protein veya enzimin miktarı, bu proteinin biyolojik aktivitesi, karakterizasyonu ve yapı-fonksiyon ilişkisinin aydınlatılması için yetersiz olabilir.

Saf bir proteinin miktarını arttırmak için ya çok fazla ekstrakt kullanılması gerekir veya gen teknolojisinden faydalanılır. Gen teknolojisi, gen klonlanması, rekombinant DNA teknikleri, gen transferi, PCR (polymerase chain reaction) gibi birçok konuyu içine alır. Gen teknolojisi ile hücre genomundan tek bir gen çıkarılıp bunun bir kaç bin kopyası yani gen amplifikasyonu yapılabilir. Klonlanan gen bir bakteri hücresine veya başka bir organizmanın içine sokularak genin ifadesi olan proteinin bol miktarda sentezlenmesi sağlanır (rekombinant insulin ve interferon sentezleri gibi).

Proteinlerin doğasından kaynaklanan güçlükler nedeniyle her zaman istenen saflaştırma sağlanamaz. Burada biyokimyacının yaratıcılığı ve analitik yöntemlere hakimiyeti önemlidir. Bazen çok basit, spesifik yöntemler proteinlerin tanımlanmasında yeterli olabilir, hatta hassas ve pahalı yöntemlere göre daha fazla bilgi verebilir. Özellikle fraksiyonlu amonyum sülfat çöktürmesi yöntemiyle, saflaştırılacak proteinin hangi fraksiyonda olduğu önceden belirlenebilir ve böylece çalışma daha çabuk tamamlanır.

Bütün enzim tayin yöntemleri, enzimin substratına olan afinitesinden ve spesifikliğinden yararlanarak geliştirilmiştir. Bir enzimin aktivitesi, substrat ve koenzimiyle inkübe edilerek ve absorbans ölçümüyle belirlenir. Böylece o enzimin ortamdaki varlığı belirlenmiş olur. Çok az sayıda enzim aktivite gösterebilmek için aynı kofaktörü kullanır. Aynı kofaktörü kullanan başka enzimlerin de ortamda olması, spesifik aktiviteyi etkileyebilir. Ancak bu etki

ortama daha fazla substrat ve koenzim veya kofaktör ilave edilerek azaltılabilir. Çünkü yüksek substrat konsantrasyonu koenzimin diğer enzimler tarafından kullanılmasını önler. Bir metal iyonunun enzimle kompleks yapması, o proteinin 280 nm deki protein pikinin başka dalga boylarına kaymasına neden olur. Dışarıdan ilave edilen metal iyonunun protein pikinde kaymaya neden olması, o proteinin çözeltide olduğunu gösterir. Saflaştırılacak protein çöktürülerek (metal iyonu kompleksleştirilerek) veya kromatografik ve elektroforetik yöntemlerle ortamdan alınabilir.