KOMPARACIJA METODA DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE PROTEINA U TLIMA

Ćurčić, Nikola

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:681144

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Nikola Ćurčić

Komparacija metoda detekcije i kvantifikacije proteina u tlima

Završni rad

Mentor: prof.dr.sc. Branimir Kutuzović Hackenberger

Osijek, 2015. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij biologije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

KOMPARACIJA METODA DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE PROTEINA U TLIMA

Nikola Ćurčić

Rad je izrađen u: Laboratorij za analizu bioloških sustava
Mentor: dr. sc. Branimir Kutuzović Hackenberger, **izv. prof.**

Kratak sadržaj završnog rada: Cilj ovoga rada je usporediti dvije kolorimetrijske metode određivanja koncentracije proteina: metode po Bradford-u i metode po Lowry-ju. Uzorak iz kojeg su proteini izolirani je crveni mulj koji nastaje kao jalovina nakon što se iz boksita ukloni aluminijev oksid, Al_2O_3 Bayerovim postupkom. Prisutnost proteina bi ukazala na mikrobiološku aktivnost što ukazuje na mogućnost bioremedijacije kontaminiranoga okoliša.

Broj stranica:14
Broj slika:4
Broj tablica:2
Broj literaturnih navoda:3
Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: protein, tlo, crveni mulj, Lowry, Bradford, glomalin

Rad je pohranjen u: Knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Bachelor's thesis, Department of Biology
Undergraduate university study programme in Biology

Scientific area: Natural science
Scientific field: Biology

COMPARATION OF SOIL PROTEIN DETECTION AND QUANTIFICATION METHODS

Nikola Ćurčić

Thesis performed at: Biological system analysis laboratory
Supervisor: dr.sc. Branimik Kutuzović Hackenberger, **associate professor**

Short abstract: Goal of this thesis is to compare two colorimetric assays for protein detection and quantification: Bradford and Lowry assays. Protein extraction sample was red mud, which is waste after Bayer process, bauxite refining process to produce alumina, Al_2O_3. Presence of proteins is indicator for possible microbial activity in red mud, which is important part of bioremediation of contaminated environment.

Number of pages:14
Number of figures:4
Number of tables:2
Number of references:3
Original in: Croatian

Thesis deposited in:
Library of Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Departmetnt of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek.

Kazalo

1. Uvod.....5
2. Osnovni dio.....6
2.1. Kolorimetrijske metode određivanja koncentracije; Bradford i Lowry metode.....6
2.2. Uzorak tla.....7
2.3. Eksperimentalni dio rada.....8
3. Zaključak.....13
4. Literatura.....14

1. Uvod

Tlo predstavlja gornji sloj zemljine kore u kojem se pod utjecajem fizikalnih, kemijskih i bioloških čimbenika stvaraju uvjeti za razvoj i život različitih mikroorganizama koji se mogu svrstati u sve tri velike filogenetske skupine, a to su arheje, bakterije i eukarioti. Ti organizmi sa velikim višestaničnim organizmima, kao što su biljke, mogu biti u različitim simbiontskim odnosima, od mutualizma preko neutralizma sve do parazitizma. Te interakcije rezultiraju biogeokemijskim kruženjem pojedinih elemenata što određuje prolazne ili stalne osobine tala. Međutim, uzgoj kultura mikroorganizama tla u laboratorijskim uvjetima kako bi se odredio sastav mikrobiološke flore se pokazao kao vrlo neučinkovita metoda. Kao puno bolja opcija se pokazala ekstrakcija proteina iz tla te njihova kvantifikacija i determinacija u svrhu procjene sastava mikrobiološke flore tla.

Značajan udio proteina u tlu otpada na Glomalin (čija koncentracija može biti po nekoliko miligrama po gramu tla), skupinu proteina koji potječu iz mikoriznih gljivica iz reda *Glomerales*. Iako je funkcija glomalina u gljivicama nepoznata, velika važnost glomalina leži u tome što djeluje na osobine tla u kojem se nalazi. Tako glomalin djeluje poput ljepila za čestice tla, što mijenja teksturu tla, kapacitet tla za vodu i zrak te autohtoni diverzitet mikroorganizama. Udio glomalina u tlu može varirati ovisno o tome je li tlo obrađivano ili nije, te ovisi i o klimi.

U ovom radu se uspoređuju dvije kolorimetrijske metode kvantifikacije proteina: metoda po Bradford-u i metoda po Lowry-ju. Proteini su ekstrahirani pomoću metode TGE (eng. *total glomalin extraction*). Međutim, uzorak koji je podvrgnut postupku ekstrakcije proteina nije prirodno tlo, nego crveni mulj (eng. *red mud*), koji preostaje kao jalovina pri Bayerovom postupku obrade boksita kako bi se dobio aluminij. Iako je usporedba ove dvije metode primarni cilj ovog rada, sama detekcija proteina koja ukazuje na njihovo prisustvo u crvenom mulju dovodi do zaključka da u ekstremnim uvjetima u vidu vrlo visokog pH koji vlada u crvenom mulju postoji mikrobiološka aktivnost, tj da postoje organizmi koji mogu preživjeti izrazito visok pH, što je prvi korak u bioremedijaciji okoliša kontaminiranog crvenim muljem.

2. Osnovni dio

2.1. Kolorimetrijske metode određivanja koncentracije; Bradford i Lowry metode

Kolorimetrijske metode se temelje na optičkim svojstvima otopine obojenih tvari. Temelje se na Lambert-Beer-ovom zakonu koji govori o korelaciji udjela propuštene svjetlosti kroz otopinu i koncentracije te otopine. Matematički Lambert-Beerov zakon glasi:

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-a \cdot b \cdot c}; \text{ odnosno: } \frac{P_0}{P} = 10^{a \cdot b \cdot c}$$

$$\lg \frac{P_0}{P} = a \cdot b \cdot c = A$$

Gdje je: P - intenzitet propuštenog zračenja; P_0 - intenzitet upadnog zračenja; a - apsorpcijski koeficijent (konstanta koja ovisi o tvari i frekvenciji zračenja); b - debljina sloja tekućina (kivete); c - koncentracija otopine; A - apsorbancija

Što je veći udio svjetlosti apsorbiran (veća apsorbancija), odnosno što manje svjetlosti prolazi kroz otopinu, to je koncentracija otopljene tvari veća. Svaki reagens kojim bojamo uzorak kojem ćemo mjeriti koncentraciju pokazuje pri određenoj valnoj duljini apsorpcijski maksimum, što označava valnu duljinu koju reagens koji je reagirao sa ciljanim uzorkom najviše apsorbira.

Metoda po Bradford-u (Coomasie Brilliant Blue)

Coomasie Brilliant Blue je boja koja sa proteinima daje kompleks sa apsorpcijskim maksimumom pri 595nm. Praktična prednost metode leži u brzini izvođenja metode, reagens se lako pripravi, a boje uzoraka su stabilne i brzo se razviju. Iako je prag osjetljivosti ispod 20μgcm^{-3} proteina ona je relativna metoda jer količina boje vezane za protein ovisi o sadržaju bazičnih aminokiselinskih ostataka u proteinu. Zato je važno dobro odabrati standard pri mjerenju.
Pri mjerenju proteina u tlu nastaju odstupanja od stvarne koncentracije proteina jer boja Coomasie Brilliant Blue reagira sa huminskim tvarima u tlu i daje veće rezultate od stvarne koncentracije proteina u tlu.

Metoda po Lowry-ju (Folin-Ciocalteau metoda)

Folin-Ciocalteau reagens, koji se sastoji od natrijeva volframata, molibdata i fosfata reagira sa fenolnim skupinama tirozinskih ostataka u proteinu, te daje plavo obojenje sa apsorpcijskim maksimumom pri 750nm. Donji prag osjetljivosti je oko 10 μgcm^{-3}. Ova metoda je relativna i sklona odstupanjima prilikom duže inkubacije, ovisi o pH. Također reagira sa polifenolima i daje lažne veće rezultate od stvarne koncentracije proteina u tlu.

2.2. Uzorak tla

Uzorak korišten u ovome radu je crveni mulj, koji preostaje nakon industrijskog dobivanja aluminija iz boksita (u kojem se aluminij nalazi u obliku aluminij-hidroksida) Bayerovim postupkom.

Bayerov postupak

U prvom koraku ovoga postupka usitnjena ruda se miješa sa lužinom, NaOH. Produkt ove reakcije su aluminatni ioni $[Al(OH)_4]^-$, koji su otopljeni te ih se može odvojiti od neotopljenih spojeva Ti, Fe i Si, koji se uklanjaju filtracijom. Otopina aluminat-iona se zatim postupno razrjeđuje sa vodom te dolazi do taloženja $Al(OH)_3$. Talog aluminijeva hidroksida se žarenjem pri temperaturi od 1200 °C prevodi u čist bezvodni Al_2O_3.
U drugom koraku Al_2O_3 se elektrolitički reducira u elementarni aluminij.

Crveni mulj, koji je korišten kao uzorak u ovom radu, je smjesa netopivih spojeva iz prvoga koraka Bayerova postupka. Zbog prisutnosti NaOH, pH crvenog mulja je jako visoka, preko pH=11, što predstavlja ekstremne uvjete za razvoj i održivost života u takvom mediju.

Podrijetlo crvenog mulja

Crveni mulj korišten u ovome radu potječe sa dvije lokacije. Jedan uzorak potječe iz Obrovca, propale tvornice aluminija "Jadral", a drugi potječe iz Mađarske, grada Ajka, u kojem se 2010. dogodilo pucanje bazena sa pohranjenim crvenim muljem i lužinom, što je izazvalo ekološku katastrofu.



Slika 1: Satelitski snimak izlaska crvenog mulja kroz oštećeni bazen (Web 1)

2.3. Eksperimentalni dio rada

Ekstrakcija proteina

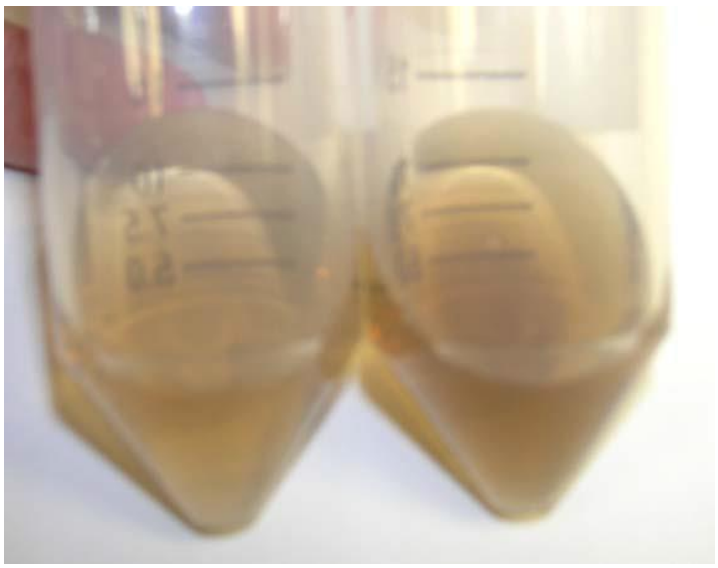
Ekstrakcija proteina je napravljena metodom TG (Total Glomalin) ekstrakcije prema protokolu iz rada Wright, S. F., Upadhyaya, A., 1996.

Kemikalije

20 mM otopina trinatrij-citrata, pH=7

Postupak

1. 1 do 2 g uzorka tla staviti u kivetu za centrifugu sa 8 mL 20 mM otopine trinatrij-citrata
2. Vorteksirati kako bi se dobio odgovarajući kontakt površina čestica tla i otopine
3. Autoklavirati 60" na 121 °C
4. Centrifugirati na 5000 G 15 minuta odmah nakon ekstrakcije (uloga centrifugiranja je razdvojiti talog tla i supernatant sa proteinima te se može izvesti na bilo kojoj brzini od 3000 do 10 000 G)
5. Odvojiti supernatant koji sadrži proteine i pohraniti na 4 °C



Slika 2: Izolirani supernatant sa proteinima metodom TG ekstrakcije (Web 2)

Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu

(Bradford, 1976.)

Priprema Bradford otopine

Stock otopina:

1. 175 mg Coomasie Brilliant Blue G-250 u 50 mL 95% EtOH
2. Dodati 100 mL 88% fosforne kiseline

Radna otopina:

1. 3,75 mL EtOH
2. 7,5 mL 88% fosforne kiseline
3. 7,5 mL Bradford stocka
4. 125 mL deionizirane vode

-prije upotrebe potrebno je otopinu profiltrirati više puta kroz Whatman No. 1 papir te čuvati otopinu u tamnoj boci na sobnoj temperaturi

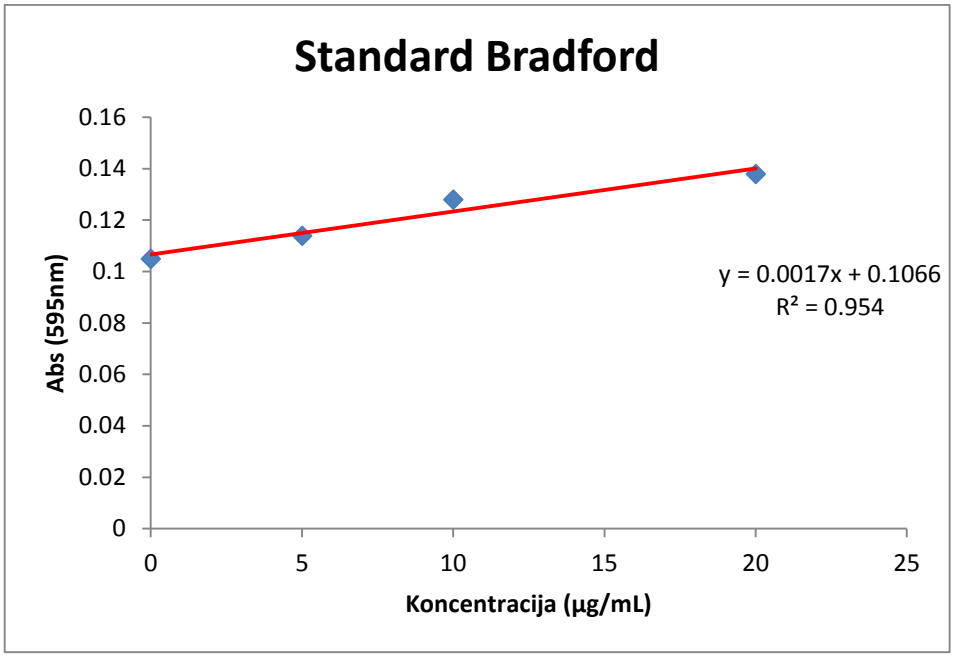
-boja može stajati nekoliko tjedana, ali je treba povremeno filtrirati

Postupak

1. Priređen je standard BSA poznatih koncentracija u fosfatnom puferu. Koncentracije korištene u ovome radu su iznostile 0, 5, 10 i 20 µg/mL.
2. Spektrometar je kalibriran čistim puferom
3. U kivetu za spektrofotometriju je stavljeno 600 µL boje, 150 µL pufera i 10 µL BSA ili uzorka, te se očitavala apsorbancija na 595 nm

Rezultati

Uzorci proteina iz crvenog mulja iz Mađarske su bili podijeljeni u 2 skupine (vlažni i suhi uzorak), dok je uzorak iz Obrovca bio samo jedan. Svaki od tri uzorka je bio određivan u dva puta, te je za konačnu koncentraciju korištena aritmetička sredina dviju koncentracija. Koncentracija nepoznatih uzoraka je određivana po formuli pravca (koji je dobiven kao funkcija ovisnosti apsorbancije i koncentracije standarda BSA) i apsorbanciji uzoraka proteina iz crvenog mulja nepoznate koncentracije.



Graf 1: standardni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji

Uzorci	Koncentracija (µg/mL)
Mađarska (suhi)	9,5
Mađarska (vlažni)	8
Obrovac	11

Tablica 1: koncentracije uzoraka proteina iz crvenog mulja

Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju
(Lowry et al., 1951.)

Priprava otopina

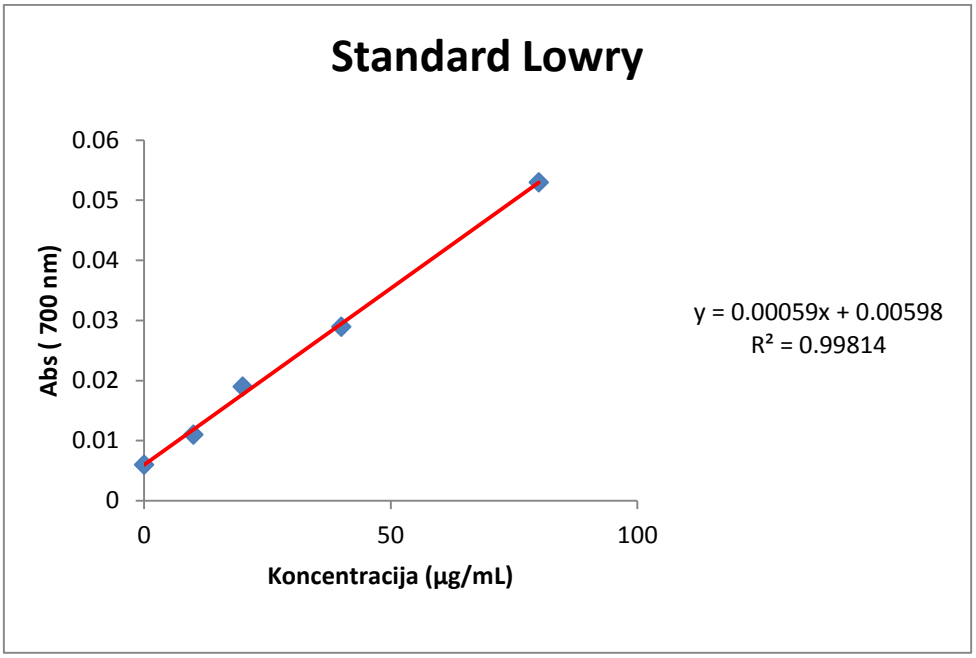
1. Reagens za stvaranje kompleksa (Biuret reakcija)
   Pripremamo ga mješanjem 3 stock otopine (moraju biti svježe) u omjeru 100:1:1
   Otopina A: 2% Na_2CO_3 u destiliranoj vodi
   Otopina B: 1% $CuSO_4*5H_2O$ u destiliranoj vodi
   Otopina C: 2% Na-K tartarata u destiliranoj vodi
2. 2 N NaOH
3. 1 N Folin reagens
4. Standardi

Postupak

1. Priređene su standardne otopine BSA u deioniziranoj vodi koncentracija 0, 10, 20, 40 i 80 µg/mL
2. U 0,1 mL standarda ili uzorka je dodano 0,1 mL NaOH koncentracije 2M, otopina je vorteksirana te je ostavljena stajati na sobnoj temperaturi 10 minuta
3. Nakon 10 minuta stajanja, u otopinu je dodano 1 mL reagensa za stvaranje kompleksa, otopina je vorteksirana te ostavljena na sobnoj temperaturi 10 minuta.
4. U otopinu je dodano još 0,1 mL Folin reagensa, otopina je vorteksirana i ostavljena stajati oko pola sata
5. Apsorbancija je određena pri 750 nm

Rezultati

Broj uzoraka i određivanje njihove koncentracije odgovara onima korištenim pri Bradford metodi.



Graf 2: standardni pravac ovisnosti absorbancije o koncentraciji

Uzorci	Koncentracija (µg/mL)
Mađarska (suhi)	29,7
Mađarska (vlažni)	18,68
Obrovac	35,63

Tablica 2: koncentracije uzoraka crvenog mulja

3. Zaključak

U uzorku crvenog mulja sa područja Obrovca i mađarskog grada Ajka metode određivanja i kvantificiranja proteina po Bradford-u i Lowry-ju su pokazale prisutnost proteina. Iako su proteini uspješno ekstrahirani metodom total glomalin extraction, upitno je mogu li se proteini svrstati u tu kategoriju, jer se termin glomalin odnosi na proteine mikoriznih gljivica reda *Glomerales*, a zbog nepostojanja biljaka sa kojima bi mikorizne gljivice bile u mutualističkom odnosu malo je vjerojatno da proteini potječu iz ovakvih gljivica.

Variranja između dobivenih vrijednosti u koncentracijama proteina mogu se pripisati različitoj osjetljivosti korištenih metoda na različite proteine, odnosno aminokiseline. Kolorimetrijska metoda po Lowry-ju je pokazala veće koncentracije proteina nego metoda po Bradfordu. Variranje između dviju metoda ne možemo pripisati organskim spojevima koji reagiraju sa reagensima te daju lažne veće rezultate, kao što su polifenoli koji se nalaze u tlu kao sastavni dio humusa.

4. Literatura:

Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for quantification of migrogram quantities of protein utilising principle of protein dye binding. *Analyt. Biochem.*72:248-254

Filipović I, Lipanović S. 1973. *Opća i anorganska kemija*. Školska knjiga Zagreb

Lowry, O.H. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275

Nannipieri P, Smalla K. 2006. *Nucleic Acids and Protein in Soil*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 468p

Redmile-Gordon MA. 2013. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biology & Biochemistry*. 67:166-173

Walker JM. 2002. *The Protein Protocols Handbook, 2nd Edition*. Humana Press, Totowa, NJ, 1146p

Wright, S.F., Upadhyaya, A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.* 161:575-586

Web:

Web 1:
https://en.wikipedia.org/wiki/Ajka_alumina_plant_accident#/media/File:Hungary_ajka_toxicspill_october9_2010_dgDetail.jpg

Web 2: http://invam.wvu.edu/r/download/165765

http://www.vtssa.edu.rs/download/Kolorimetrija_i_fotometrija.pdf