



RAZISKOVALNA NALOGA

Določanje proteinske vsebnosti v jajčnem beljaku različnih živali

Področje: Kemija ali kemijska tehnologija

Avtor: Žana Grašič

Mentor: prof. Petra Flajnik

Kranj, 2017

Kazalo

Povzetek.....	2
Abstract.....	3
Uvod.....	4
Raziskovalni problem	7
Spremenljivke.....	7
Material	9
Laboratorijska oprema:	9
Snovi:	9
Metoda	10
Varnostni ukrepi.....	11
1. Priprava Bradfordovega reagenta	11
2. Priprava standardne krivulje	12
POSKUS 1 - kalibracija z destilirano vodo.....	13
3. Določanje beljakovin prisotnih na 100g jajčnega beljaka	13
Rezultati.....	15
Rezultati na podlagi umeritvene krivulje z NaOH in destilirano vodo.....	15
Rezultati na podlagi umeritvene krivulje z NaOH in Bradfordovim reagentom.....	20
POSKUS 2 - kalibracija z Bradfordovim reagentom.....	20
Komentar in zaključek.....	23
Viri in literatura	26
Viri slik.....	27

Kazalo slik

Slika 1: Struktura Coomassie Brilliant Blue G-250 barvila (Sigmaaldrich.com, 2016).....	4
Slika 2: Sprememba barve Bradfordovega reagenta iz rjave v modro (En.wikipedia.org, 2016) .	5
Slika 3: Material za pripravo standardnih krivulj in jajčnih vzorcev (Avtorica slike: Žana Grašič)	10
Slika 4: Graf standardne krivulje za Bradfordov reagent pri uporabi kalibracije z 1M NaOH in destilirano vodo.	17
Slika 5: Graf standardne krivulje za Bradfordov reagent pri uporabi kalibracije z 1M NaOH in Bradfordovim reagentom	21
Slika 6: Mase beljakovin prisotnih na 100g jajčnih beljakov	23

Kazalo tabel

Tabela 1: Količine začetne razstopine BSA, ki so potrebne za pripravo razstopin z zahtevanimi koncentracijami BSA in NaOH za določitev standardne krivulje	12
Tabela 2: Mase uporabljenega jajčnega beljaka in razstopine beljaka ter NaOH.....	14
Tabela 3: Masne vrednosti za razstopine beljakov in NaOH in njihove absorpcije pri 595.5 nm	15
Tabela 4: Vsebnost BSA v razstopinah za pripravo standardne krivulje in njihove absorpcijske vrednosti pri 595.5 nm.	16
Tabela 5: Izračunane mase beljakovin prisotnih v 0.5g razstopine jajca in NaOH	18
Tabela 6: Vrednosti mas beljakovin prisotnih na 0.5g razstopine in 100g jajčnega beljaka	19
Tabela 7: Masa beljakovin na 100g jajčnega beljaka	22

Povzetek

Namen te raziskovalne naloge je bila določitev in primerjava vsebnosti beljakovin v jajčnem beljaku. Primerjala sem jajca sedmih živalskih vrst z uporabo Bradfordove metode. Bradfordov reagent sem pripravila z uporabo Coomassie modrega barvila, ki se veže s proteini topnimi v ekstremno kislih okoliščinah. Ko se barvilo v Bradfordovem reagentu veže s proteini v jajčnem beljaku, se tvori kompleks modre barve. Več ionskih in Van der Waalsovih vezi kot nastane, bolj je kompleks moder, kar lahko merimo z uporabo spektrometra. V tem primeru je bila absorbcija izmerjena pri 595.5 nm.

Za določitev neznane količine proteinov sem pripravila dve standardni krivulji: eno z uporabo NaOH in destilirane vode in drugo z uporabo NaOH in Bradfordovega reagenta. Za nadaljno določitev sem uporabila le drugo krivuljo. Za pripravo krivulj je bilo potrebno uporabiti standard Bovine Serum Albumin. Znanim koncentracijam Bovine Serum Albumina sem dodala zahtevano količino reagenta in izmerila absorbcijo. Tako sem dobila standardne krivulje za določitev proteinov v vzorcih beljaka.

Vzorci beljaka sem odtehtala z analitsko tehtnico in jim dodala 1M NaOH, ker v sami destilirani vodi niso bili topni. Ko se je beljak popolnoma razstopil, sem dodala še Bradfordov reagent in izmerila absorbcijo.

Rezultati so pokazali, da 100g kateregakoli jajčnega beljaka vsebuje med 7.32g in 9.97g proteinov. Najmanjšo vsebnost je pokazalo prepeličje jajce, najvišjo pa jajce holandske pritlikave kokoši.

Abstract

The purpose of this investigation was to determine and compare the protein content of egg whites in eggs of different bird kinds. Seven different bird kinds were compared with the use of the Bradford protein assay. Bradford reagent was prepared with the use of Coomassie Brilliant Blue dye, which binds with proteins that are soluble in acidic environment. When the pigment in the Bradford reagent binds to the proteins in egg whites, a blue complex is formed. The more ionic and Van der Waals bonds are made, the more blue the complex is. This can be measured by the use of a spectrophotometer. In this investigation the absorption is measured at 595.5 nm.

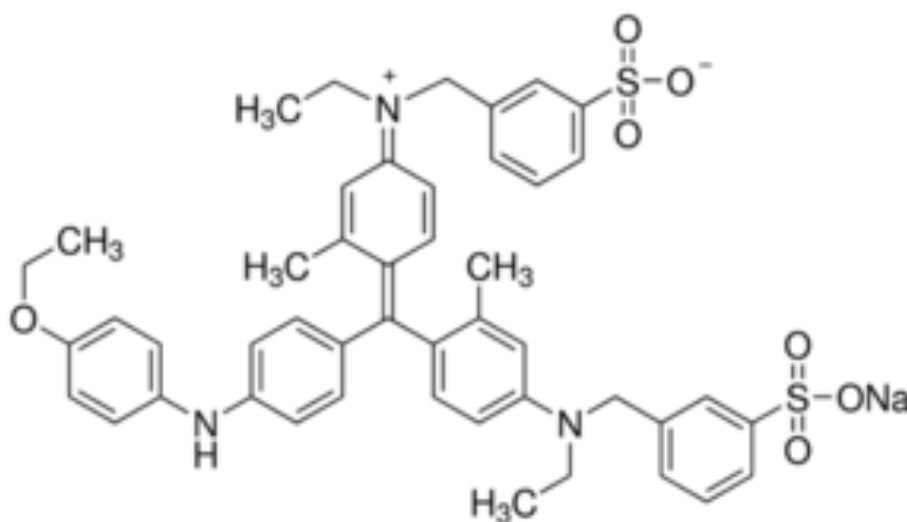
For the determination of protein content, two standard curves were prepared: one with the use of NaOH and distilled water as a calibration method and the second with the use of NaOH and Bradford reagent. For further determination the second mentioned curve was used. It was important to use a standard with a known concentration of proteins for this step of the investigation. Bovine Serum Albumin, was used. The demanded amount of the reagent was added to known concentrations of Bovine Serum Albumin and the absorption was measured at 595.5 nm. That is what gave the standard curves, which are a basis for protein determination in all egg white samples.

The samples were weighted with an analytical balance and they were added 1M NaOH, since they were not soluble in water. When the egg whites dissolved, the Bradford reagent was added and absorption was measured.

The results showed that 100g of any egg white sample contained between 7.32g and 9.97g of proteins. The smallest value was shown in quail egg and the greatest in Holland dwarf chicken egg.

Uvod

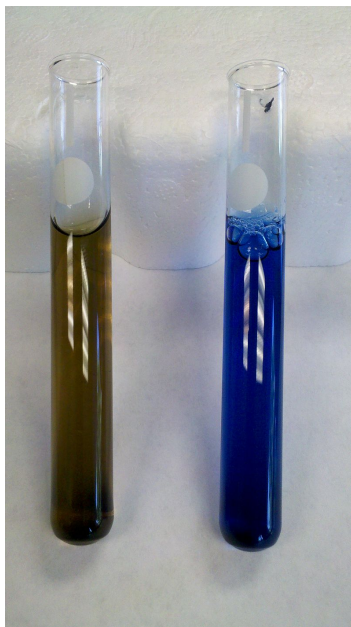
Bradfordov test je spektrofotometrična metoda, ki temelji na zmožnosti vezave Coomassie Brilliant Blue G-250 barvila s proteini v ekstremno kislih pogojih (Thermofisher.com, 2016). Običajno se metoda uporablja za določanje količine proteina, ki je prisoten v nekem neznanem vzorcu. Struktura Coomassie Brilliant Blue G-250 barvila je prikazana na *Sliki 1*:



Slika 1: Struktura Coomassie Brilliant Blue G-250 barvila (Sigmaaldrich.com, 2016)

Bradfordov reagent torej vsebuje barvilo, ki ima v kislih pogojih specifično rjavo barvo, če v vzorcu ni prisotnih proteinov. Metoda temelji na spektralnem premiku barvila od rjave do intenzivne modre barve, če se protein veže nanj. Rjava oblika Bradfordovega reagenta ima največjo absorpcijo pri 465 nm, vendar ko se tvori kompleks Coomassie barvila in proteina, se največja absorpcija raztopine pokaže pri 595.5 nm. To je obenem tudi vrednost, pri kateri se je pri tej metodi merila absorpcija (Thermofisher.com, 2016). Ko je prisoten ta kompleks, se tvorijo Van der Waalsove in ionske vezi med proteini in tem barvilom, kar stabilizira modro oblike te raztopine. (Thermofisher.com, 2016) Zato je število vezi torej merilo za koncentracijo proteinov. Več vezi nastane, bolj intenziven je modri pigment in večja je absorpcija svetlobe pri 595.5 nm.

Ko kompleks nastane, se dokaj hitro tvorijo agregati. Bradfordov reagent in proteinske raztopine moramo zato vedno dobro premešati, preden izmerimo njihovo absorpcijo. (Thermofisher.com, 2016) Sprememba barve barvila je vidna na *Sliki 2*:



Slika 2: Sprememba barve Bradfordovega reagenta iz rjave v modro (En.wikipedia.org, 2016)

Ena od slabosti te metode je, da vsaka prisotnost surfaktanta v vzorcu privede do obarjanja reagenta, kar onemogoči zanesljive meritve absorpcije. (Thermofisher.com, 2016) Naslednja omejitev je, da se z barvilom lahko vežejo le določeni proteini, saj so le-ti dobro topni v teh kislih pogojih. Barvilo se veže predvsem na ostanke arginina in na aromatske aminokisline. (Thermofisher.com, 2016)

Količino v vzorcu prisotnega proteina lahko določimo z uporabo standardne krivulje, ki jo pripravimo iz različno koncentriranih raztopin z znano vsebnostjo proteinov in Bradfordovega reagenta. Kot standard uporabimo Bovine serum albumin (V nadaljevanju BSA), ki je protein, ki se običajno uporablja za določanje koncentracije proteinov v neznanih vzorcih. Ko se Bradfordov reagent veže s proteini, se tvori kompleks modre barve. Večja količina BSA je v vzorcu, bolj intenzivna modra barva se tvori. Na osnovi tega lahko določimo neznane koncentracije proteinov z merjenjem njihove absorpcijske vrednosti in jih primerjamo s tistimi, ki ustrezajo absorpcijam BSA.

Standardna krivulja za Coomassie Brilliant Blue G-250 barvilo se prilega linearni funkciji kjerkoli od 0.0001g do 0.0014g prisotnega proteina v 1 ml vzorca. (Bradford reagent, b.d.) Po tem funkcija sledi eksponentni obliki. Ko je določena absorpcija vzorcev z znano vsebnostjo beljakovin, se enak postopek ponovi na vzorcih z neznanimi vrednostmi proteinov, kar nam da Y-vrednosti (absorpcijske vrednosti), nato pa le še najdemo

ustrezno X-vrednost na pripravljeni standardni krivulji, ki nam pove koncentracijo proteina v vzorcu.

V tej raziskavi se je določala vsebnost beljakovin v jajčnih beljakih različnih živali. Pričakovano je, da se celotna vsebnost beljakovin ne bo pokazala v tem poskusu, saj na dodajanje Bradfordovega reagenta ne bodo reagirali vsi proteini prisotni v jajcih. Kot že omenjeno pod naslovom *Uvod*, se Coomassie Brilliant Blue barvilo veže le na proteine, ki so topni pri zelo kislih pogojih. To pomeni, da ne bi reagirali vsi proteini, ki so prisotni in bi posledično nastala razstopina manj modre barve kot sicer.

Prav tako je pričakovano, da v tej raziskavi ne bo vidne nobene ekstremne vrednosti, ker v pripravljenih razstopinah ni bilo prisotnih nobenih drugih sestavin, ki bi lahko vplivale in dvignile vrednosti absorpcije. Druga predpostavka je, da bodo vse vrednosti nihale okoli 10.90g proteinov v 100g jajčnega beljaka, saj je to približna vsebnost proteinov prisotnih v jajčnih beljakih (Ndb.nal.usda.gov, 2016). Zato je torej pričakovano, da se bo večina proteinov odzvala na dodajanje Bradfordovega reagenta in tvorila modro bravo, ter da bo vrednost le nekoliko nižja kot zavedena vrednost v literaturi.

Raziskovalni problem

V tej raziskovalni nalogi se z Bradfordovo metodo določa količina beljakovin v jajčnih beljakih različnih živalskih vrst. Sedem jajc različnih vrst ptic je bilo vključenih v raziskavo, z namenom, da se ugotovi in primerja njihova vsebnost beljakovin. Raziskovalno vprašanje te raziskave je naslednje: ***Koliko beljakovin, merjeno z Bradfordovo metodo, na 100g beljakov vsebujejo jajca več različnih ptičjih vrst?***

Spremenljivke

- **Neodvisna spremenljivka:** Vrsta ptičjega jajca.
- **Odvisna spremenljivka:** Količina beljakovin prisotna na 100g jajčnega beljaka.
- **Nadzorovane spremenljivke:**
 - Starost jajc: Vsa uporabljena jajca niso bila starejša od pol leta. V starosti so se sigurno, razlikovala, vendar nobeno jajce ni bilo pokvarjeno ali gnilo. To bi posledično lahko vplivalo na koncentracijo proteinov, saj bi se nekateri izmed njih že lahko razgradili v nekaterih izmed starejših jajc.
 - Reja kokoši in jajc: Vsa jajca so bila jajca ptic iz proste reje.
 - Temperatura pri kateri so se jajca shranjevala: Vsa jajca sem na dan poskusa hranila pri sobni temperaturi. Pred tem so bila vsa shranjena v hladilniku pri 8°C. Enaki pogoji, pri katerih so bila jajca shranjena, so zagotovili bolj točno primerjavo koncentracije proteinov. Če bi bila nekatera skladiščena pri izjemno nizkih ali visokih temperaturah, bi lahko nekateri proteini denaturirali, kar bi vodilo do nižje absorpcije svetlobe pri 595.5 nm, saj se ne bi mogli vezati z Bradfordovim reagentom. To bi povzročilo manj intenziven moder pigment zmesi.
 - Uporaba enako pripravljenega Bradfordovega reagenta: Pred poskusom sem pripravila 0.5l Bradfordovega reagenta, ki je bil nato uporabljen skozi celoten eksperimentalni postopek: za umeritvene krivulje ter za določanje proteinov v jajc. Prav tako je bilo zagotovljeno, da je bil Bradfordov reagent filtriran enakokrat in skozi enak filtrirni papir, da je bila zagotovljena enaka količina že obstoječega modrega pigmenta prisotnega pri vseh jajc in tudi umeritvenih standardih. S tem sem se prepričala, da Bradfordov reagent vsebuje enako koncentracijo delcev, ki se bodo vezali s proteini v vsakem delu eksperimenta.

- Uporaba iste kalibracijske krivulje: Kalibracijsko krivuljo sem pripravila iz razstopine BSA in 1M NaOH. Enako kalibracijsko krivuljo sem uporabila za določanje proteinov v vsakem jajcu, saj je bila tako primerjava jajčnih beljakov najbolj jasna ter najbolj natančna.
- Masa jajca uporabljenega pri poskusu: Vsa jajca so bila stehtana z analitsko tehtnico, da se je zagotovila uporaba enakih mas jajčnih beljakov iz vsakega jajca.
- Ločitev beljaka od rumenjaka: V beljaku ni bila prisotna niti majhna količina jajčnega rumenjaka ali jajčnih lupin, kar je bilo zagotovljeno z natančnim ločevanjem. Lupine bi lahko zmotile meritev absorpcije, rumenjak pa prav tako vsebuje nekaj beljakovin, kar bi spremenilo rezultat.
- Filter papir za filtracijo beljaka in NaOH: Enak filtrirni papir je bil uporabljen za vse filtracije, da se je zagotovilo enako propustnost. Zmesi jajčnega beljaka in NaOH so bile enakomerno filtrirane. Beljakom sem dodala zadostno količino 1M NaOH, da je bila količina beljakovin v izbranem vzorcu ravno pravšnja in se prilegala linearnemu delu kalibracijske krivulje. NaOH sem uporabila namesto destilirane vode, ker jajčni beljak v H₂O v preliminarnih testih ni bil topen. To je omogočilo, da so se beljakovine v celoti raztopile in enakomerno porazdelile po celotnem vzorcu.
- Mešanje razstopine jajca in NaOH po dodajanju Bradfordovega reagenta: Vse zmesi sem mešala enako časa in z enako hitrostjo, da so bili vsi vzorci izpostavljeni enakomerni reakciji z Bradfordovim reagentom.
- Čas, v katerem je razstopina jajca in NaOH reagirala z Bradfordovim reagentom: Vse mešanice sem pustila stati za isto časovno obdobje, da je bil čas za nastanek barvnih kompleksov enak. Vzorci so stali 300s±10s.
- Temperatura in svetloba pri kateri je razstopina reagirala: Svetloba je bila konstantna, temperatura je bila okoli 22°C.
- Vrsta uporabljenih kivet: Vse uporabljene kivete so bile istega tipa, s širino 1 cm.
- Suhost in čistost uporabljenih kivet: Vse kivete so bile suhe in obrisane z mehko krpo, če so bile umazane.

Material

Laboratorijska oprema:

- aluminijasta folija,
- analitska tehtnica,
- čaše,
- kivete s premerom 1cm,
- erlenmajerice,
- #0.5 Whatman filtrirni papir,
- lij,
- računalnik,
- pisalo,
- 10ml merilni valj,
- pipetor,
- pipeta,
- plastične posodice,
- plastične skodelice,
- plastične pipete,
- spektrofotometer,
- plastična žlička,
- mešalna paličica,
- 0.5l bučka,
- #3 Whatman filtrirni papir.

Snovi:

- Kemikalije:
 - $0.05\text{g} \pm 0.01\text{g}$ Coomassie Brilliant Blue G-250 barvila,
 - 25ml 95% etanola,
 - 50ml 85% H_3PO_4 ,
 - destilirana voda,
 - 0.9l 1M NaOH,
 - 0.04 g Bovine Serum Albumin-a.
- Jajca:
 - jajce Araucana kokoši,
 - jajce navadne kokoši,
 - račje jajce,
 - jajce holandske pritlikave kokoši,
 - jajce Leghorn kokoši,
 - prepeličje jajce,
 - jajce svilnate kokoši.

Material za pripravo standardnih krivulj in jajčnih vzorcev je prikazan na *Sliki 3*:



Slika 3: Material za pripravo standardnih krivulj in jajčnih vzorcev (Avtorica slike: Žana Grašič)

Metoda

Uporabljena metoda je bila spremenjena po Bradfordovi metodi za določitev proteinov (Caprette, 1995). Najprej sem pripravila Bradfordov reagent, čemur je sledila priprava standardnih krivulj in nazadnje določanje proteinov v neznanih vzorcih jajčnih beljakov. V tem eksperimentu sem uporabila dve različni kalibracijski krivulji. Prva (s kalibracijo z uporabo destilirane vode in 1M NaOH) je dala rezultate, ki so bili precej večji od vseh teoretičnih vrednosti. To je razlog, da je bila uporabljena naslednja kalibracija spektrometra: z Bradfordovim reagentom in raztopino 1M NaOH. Začetne raztopine BSA sem pripravila sveže za vsako kalibracijsko krivuljo.

Varnostni ukrepi

Ta eksperiment je vključeval pripravo Bradfordovega reagenta, ki je zahteval delo s šibko 85% H_3PO_4 kislino in 95% etanolom. Ti dve snovi sta dražljivi za človeško kožo. Iz tega razloga so bile potrebne rokavice in zaščitna obleka. Reakcija med destilirano vodo in kislino je lahko zelo burna. S temi snovmi se je zato ravnalo le v digestoriju. Med tem postopkom so bile uporabljene rokavice, zaščitna obleka, očala in maska. Prav tako je bilo zagotovljeno, da ni bila vsa kislina dodana v vodo in etanol naenkrat ampak postopoma. Intenzivnost reakcije je bila s tem omejena. Ravnanje s pripravljenim Bradfordovim reagentom 1M NaOH je zahtevalo previdnost. Vse kemikalije so bile zavržene po pravilih odlaganja.

1. Priprava Bradfordovega reagenta

Celoten postopek priprave Bradfordovega reagenta je bil izveden v digestoriju.

- 0.05g Coomassie Brilliant Blue G-250 barvila sem odtehtala z analitsko tehtnico v plastični posodici.
- 25ml 95% etanola sem odmerila z merilnim valjem in ga prenesla v 0.5l bučko
- Odtehtano Coomassie Brilliant Blue barvilo sem raztopila v etanolu.
- V bučko sem dodala približno 200ml destilirane vode.
- Z merilnim valjem sem odmerila 50ml 85% H_3PO_4 in postopoma prelila v bučko.
- Destilirana vode sem dodala do 0.5l oznake na merilni bučki.
- To intenzivno modro obarvano raztopino sem premešala in pustili v hladilniku pri 8°C 2 uri.
- V štiri erlenmajerice sem vstavila lij in filter papir za proces filtracije.
- Raztopino iz hladilnika sem filtrirala enkrat preko #3 Whatman filtrirnega papirja in trikrat preko #0.5 Whatman zloženega filtrirnega papirja, saj je ta proces zagotovil najboljši končni rezultat, ki je svetlo-rjava raztopina Bradfordovega reagenta brez vidnih modrih komponent.
- Erlenmajerica z Bradfordovim reagentom je bila zavita v aluminijasto folijo, saj je občutljiv na svetlobo. Shranjen je bil v hladilniku za kasnejšo uporabo. Ko Coomassie

Brilliant Blue barvilo v Bradfordovem reagentu ni vezano na proteine, ima po postopku filtracije rjavo barvo.

2. Priprava standardne krivulje

- 0.0400g BSA sem odtehtala v čašo z analitsko tehtnico ($\pm 0.0001\text{g}$).
- S pipeto sem v čašo na tehtnici dodala toliko 1M NaOH, da je celotna masa BSA in 1M NaOH znašala 40g. Masa BSA na 1g te zmesi je tako znašala 0.0001g. Ta raztopina se v nadaljevanju imenuje začetna raztopina BSA.
- Raztopino sem mešala in pustila stati, dokler se vse BSA ni popolnoma raztopil.
- Vzorce začetne raztopine BSA sem prenesla v ločene čaše, tako da je vsaka izmed njih vsebovala naslednje vrednosti BSA standarda, ki so zbrane v *Tabeli 1*:

Masa BSA v 1g raztopine	Masa začetne raztopine BSA, ki jo je potrebno uporabiti
0.0010g	1.0000g
0.0008g	0.8000g
0.0006g	0.6000g
0.0004g	0.4000g
0.0002g	0.2000g

Tabela 1: Količine začetne raztopine BSA, ki so potrebne za pripravo raztopin z zahtevanimi koncentracijami BSA in NaOH za določitev standardne krivulje

- S pipeto sem v vsako čašo dodala toliko 1M NaOH, da je celotna masa raztopine v vsaki čaši znašala $1.0000\text{g} \pm 0.0001\text{g}$, merjeno z analitsko tehtnico.
- V pripravljene razredčene raztopine BSA sem dodala 25ml predhodno pripravljenega Bradfordovega reagenta s pipeto. Raztopino sem dobro premešala.
- Vse raztopine so stale $300\text{s} \pm 10\text{s}$.

POSKUS 1 - kalibracija z destilirano vodo

- Medtem, ko so razstopine stale, sem z analitsko tehtnico odmerila 1g 1M NaOH in mu dodala 25ml destilirane vode z uporabo pipete in pipetorja.
- Spektrometer sem ogrela in ga umerila s kiveto napolnjeno s pripravljeno rastopino 1M NaOH in destilirano vodo.
- Po kalibraciji sem vzorce iz vsake raztopine BSA-ja in Bradfordovega reagenta iz čaš prenesla v ločene kivete s pomočjo plastične pipete, da so bile napolnjene do treh četrtin.
- Absorpcijo vsake raztopine sem izmerila pri 595.5 nm valovne dolžine z vstavitvijo prozorne strani kivete v smeri svetlobnega snopa, kar je bilo označeno s puščico na uporabljenem Vernierjevem spektrometru.
- Vrednosti absorpcije pri 595.5 nm sem zabeležila za vseh pet standardnih raztopin.
- Linearna funkcija, ki se je tem vrednostim najboljše prilegala je standardna krivulja za Bradfordov reagent s kalibracijo na 1M NaOH in destilirano vodo.

3. Določanje beljakovin prisotnih na 100g jajčnega beljaka

- Vsako jajce sem ločila od rumenjaka in ga shranila v posebni čaši.
- 0.5g jajčnega beljaka vseh vrst sem odtehtala v plastični posodi na analitski tehtnici in mu dodala toliko 1M NaOH, da je celotna masa raztopine dosegla 100g. Vrednosti meritev so zbrane v *Tabeli 2*.

Vrsta jajca	Masa jajčnega beljaka ($\pm 0.0001\text{g}$)	Masa razstopine beljaka in NaOH ($\pm 0.0001\text{g}$)
Prepelica	0.4927g	100.0256g
Svilena kokoš	0.5374g	100.0024g
Leghorn kokoš	0.5078g	100.0254g
Navadna kokoš	0.5492g	100.0187g
Araucana kokoš	0.5458g	100.0520g
Holandska prtilikava kokoš	0.5652g	100.0261g
Raca	0.5074g	100.0004g

Tabela 2: Mase uporabljenega jajčnega beljaka in razstopine beljaka ter NaOH

- Te vzorce sem pustila stati, da so se jajca popolnoma raztopila. Nato sem razstopine filtrirala skozi #0.5 Whatman filtrirni papir.
- Vzorce z maso 0.5g iz vsake raztopine, izmerjene z analitsko tehtnico sem prenesla v ločene čaše.
- Vsaki čaši sem dodala 12.5ml Bradfordovega reagenta z uporabo pipete.
- Vzorce sem močno premešala in pustila stati $300\text{s} \pm 10\text{s}$.
- Spektrofotometer je bil najprej umerjen z 1g 1M NaOH in 25ml destilirane vode, kot je opisano pod naslovom *Priprava standardne krivulje*.
- Vsak raztopino sem prenesla v ločene kivete in izmerila absorpcijo vzorcev pri 595.5 nm.

Rezultati

Rezultati na podlagi umeritvene krivulje z NaOH in destilirano vodo

Vrednosti absorpcij za vsak vzorec jajčnega beljaka na podlagi kalibracije spektrometra z NaOH in destilirano vodo so zbrane v *Tabeli 3*. Napako absorpcijskih vrednosti je zelo težko točno določiti, zato je kot najbolj optimalna rešitev tega problema izbrana 5% relativna napaka. Vrednosti absorpcije vključujejo napake priprave Bradfordovega reagenta, napake razstopin in tudi napake merjenja samih absorpcij. Prav tako je zelo težko natančno določiti vrednost absorpcij, saj se delci v vzorcih stalno premikajo in zato ta vrednost ni fiksna številka.

Vrsta jajca	Masa beljaka ($\pm 0.0001\text{g}$)	Masa beljaka in NaOH ($\pm 0.0001\text{g}$)	Masa 0.5g razstopine beljaka in NaOH ($\pm 0.0001\text{g}$)	Absorpcije pri 595.5nm ($1\pm 5\%$)
Prepelica	0.4927g	100.0256g	0.4997g	1.285
Svilena kokoš	0.5374g	100.0024g	0.5182g	1.346
Leghorn kokoš	0.5078g	100.0254g	0.5282g	1.308
Navadna kokoš	0.5492g	100.0187g	0.5157g	1.371
Araucana kokoš	0.5458g	100.0520g	0.5126g	1.409
Holandska pritlikava kokoš	0.5652g	100.0261g	0.5158g	1.402
Raca	0.5074g	100.0004g	0.5171g	1.367

Tabela 3: Masne vrednosti za razstopine beljakov in NaOH in njihove absorpcije pri 595.5 nm

Z namenom določitve koncentracije beljakovin na 100g jajčnega beljaka, je potrebno vrednosti zbrane v *Tabeli 3* poiskati na grafu standardne krivulje, kalibrirane z 1M NaOH in destilirano vodo. Količine proteinov prisotnih v vzorcih lahko najdemo z vstavitvijo znane absorpcijske vrednosti v enačbo že pripravljene standardne krivulje.

Za pripravo kalibracijske krivulje, je potrebno natančno izračunati maso BSA na 1g začetne raztopine ($m(\text{BSA})_{\text{zač.}}$):

$$m(\text{BSA}) = 0.0401\text{g} \pm 0.0001\text{g} = 0.0401\text{g} (1 \pm 0.25\%)$$

$$m(1\text{M NaOH} + \text{BSA}) = 40.0007\text{g} \pm 0.0001\text{g} = 40.0007\text{g} (1 \pm 0.00025\%)$$

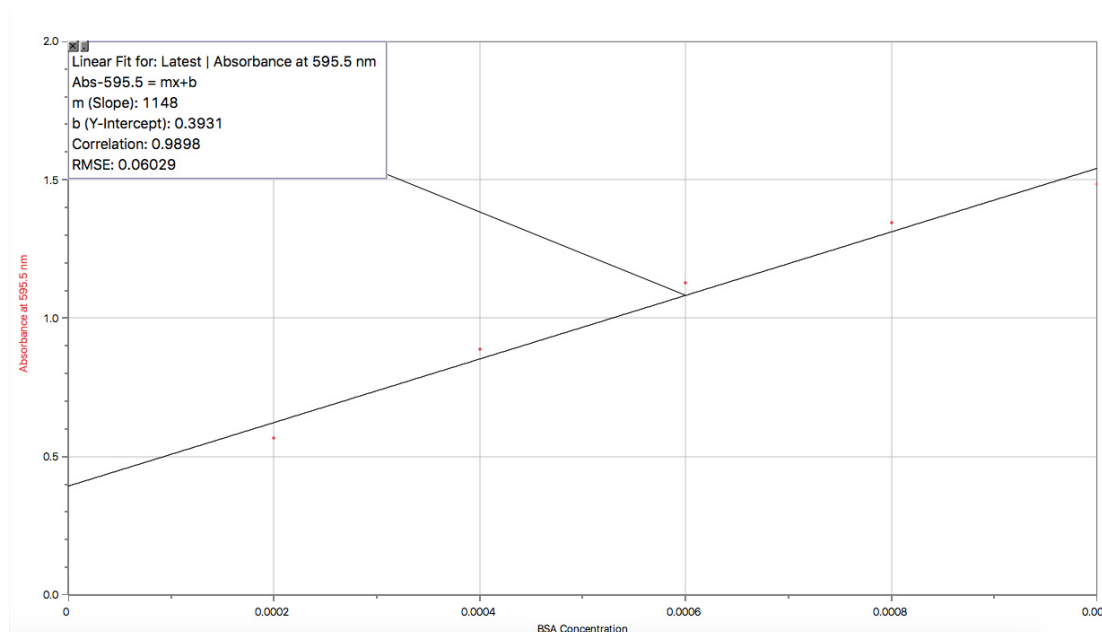
$$m(\text{BSA})_{\text{zač.}} = 0.0010\text{g} (1 \pm 0.25\%)$$

Zdaj, ko je količina prisotnega BSA v 1g začetne raztopine znana ($0.0010\text{g} (1 \pm 0.25\%)$) je mogoče izračunati vse vrednosti različno koncentriranih raztopin pripravljenih v tem poskusu:

Masa uporabljene začetne raztopine BSA in NaOH ($\pm 0.0001\text{g}$)	Skupna masa z dodanim NaOH ($\pm 0.0001\text{g}$)	Masa BSA v 1g raztopine	Absorpcija pri 595.5nm ($1 \pm 5\%$)
1.0338g ($1 \pm 0.0097\%$)	1.0338g ($1 \pm 0.0097\%$)	0.0010g ($1 \pm 0.019\%$)	1.485
0.8233g ($1 \pm 0.011\%$)	1.0058g ($1 \pm 0.0099\%$)	0.0008g ($1 \pm 0.021\%$)	1.346
0.6304g ($1 \pm 0.016\%$)	1.0409g ($1 \pm 0.0096\%$)	0.0006g ($1 \pm 0.026\%$)	1.127
0.4132g ($1 \pm 0.024\%$)	1.0046g ($1 \pm 0.0010\%$)	0.0004g ($1 \pm 0.025\%$)	0.888
0.2020g ($1 \pm 0.050\%$)	1.0158g ($1 \pm 0.0098\%$)	0.0002g ($1 \pm 0.060\%$)	0.566

Tabela 4: Vsebnost BSA v raztopinah za pripravo standardne krivulje in njihove absorpcijske vrednosti pri 595.5 nm.

Linearna funkcija, ki se najbolj prilega vrednostim absorpcije teh raztopin predstavlja standardno krivuljo Bradfordovega reagenta pri kalibraciji z 1M NaOH in destilirano vodo. Funkcija je prikazana na *Sliki 4*.



Slika 4: Graf standardne krivulje za Bradfordov reagent pri uporabi kalibracije z 1M NaOH in destilirano vodo.

Funkcijo lahko zapišemo tudi v obliki $y = a \cdot x + b$

kjer je:

y = absorpcijska vrednost

a = gradient funkcije

x = koncentracija BSA/proteinov

b = absorpcija brez prisotnosti proteinov

Enačba, ki jo Logger Pro izračuna kot najboljši približek vseh vrednosti je naslednja:

$$y = 1148 \cdot x + 0.3931$$

Razvidno je tudi, da imajo pridobljene absorpcijske vrednosti za pripravo standardne krivulje zelo močno pozitivno korelacijo, saj je njihov korelacijski faktor enak 0.9898. Standardna krivulja je bila zato pravilno pripravljena in zanesljivo predvidevala vrednosti. Iz enačbe, ki jo je izračunal Logger Pro, lahko določimo x-vrednosti. Izračun je prikazan v naslednjem primeru, podatki pa so zbrani v *Tabeli 5*. X-vrednost predstavlja maso prisotnih beljakovin v 0.5g razstopine beljaka in NaOH.

Prepeličje jajce: $1.285 = 1148 \cdot x + 0.3931$

$$x = \frac{1.285 (1 \pm 5\%) - 0.3931}{1148}$$

$$x = 0.00078g(1 \pm 5\%)$$

Vrsta jajca	Absorpcije pri 595.5nm (1 ± 5%) (y)	Izračunana masa beljakovin v 0.5g razstopine jajca in NaOH (1 ± 5%) (x)
Prepelica	1.285	0.00078g
Svilena kokoš	1.346	0.00083g
Leghorn kokoš	1.308	0.00080g
Navadna kokoš	1.371	0.00085g
Araucana kokoš	1.409	0.00088g
Holandska pritlikava kokoš	1.402	0.00088g
Raca	1.367	0.00085g

Tabela 5: Izračunane mase beljakovin prisotnih v 0.5g razstopine jajca in NaOH

Zdaj, ko je količina beljakovin v 0.5g razstopine jajca in NaOH znana, je mogoče domnevati, da je ta znesek enak masi proteinov prisotnih v 0.0025g jajčnega beljaka, saj je to količina beljaka, ki je prisotna v 0.5g razstopine beljaka in NaOH. Predpostavimo, da je samo jajčni beljak v mešanici tisti, ki vsebuje beljakovine, saj jih NaOH ne vključuje. Na podlagi tega je mogoče izračunati količino beljakovin prisotnih v 0.5g razstopine beljaka in NaOH in posledično količino prisotnih beljakovin v 100g vsakega jajčnega beljaka. Postopek je prikazan v naslednjem primeru. Izračunane vrednosti so zbrane v *Tabeli 6*.

Izračun mase beljakovin v 0.5 g razstopine beljaka in NaOH:

$$\begin{aligned} \text{Prepeličje jajce} &= \frac{\text{Masa uporabljene raztopine beljaka in NaOH} \cdot \text{Masa beljaka}}{\text{Masa razstopine beljaka in NaOH}} = \\ &= \frac{0.4997g(1 \pm 0.020\%) \cdot 0.4927g(1 \pm 0.020\%)}{100.0256g(1 \pm 0.00010\%)} = \mathbf{0.00246g (1 \pm 0.040\%)} \end{aligned}$$

Izračun beljakovin na 100g jajčnega beljaka:

$$\begin{aligned} \text{Prepeličje jajce} &= \frac{100g \cdot \text{Izračunana masa beljakovin v 0.5g razstopine beljaka in NaOH}}{\text{Izračunana masa beljaka v 0.5g razstopine}} = \\ &= \frac{100g \cdot 0.00078g(1 \pm 5\%)}{0.00246g(1 \pm 0.040\%)} = \mathbf{31.71(1 \pm 5\%)} \end{aligned}$$

Vrsta jajca	Izračunana masa beljaka na 0.5g raztopine	Izračunana masa beljakovin na 100g jajčnega beljaka
Prepelica	0.00246g	31.71g (1±5%)
Svilena kokoš	0.00278g	29.86g (1±5%)
Leghorn kokoš	0.00268g	29.85g (1±5%)
Navadna kokoš	0.00283g	30.04g (1±5%)
Araucana kokoš	0.00280g	31.43g (1±5%)
Holandska pritlikava kokoš	0.00291g	30.24g (1±5%)
Raca	0.00262g	32.44g (1±5%)

Tabela 6: Vrednosti mas beljakovin prisotnih na 0.5g raztopine in 100g jajčnega beljaka

Iz Tabele 6 je razvidno, da vse izračunane mase beljakovin na 100g beljakov daleč presegajo vrednosti, ki so bile pričakovane. Povprečno kokošje jajce vsebuje približno

10.6g (Neznan, 2016) beljakovin v 100g jajčnega beljaka. Izračunane vrednosti so vse trikrat višje.

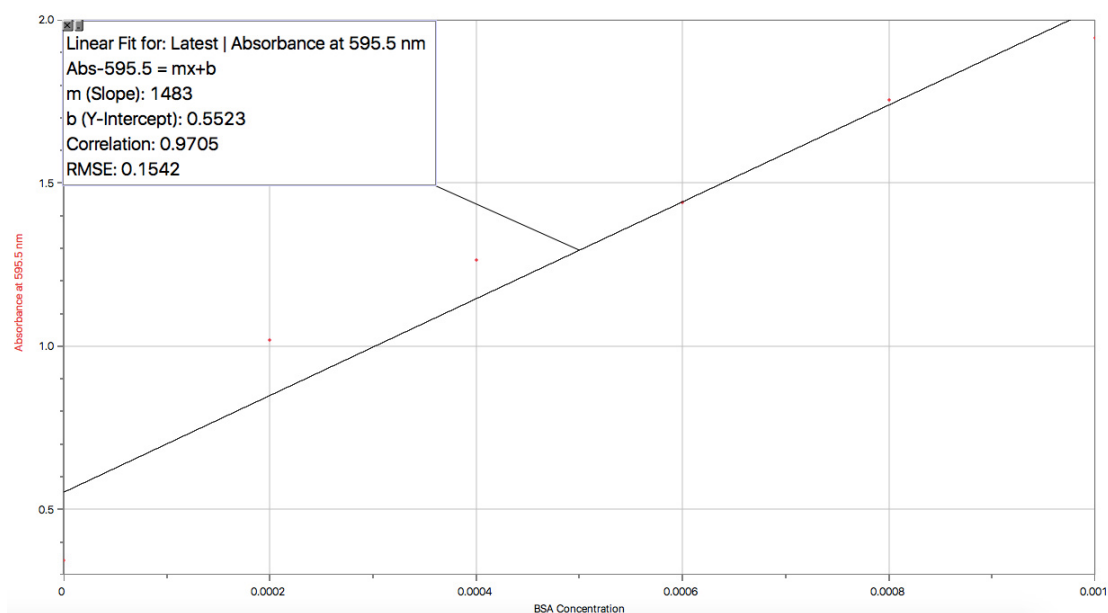
Iz *Slike 4* je razvidno, da je absorpcija raztopine enaka 0.3931, ko je vsebnost beljakovin enaka nič. Lahko trdimo, da Bradfordov reagent še vedno vsebuje nekaj modrih komponent, saj je zadnji filtrirni papir pri pripravi reagenta še vedno ujel številne modre delce, kar nakazuje, da so nekateri modri pigmenti še vedno prisotni v reagentu. Če Bradfordov reagent res vsebuje nekaj modrih delcev, je lahko njegova absorpcija pri 595.5 nm valovne dolžine (brez prisotnih beljakovin v vzorcu) morda celo nekoliko višja kot pri kalibraciji z NaOH in destilirani vodi. Če ta izjava drži, bi bila vrednost absorpcije za zmes brez proteinov večja od 0.3931 in zato se na tem mestu zdi primerno, da se spektrofotometer kalibrira z Bradfordovim reagentom in 1M NaOH, kar je prikazano pod naslovom *POSKUS 2 – kalibracija z Bradfordovim reagentom in NaOH*. Da bi izključili učinek modrih komponent, ki so prisotne v pripravljenem Bradfordovem reagentu je pripravljena druga kalibracijska krivulja. Tokrat je bila pripravljena s kalibracijo z NaOH in Bradfordovim reagentom.

Rezultati na podlagi umeritvene krivulje z NaOH in Bradfordovim reagentom

POSKUS 2 - kalibracija z Bradfordovim reagentom

- Za POSKUS 2 je bil spektrofotometer ponovno umerjen za pripravo druge umeritvene krivulje z uporabo 1g 1M NaOH, odmerjenega z analitsko tehtnico in 25ml pripravljenega Bradfordovega reagenta.
- Kiveto sem po 5 minutah inkubacije pri sobni temperaturi napolnila z raztopino NaOH in Bradfordovega reagenta.
- Izmerila sem absorpcijo vseh 5 sveže pripravljenih standardnih raztopin pri valovni dolžini 595.5 nm. Standardne raztopine sem pripravila iz nove, sveže začetne raztopine BSA.
- Linearni približek teh vrednosti je standardna krivulja za Bradfordov reagent pri kalibraciji z uporabo 1M NaOH in Bradfordovega reagenta.

Ponovno sem pripravila graf standardne krivulje in nove posnetke absorpcij razstopin beljaka in NaOH, tokrat s kalibracijo z NaOH in Bradfordovim reagentom. Standardna krivulja je razvidna iz *Slike 5*:



Slika 5: Graf standardne krivulje za Bradfordov reagent pri uporabi kalibracije z 1M NaOH in Bradfordovim reagentom

Ta standardna krivulja ima novo enačbo:

$$y = 1170 \cdot x + 0.7820$$

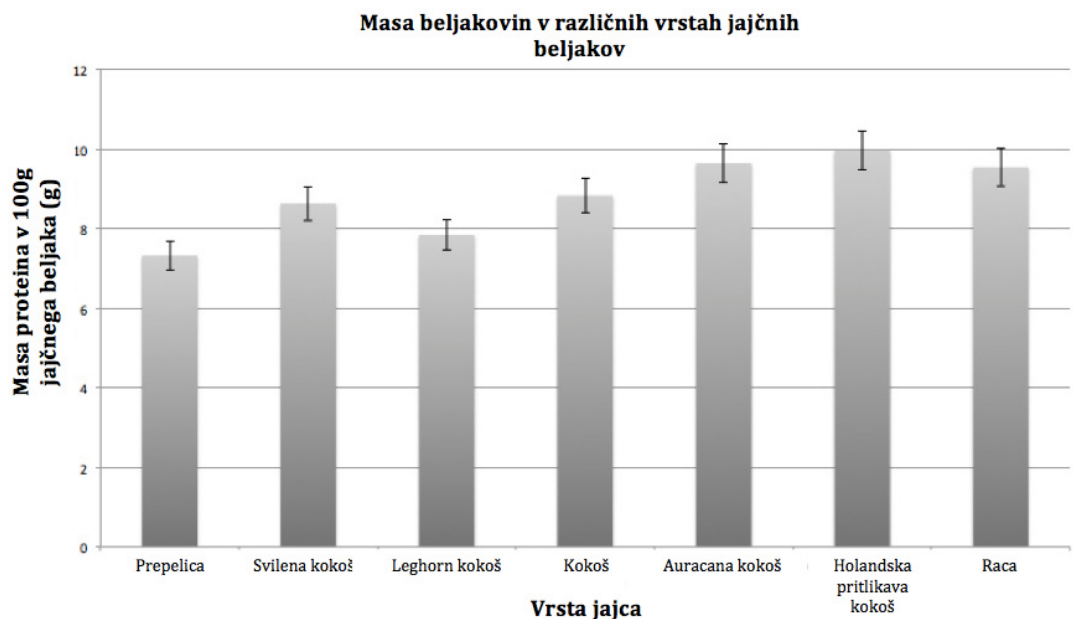
Faktor korelacije še vedno kaže veliko natančnost krivulje, ker je njegova vrednost le nekoliko nižja od vrednosti 1, in sicer 0.9705. Eksperimentalne vrednosti za absorpcijo se vstavijo v enačbo (y) in nato lahko izračunamo maso beljakovin (x) v vzorcih 0.0025g jajčnih beljakov ter posledično maso beljakovin v 100g jajčnih beljakov, kot pod naslovom *Rezultati na podlagi umeritvene krivulje z NaOH in destilirano vodo*. Isti vzorci so bili uporabljeni z obema kalibracijama. Vrednosti so zbrane v *Tabeli 7*.

Vrsta jajca	Absorpcije pri 595.5nm (1 ± 5%)	Količina beljakovin v 0.0025g jajčnega beljaka	Količina beljakovin na 100g beljaka
Prepelica	0.996	0.00018g (1 ± 0.100%)	7.32g (1 ± 5%)
Svilena kokoš	1.061	0.00024g (1 ± 0.094%)	8.63g (1 ± 5%)
Leghorn kokoš	1.026	0.00021g (1 ± 0.097%)	7.84g (1 ± 5%)
Navadna kokoš	1.069	0.00025g (1 ± 0.094%)	8.83g (1 ± 5%)
Araucana kokoš	1.100	0.00027g (1 ± 0.091%)	9.64g (1 ± 5%)
Holandska pritlikava kokoš	1.123	0.00029g (1 ± 0.089%)	9.97g (1 ± 5%)
Raca	1.072	0.00025g (1 ± 0.093%)	9.54g (1 ± 5%)

Tabela 7: Masa beljakovin na 100g jajčnega beljaka

Analiza rezultatov

Rezultati, ki temeljijo na dveh različnih kalibracijskih krivuljah so pokazali bistveno drugačne rezultate. Metoda priprave standardne krivulje pri kalibraciji z NaOH in Bradfordovim reagentom daje rezultate, ki so veliko bližje teoretičnim vrednostim, kot pri kalibraciji z vodo. To lahko pripišemo številnim modrim pigmentom, ki so absorbirali svetlobo pri valovni dolžini 595.5 nm, ker so bili še vedno prisotni v pripravljenem Bradfordovem reagentu. Uporaba NaOH in Bradfordovega reagenta za metodo kalibracije izključuje učinek teh komponent. V ta namen se bodo upoštevali le rezultati, pridobljeni na tak način. Rezultati so zbrani in predstavljeni na *Sliki 6*:



Slika 6: Mase beljakovin prisotnih na 100g jajčnih beljakov

- Jajce holandske pritlikave kokoši vsebuje največ beljakovin, kar je 9.97g. Najmanj beljakovin je prisotnih v prepeličjem jajcu, in sicer 7.32g.
- Račje jajce je bilo najstarejše, vendar njegova starost ni vplivala na vsebnost beljakovin v jajčnem beljaku, saj njegova vrednost ne odstopa drastično od ostalih.
- Vsa kokošja jajca vsebujejo več beljakovin kot prepeličja, vendar imajo v povprečju precej podobne vsebnosti beljakovin kot račje jajce.
- Ti rezultati so ujemajo z napovedmi in hipotezami.

Komentar in zaključek

Bradfordov test za določanje proteinske vsebnosti je dal rezultate, ki so zanesljivi le, če je spektrometer umerjen z 1M NaOH in Bradfordovim reagentom. Metoda je v vzorcih pokazala od 7.32g do 9.97g beljakovin na 100g jajčnih beljakov, kar je vidno na *Sliki 6*. To potrjuje hipotezo, ki je bila postavljena na začetku, ker nobena vrednost ni ekstremno visoka, saj so vse nihale nekje okoli 10.90g beljakovin na 100g jajčnih beljakov (Ndb.nal.usda.gov, 2016). Metoda da zelo natančne rezultate in tudi točnost eksperimenta je visoka, kar pomeni, da so se skoraj vse, če ne vse, beljakovine odzvale na dodajanje

Bradfordovega reagenta. To posledično pomeni, da obstaja visoka vsebnost snovi kot so ostanki arginina in aromatske aminokisline prisotnih v jajčnih beljakih. Ta metoda je torej zelo uporabna za določanje vsebnosti beljakovin v jajčnih beljakih.

Eksperiment je pokazal, da je izbira kalibracijske krivulje ključnega pomena pri določanju neznanih vrednosti beljakovin, saj Bradfordov reagent še vedno vključuje modre komponente, ki so se tudi videle med procesom filtracije, kar pa je močno spremenilo rezultate. Ta omejitev je izključena z uporabo pravilnega umerjanja. Kljub temu, da so ti rezultati zelo primerljivi z vrednostmi iz literature, še vedno obstaja nekaj izboljšav in omejitev, ki bi se jim lahko izognili in izboljšali eksperiment.

Prva omejitev je priprava Bradfordovega reagenta. Bilo je nemogoče, da bi s procesom filtracije iz reagenta izločila vse modre pigmente, s čimer bi bila njegova absorpcija v okolju brez beljakovin enaka nič. V preliminarnem preizkusu sem Bradfordov reagent prefiltrirala 23-krat, vendar so bile na končnem filtrirnem papriju še vedno vidne modre komponente. Količina teh modrih komponent se niti ni vidno zmanjšala od petnajste filtracije naprej. To bi lahko izboljšali z gostejšim filtrirnim papirjem ali morda preprosto z uporabo že pripravljenega Bradfordovega reagenta, kar bi imelo za posledico tudi veliko manj zapletov pri umerjanju.

Naslednja omejitev te metode je, da z uporabo Bradfordovega testa niso pokazani vsi proteini prisotni v vzorcu, saj se barvilo v reagentu ne veže na vse vrste proteinov, ampak zgolj nekatere (predvsem argininove ostanke in aromatske aminokisline). Rezultati so zato nekoliko nižji.

Druga predpostavka je bila, da je standardna mešanica proteinov BSA sestavljena samo iz beljakovin in nobene druge snovi, kot tudi, da vsebuje večinoma take beljakovine, ki so podobne tistim, ki so prisotne v jajčnih beljakih. To je dopuščalo predpostavko, da se oboji odzovejo primerljivo. Predpostavlja se, da je bil čas potreben, da so se proteini vezali na Coomassie Brilliant Blue barvilo enak za standardne raztopine BSA in za jajčne beljake, zato je bila absorpcija v obeh primerih izmerjena po enakem času od dodajanja Bradfordovega reagenta.

Predpostavljeno je bilo tudi, da se celoten BSA raztopi v začetni zmesi. Čeprav se je raztapljal dokler ni bilo več opaznih delcev BSA, gotovo ni bil enakomerno porazdeljen po celotni razstopini.

Pri uporabi BSA kot standarda, je potrebno upoštevati tudi dejstvo, da obstaja še vrsto drugačnih in različnih standardov, ki se lahko uporabljajo za pripravo standardne krivulje. Znano je, da se BSA pretirano odzove na dodajanje Bradfordovega reagenta, kar vodi k povišani absorpcijski vrednosti za določeno koncentracijo proteina (Caprette, 1995). To bi lahko povzročilo nižje deleže beljakovin prisotnih v jajčnih beljakih. Temu bi se lahko izognili z uporabo drugačenega standarda, morda Bovine Gamma Globulin-a, ki z uporabo Bradfordovega reagenta pokaže bolj realno vsebnost beljakovin (QuickStart™ Bradford Protein Assay, 2016).

Problem predstavlja tudi standardna krivulja Coomassie Brilliant Blue G-250 barvila prisotnega v Bradfordovem reagentu, saj je linearna samo v manjšem razponu koncentracije in se kasneje prilega obliki eksponentne funkcije. Krivulja je linearna od 0.0001g do 0.0014g beljakovin v vzorcu, tako da se domneva, da je območje, v katerem so se nahajali vzorci z beljakovinami v delu, v katerem je bila standardna krivulja še vedno linearna.

Kot rešitev za sistematično napako spektrofotometra se bi zdelo primerno, da bi se absorpcija merila daljše časovno obdobje in kasneje bi lahko izračunali povprečje vseh vrednosti absorpcij za vsak posamezen vzorec beljaka, saj se delci v tekočem vzorcu konstantno premikajo in posledično vrednost absorpcije ni določeno fiksno število.

Za nadaljne preiskave bi se zdelo smiselno preučevati tudi vpliv reje na vsebnost beljakovin v jajčnem beljaku. Zanimivo bi bilo videti, če se vsebnost beljakovin razlikuje glede na rejo ptic (prosta, baterijska ali organska reja). Drug vidik, ki bi ga lahko raziskovali je tudi hrana, s katero ki so ptice krmijo in če le-ta vpliva na vsebnost beljakovin v jajčnem beljaku.

Viri in literatura

- Neznani, (2016). [spletni] Dosegljivo na: <https://www.fatsecret.com/calories-nutrition/usda/egg-white?portionid=56524&portionamount=100.000> [Pridobljeno 20 Nov. 2016].
- Bradford reagent. (b.d). 1st ed. [eknjiga] Sigma, p.1. Dosegljivo na: http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/bc4993/instruc/bradford.pdf [Pridobljeno 20 Dec. 2016].
- Caprette, D. (1995). *Protein determination by the Bradford method*. [spletni] Ruf.rice.edu. Dosegljivo na: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html> [Pridobljeno 19 Nov. 2016].
- Ndb.nal.usda.gov. (2016). *Food Composition Databases Show Foods*. [spletni] Dosegljivo na: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/113?fgcd=&manu=&facet=&format=&count=&max=50&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=01124&ds=&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=> [Pridobljeno 20 Jan. 2017].
- plotly. (2016). *Visualize Data, Together*. [spletni] Dosegljivo na: <https://plot.ly> [Pridobljeno 20 Nov. 2016].
- QuickStart™ Bradford Protein Assay. (2016). 1st ed. [eknjiga] Bio-Rad, pp.5,6. Dosegljivo na: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf> [Pridobljeno 20 Nov. 2016].
- ThermoFisher.com. (2015). *Chemistry of Protein Assays | Thermo Fisher Scientific*. [spletni] Dosegljivo na: <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html#/legacy=www.piercenet.com> [Pridobljeno 20 Nov. 2016].

Viri slik

- Sigmaaldrich.com (2016) Slika 1: Struktura Coomassie Brilliant Blue G-250 barvila [skica]
- En.wikipedia.org (2016) Slika 2: Sprememba barve Bradfordovega reagenta iz rjave v modro [slika]
- Grašič, Ž. (2016) Slika 3: Material za pripravo standardnih krivulj in jajčnih vzorcev [slika] Kranj, Slovenija
- Grašič, Ž. (2016) Slika 4: Graf standardne krivulje za Bradfordov reagent pri uporabi kalibracije z 1M NaOH in destilirano vodo. [graf] Kranj, Slovenija
- Grašič, Ž. (2016) Slika 5: Graf standardne krivulje za Bradfordov reagent pri uporabi kalibracije z 1M NaOH in Bradfordovim reagentom [graf] Kranj, Slovenija
- Grašič, Ž. (2016) Slika 6: Graf 3: Eksperimentalne vrednosti za maso beljakovin prisotnih v 100 g jajčnih beljakov [graf] Kranj, Slovenija