

# Primjena različitih metoda u određivanju koncentracije proteina u biološkom uzorku

---

**Borovac, Sara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:267390>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sara Borovac

PRIMJENA RAZLIČITIH METODA U ODREĐIVANJU KONCENTRACIJE PROTEINA  
U BIOLOŠKOM UZORKU

Završni rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sara Borovac

PRIMJENA RAZLIČITIH METODA U ODREĐIVANJU KONCENTRACIJE PROTEINA  
U BIOLOŠKOM UZORKU

Završni rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: doc. dr. sc. Sunčica Buljević, dipl. sanit. ing.

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_, na Sveučilištu u Rijeci, Medicinski fakultet, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Dijana Detel, dr. med.
2. izv. prof. dr. sc. Slađana Bursać, dipl. sanit. ing
3. doc. dr. sc. Sunčica Buljević, dipl. sanit. ing.

Rad ima 32 stranice, 16 slika i 24 literaturna navoda.

## SAŽETAK

Proteini su molekule bitne za strukturu, funkciju i regulaciju gotovo svih živih organizama. To su makromolekule sastavljene od aminokiselina koje su povezane peptidnim vezama u polipeptidne lance koji se savijaju u specifičnu trodimenzionalnu strukturu kako bi stvorili funkcionalne proteine. Određivanje koncentracije proteina u biološkim uzorcima ključno je za razumijevanje bioloških procesa, u dijagnostičke svrhe te za terapiju raznih bolesti. Koncentracija određenih proteina van referentnih vrijednosti može biti povezana sa specifičnim bolestima ili stanjima. Kvantifikacija ukupnih proteina u uzorku često je prvi korak u kompleksnijim analizama koje zatim služe boljem razumijevanju bioloških funkcija proteina i samim time boljem liječenju. Cilj ovog istraživanja bio je utječe li primjena različitih analitičkih metoda na vrijednost koncentracije proteina u biološkim uzorcima tkiva i seruma.

Koncentracija ukupnih proteina određena je u uzorcima mozga, debeloga crijeva i seruma miša soja C57BL/6 pomoću 4 metode: metode bicinkoninskom kiselinom (engl. *bicinchoninic acid assay*, BCA), bromfenol plavo, Bradford i biuret metode. Uslijed interakcije neke od komponenti korištenog reagensa i proteina iz uzorka kod svih navedenih metoda, dolazi do promjene apsorpcije svjetlosti u uzorcima koja se potom mjeri pomoću spektrofotometra.

Statistička analiza pokazala je kako se rezultati dobiveni Bradford metodom razlikuju od ostale tri metode u sve tri vrste uzorka, dok između BCA, bromfenol plavo i biuret metode nema statistički značajne razlike niti u jednom uzorku.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je za određivanje koncentracije proteina u mišjem serumu, mozgu i crijevu prihvatljivo koristiti BCA, bromfenol plavo ili biuret metodu. Odabir metode ovisit će o cilju istraživanja, osjetljivosti, vrsti i količini uzorka te raspoloživim resursima. Iz ovog se istraživanja može zaključiti da kombinacija više metoda osigurava pouzdaniju karakterizaciju proteina u biološkim uzorcima. Također je bitno paziti na pripremu, starost i održavanje kemikalija i uvjete pohrane bioloških uzorka kako ne bi došlo do neispravnih rezultata.

**Ključne riječi:** Proteini, koncentracija, BCA, Bradford, Bromfenol plavo, Biuret

## SUMMARY

Proteins are molecules essential for the structure, function and regulation of almost all living organisms. These macromolecules are composed of amino acids connected by peptide bonds to form polypeptide chains that bend into a specific three-dimensional structure to create functional proteins. Determination of protein concentration in biological samples is crucial for understanding biological processes, for diagnostic purposes, and for the therapy of various diseases. The concentration of certain proteins outside the reference values may be associated with certain diseases or conditions. Quantification of total proteins in a sample is often the first step toward more complex analyses that then serve to better understand the biological functions of proteins and thus enable better treatment. The aim of this study was to determine whether the use of different analytical methods will affect the obtained value of protein concentration in biological tissue and serum samples. The concentration of total proteins was determined in brain, colon, and serum samples of C57BL/6 mice using four different approaches: bicinchoninic acid assay (BCA), bromphenol blue, Bradford and biuret methods. All of the aforementioned methods rely on the change in light absorption in the samples due to the interaction between the components of the reagent used and the protein of the sample. The light absorption change is then measured spectrophotometrically.

Statistical analysis showed that the results obtained by the Bradford method differed from those obtained by the other three methods for all three sample types, while there were no statistically significant differences between the BCA, the bromophenol blue, and the biuret method for any of the analyzed samples.

According to our results, it can be concluded that the use of the BCA, bromophenol blue or biuret method for the determination of protein concentration in mouse serum, brain and intestine is an acceptable approach. The choice of the method used depends on the research objective, sensitivity, type and amount of the sample, as well as available resources. In evaluating the results of this study, it can be deduced that the combination of multiple methods provides more reliable characterization of proteins in biological samples. It is also important to pay attention to the freshness and maintenance of the prepared chemicals, as well as storage conditions of the biological samples to avoid false results.

**Keywords:** Proteins, concentration, BCA, Bradford, Bromphenol blue, Biuret

## Sadržaj

SAŽETAK .....	III
SUMMARY .....	IV
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Proteini.....	1
1.2. Enzimi .....	4
1.3. Proteini u dijagnostici.....	4
1.4. Proteini seruma .....	5
1.5. Proteini crijeva .....	6
1.6. Proteini mozga.....	7
<b>1.7. METODE Kvantifikacije proteina.....</b>	<b>7</b>
1.7.1 Biuret metoda .....	7
1.7.2. Bradford metoda.....	8
1.7.3. BCA metoda .....	9
1.7.4. Bromfenol plavo metoda .....	10
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE RADA .....</b>	<b>13</b>
3.1. MATERIJALI .....	13
3.1.1. Laboratorijski pribor.....	13
3.1.2. Kemikalije .....	13
3.1.3. Biološki materijal.....	13
3.2. METODE RADA.....	14
3.2.1. Homogenizacija .....	14
3.2.2. BCA metoda.....	14
3.2.3. Biuret metoda .....	16
3.2.4. Bromfenol plavo.....	17
3.2.5. Bradford metoda.....	18

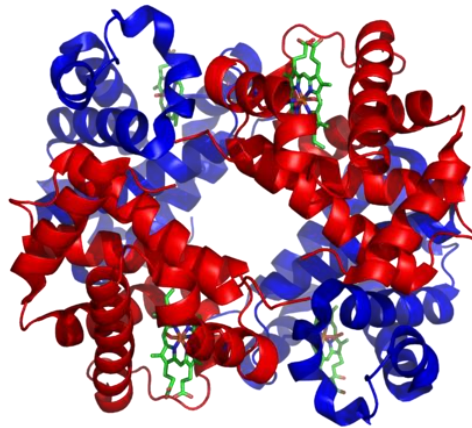
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije proteina u crijevima miša</b> .....	<b>19</b>
<b>4.2. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije proteina u mozgu miša</b> .....	<b>20</b>
<b>4.3. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije proteina u serumu miša</b> .....	<b>21</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>22</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>24</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>25</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>27</b>
<b>9. PRILOZI</b> .....	<b>28</b>



# 1. UVOD

## 1.1. Proteini

Proteini su molekule neophodne za strukturu, funkciju i regulaciju gotovo svih živih organizama (1). To su makromolekule sastavljene od aminokiselina, organskih spojeva koji sadrže amino skupinu ( $-\text{NH}_2$ ) i karboksilnu skupinu ( $-\text{COOH}$ ). Aminokiseline su povezane peptidnim vezama i tvore polipeptidne lance koji se savijaju u specifičnu trodimenzionalnu strukturu kako bi stvorili funkcionalne proteine (2). Ime protein (grč. *proteios* = zauzimanje prvo mjesto) u biokemiju je uveo Berzelius 1840. godine (3). Raznolikost proteina proizlazi iz 20 različitih aminokiselina koje se mogu kombinirati u različitim sekvencama (1). Svaka aminokiselina ima jedinstven bočni lanac koji određuje njezina kemijska svojstva. Ta svojstva utječu na način na koji aminokiseline međusobno djeluju sa svojim okolišem, u konačnici oblikujući strukturu i funkciju proteina (2). Proteini se mogu podijeliti u različite skupine na temelju njihovih morfoloških i funkcionalnih karakteristika pa se tako razlikuju globularni i fibrilarni proteini. Globularni proteini imaju sferni ili globularni oblik. Karakterizira ih kompaktna i naborana struktura bogata hidrofiličnim aminokiselinskim ostacima što ih čini dobro topljivim u vodi. Njihova uloga uglavnom je regulacijska te u ovu skupinu ubrajamo proteine krvne plazme, enzime, hormone i protutijela (2, 3).

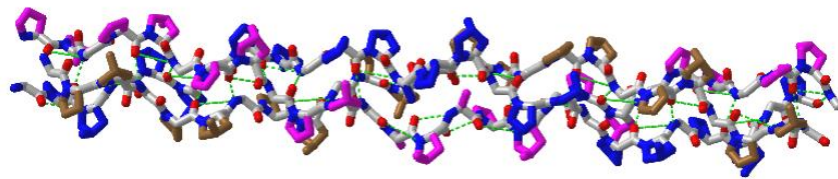


Slika 1. Struktura globularnih proteina

([https://sh.wikipedia.org/wiki/Globularni\\_protein](https://sh.wikipedia.org/wiki/Globularni_protein))

Fibrilarni ili vlaknasti proteini imaju pravilnu građu nitaste strukture. Ti su proteini obično netopljivi u vodi te većinom imaju strukturnu ulogu u stanicama i tkivima. U ovu skupinu

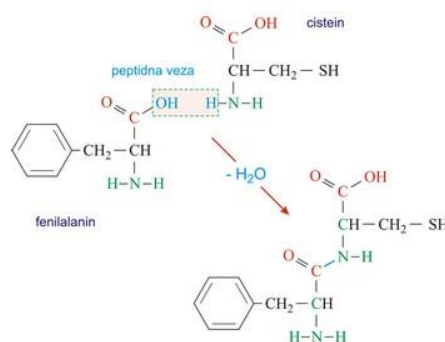
spadaju kolagen, aktin i miozin (3). Kolagen je jedan od najpoznatijih fibrilarnih proteina. Ima ključnu ulogu u održavanju strukture i čvrstoće vezivnog tkiva u tijelu, kao što su koža, kosti, hrskavice i krvne žile. Sastoji se od dugih tankih vlakana koja se obično grupiraju u snopove ili vlaknaste mreže. Ovaj fibrilarni oblik omogućuje kolagenu da pruža mehaničku podršku i čvrstoću tkivima. Kolagen je bogat aminokiselinama prolinom, glicinom i hidroksiprolinom. Ove aminokiseline omogućavaju stvaranje karakteristične trostruke spiralne strukture poznate kao tropokolagen. Promjene u strukturi i količini kolagena mogu dovesti do starenja kože, smanjenja elastičnosti i raznih oboljenja kao što su osteoartritis i fibroza (2).



Slika 2. Struktura fibrilarnih proteina

(<https://structure.ncbi.nlm.nih.gov/icn3d/share.html?TCrji1wPhekypJtc6>)

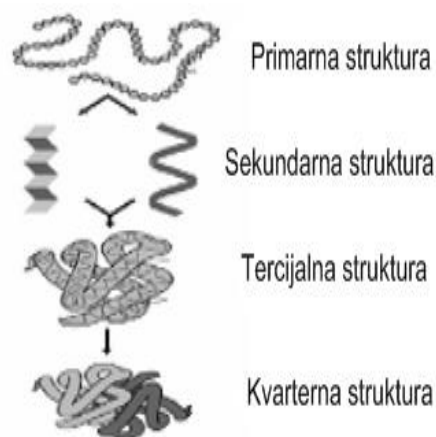
Peptidna veza je kovalentna kemijska veza kojom se aminokiseline međusobno povezuju. Veza se formira između karboksilne grupe jedne aminokiseline i amino grupe druge aminokiseline, uz oslobađanje molekule vode. Kada se više aminokiselina poveže na ovaj način, stvara se polipeptidni lanac. Struktura peptidne veze je planarna s atomima ugljika i dušika u istoj ravnini. Takva veza je rezultat dijeljenja elektronskih parova između atoma i djelomične dvostruke veze između atoma. Djelomična dvostruka veza čini peptidnu vezu otpornom na rotaciju što ograničava konformaciju polipeptidnog lanca (2).



Slika 3. Prikaz peptidne veze

(<https://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr=peptide+bond>)

Proteini imaju nekoliko strukturnih razina koje pridonose njihovom ukupnom obliku, stabilnosti i funkciji (2). Primarna struktura proteina odnosi se na linearni niz aminokiselina koje čine proteinski lanac. Određena je redoslijedom i brojem aminokiselina koji je kodiran u DNA sekvenci gena koji određuje protein (1, 2). Sekundarna struktura opisuje nabiranje kratkih susjednih dijelova polipeptidnog lanca. Dvije najčešće vrste sekundarne strukture su alfa uzvojnice i beta nabrane ploče. U alfa uzvojnici, proteinski lanac tvori spiralnu strukturu stabiliziranu vodikovim vezama između karbonilnog kisika jedne aminokiseline i amidnog vodika aminokiseline udaljene za četiri mjesta. Puni okret sadržava približno 3,6 aminokiselinskih ostataka (2). Beta nabrane ploče čine cik-cak ili naborane oblike kod kojih je lanac skoro cijeli izdužen. Također su stabilizirane vodikovim vezama, između karbonilnog kisika jedne aminokiseline i amidnog vodika druge, između različitih polipeptidnih lanaca (2). Tercijarna struktura odnosi se na ukupnu trodimenzionalnu konformaciju cijele proteinske molekule. Određena je interakcijama i preklapanjem sekundarnih strukturnih elemenata, kao i interakcijama između bočnih lanaca aminokiselina. Ove interakcije uključuju vodikove veze, disulfidne veze, hidrofobne interakcije, ionske interakcije i van der Waalove sile. Tercijarna struktura daje proteinu njegov jedinstveni oblik i ima važnu ulogu u određivanju njegove funkcije (2). Kvarterna struktura opisuje proteine koji su sastavljeni od više podjedinica te njihov raspored u prostoru i interakcije između njih. Ukoliko se protein sastoji od jedne podjedinice, tada se on naziva monomernim proteinom, a ako je građen od više njih, tada je to oligomerni protein. Podjedinice unutar oligomernih proteina mogu biti identične (homomerne) ili različite (heteromerne) (2).



Slika 4. Strukturni oblici proteina

(<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/peptidi-proteini>)

## 1.2. Enzimi

Enzimi su skupina proteina koji djeluju kao biološki katalizatori. Prema vrsti reakcije koju kataliziraju, podijeljeni su u oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Osnovne karakteristike enzima uključuju specifičnost, katalitičku funkciju i regulaciju aktivnosti. Prema specifičnosti enzima u odnosu na supstrat, enzimi mogu biti visoko specifični (provode reakciju samo s točno određenim supstratom), manje specifični (provode reakciju s više sličnih supstrata) i nisko specifični (provode reakciju bez obzira na vrstu supstrata). Enzimi također smanjuju energiju aktivacije i tako ubrzavaju kemijske reakcije. Enzimsku aktivnost strogo je regulirana kako bi se održala ravnoteža u organizmu. Prva razina regulacije je genska i uključuje promjenu transkripcijske aktivnosti gena za taj enzim, razgradnju mRNA enzima ili regulaciju post-translacijskih promjena (npr. aktivaciju neaktivnih oblika enzima – zimogena). Druga razina regulacije odnosi se na mijenjanje aktivnosti postojećih enzima što uključuje inhibiciju (smanjenje enzimske aktivnosti) ili aktivaciju (povećanje aktivnosti). Regulacija aktivnosti postiže se kovalentnom modifikacijom (najčešće fosforilacijom), alosteričkom regulacijom, inhibicijom produktom ili reguliranjem dostupnosti supstrata (2). Veći dio enzima zastupljen je u svim ili u velikom broju tkiva, a zbog prisutnih razlika u nekim kemijskim ili fizikalnim osobinama tkiva, neki enzimi postoje u formi izoenzima koji imaju velik dijagnostički značaj. To su enzimi koji kataliziraju istu kemijsku reakciju, ali potječu od različitih gena te stoga imaju različitu primarnu strukturu i nalaze se u različitim tkivima. Neki enzimi zahtijevaju prisutnost molekula koje djeluju kao kosupstrati te time omogućuju enzimsku kataliziranu reakciju. Te molekule zovu se kofaktori, a mogu biti anorganskog (ioni metala) ili organskog porijekla (koenzimi) (2, 6).

## 1.3. Proteini u dijagnostici

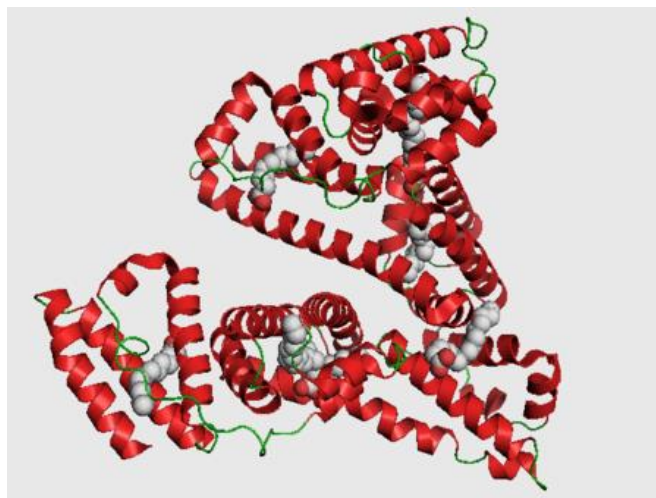
U dijagnostici i terapiji raznih bolesti, poput bolesti jetre, bubrega i koštane srži, kao i ostalih metaboličkih i nutritivnih poremećaja, mjerenje ukupnih proteina vrlo je bitno. Koncentracija određenih proteina van referentnih vrijednosti može biti povezana sa specifičnim bolestima ili stanjima (4, 5). Odstupanje ukupnih serumskih proteina od referentnih vrijednosti može biti povezano s disproteinemijom ili poremećajem ravnoteže vode. Urin zdrave osobe sadrži samo tragove proteina i to one čija je molekulska masa dovoljno mala da mogu prolaziti glomerularnu membranu. Proteinurija je stanje izlučivanja povećane količine proteina u urinu (> 150 mg/dan). Hipoproteinemija i hiperproteinemija su stanja koja se koriste za opisivanje promjene u razini proteina u krvi. Hipoproteinemija je stanje smanjene količine proteina u krvi koja se

razvija uslijed smanjene sinteze proteina (nedovoljan unos aminokiselina hranom ili poremećaj u apsorpciji aminokiselina), povećanog gubitka proteina (oštećenje glomerularne membrane) te povećane razgradnje proteina. Hiperproteinemija predstavlja povećanu koncentraciju proteina u krvi. Razvija se kod dehidracije, paraproteinemije (pojave patoloških proteina, npr. u multiplom mijelomu) te nekih kroničnih bolesti zbog povećane koncentracija protutijela (6). Točne koncentracije proteina su ključne kako bi se osigurali pouzdani rezultati za buduće eksperimente, prema kojima će se pravilno postupati pri istraživanju i liječenju određenih bolesti. Osim u dijagnostičke svrhe, u medicini je kvantifikacija ukupnih proteina u uzorku tkiva, krvi ili formuliranom proizvodu često prvi korak u kompleksnijim analizama koje služe boljem razumijevanju bioloških funkcija proteina (7).

#### **1.4. Proteini seruma**

Proteini u krvi vrše brojne funkcije: nosioci su zaštite od bakterijskih i virusnih infekcija, sudjeluju u održavanju koloidno – osmotskog tlaka, djeluju kao puferi te održavaju acido – baznu ravnotežu, djeluju kao prijenosnici različitih spojeva, a niz proteina ima i svoje određene funkcije (enzimi, hormoni, sustav komplementa, faktori koagulacije, hemoglobin). Ukupni proteini prisutni u serumu predstavljaju zbroj svih proteina prisutnih u krvotoku te čine najznačajniju komponentu krvi (4). Krvni serum je komponenta krvi koja se dobiva nakon centrifugiranja, koagulacije i uklanjanja krvnih stanica (eritrocita, trombocita i leukocita) i faktora zgrušavanja. Serum sadrži smjesu više od stotinu proteina. Razdvajanjem tih različitih proteina elektroforezom, vidljivo je pet glavnih frakcija: albumin,  $\alpha_1$ -globulini,  $\alpha_2$ -globulini,  $\beta$ -globulini i  $\gamma$ -globulini (3). Albumin je najzastupljeniji protein u toj smjesi i čini približno 60 % ukupnog sadržaja proteina u serumu. Glavne funkcije albumina su održavanje osmotskog tlaka i transport različitih tvari kao što su hormoni, masne kiseline i lijekovi. Nadalje, ovaj protein služi kao spremnik važnih minerala, vitamina i antioksidansa te kao rezerva proteina u organizmu (2, 3). U  $\alpha_1$ -globuline spadaju  $\alpha_1$ -glikoprotein,  $\alpha_1$ -lipoprotein,  $\alpha_1$ -tripsin i  $\alpha_1$ -kimotripsin. Neki od njih imaju funkciju prijenosnih proteina, a neki djeluju kao inhibitori proteaza. U  $\alpha_2$ -globuline ubrajamo  $\alpha_2$ -makroglobulin, ceruloplazmin i haptoglobin.  $\alpha_2$ -makroglobulini su velike molekule građene od 4 polipeptidna lanca. Glavni je intravaskularni inhibitor proteaza i održava koloidno-osmotski tlak kada nema albumina. Ceruloplazmini su glikoproteini koji sadrže 6 do 8 atoma bakra. Njihova glavna uloga je oksidacija Fe(II) u Fe(III) što omogućuje vezanje željeza na transferin te sprječava stvaranje slobodnih radikala u stanjima upale. Haptoglobin je velika molekula građena od 2 polipeptidna lanca koje su međusobno

povezane disulfidnim vezama, a glavna mu je funkcija ireverzibilno vezanje dvije molekule hemoglobina.  $\beta$ -globulini su transferin, proteini komplementa i  $\beta_2$ -mikroglobulin. Transferin prenosi željezo u organizmu, dok su proteini komplementa uključeni u imunosni odgovor.  $\beta_2$ -mikroglobulini su vrlo mali proteini. Određuju se za procjenu tubularne funkcije bubrega jer prolaze kroz glomerularnu bazalnu membranu te se u proksimalnom tubulu reapsorbiraju u cirkulaciju.  $\gamma$ -globulini su imunoglobulini, bitne komponente imunološkog sustava koje pomažu prepoznati i neutralizirati toksine i druge strane tvari (3, 4).



Slika 5. Struktura proteina albumina  
(<https://bs.wikipedia.org/wiki/Albumin>)

### 1.5. Proteini crijeva

Proteini crijeva imaju bitnu ulogu u strukturi, funkciji i cjelokupnom zdravlju probavnog sustava. Strukturni proteini poput okludina uključeni su u stvaranje čvrstih spojeva između crijevnih epitelnih stanica, stvarajući pravilno prijanjanje stanica i sprječavajući curenje tvari između stanica (8). U proteine crijeva uključuju se i probavni enzimi koji pomažu u razgradnji složenih molekula u jednostavnije oblike za apsorpciju. U ovu skupinu proteina spadaju enzimi amilaze, lipaze i proteaze (endo- i egzopeptidaze) koji pomažu razgraditi ugljikohidrate, masti odnosno proteine u manje molekule koje crijeva mogu apsorbirati (2, 3). Mucin je glavna komponenta crijevne sluzi i pridonosi njejoj gelastoj strukturi i zaštitnim svojstvima. Sluz osigurava podmazivanje, djeluje kao fizička barijera protiv patogena i štetnih tvari te podržava funkciju crijevne mikrobiote (9).

## **1.6. Proteini mozga**

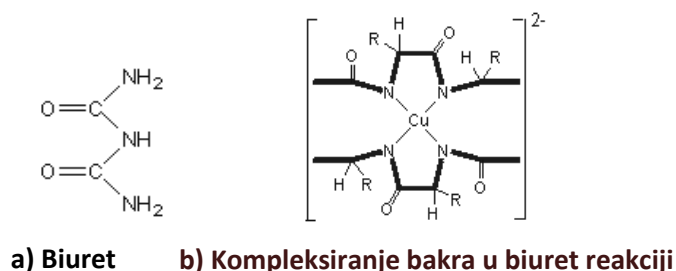
U mozgu je aktivno više od trećine ukupnog broja od 20000 gena koji čine ljudski genom, više nego u ijednom drugom organu (10). Proteini kodirani tim genima utječu na razvoj i funkcioniranje mozga te u konačnici kontroliraju kako se krećemo, mislimo, osjećamo i ponašamo. Glavna funkcija moždanih proteina su proteini bitni za unutarstanični metabolizam i oni koji izgrađuju vezivno tkivo između moždanih stanica (kolagen, fibronektin, elastin te polisaharidi i proteoglikani). Određeni geni stvaraju proteine koji proizvode neurotransmitere – kemijske glasnike koje prenose informacije od jednog neurona do drugog. Ostali proteini u mozgu važni su za uspostavljanje fizičkih veza koje povezuju različite neurone zajedno i tvore neuronske mreže (11). Analiza moždanog proteoma daje važne informacije o funkcioniranju mozga i nužna je za utvrđivanje ključnih proteina koji su razlog sinaptičkih disfunkcija kao podlozi mnogih čestih bolesti, npr. Alzheimerove bolesti. Osim toga, analiza proteina u mozgu pomaže utvrditi prognostičke i dijagnostičke biomarkere raznih drugih bolesti te poboljšati njihovo liječenje ili otkrivanje (12).

## **1.7. METODE KVANTIFIKACIJE PROTEINA**

### **1.7.1 Biuret metoda**

Biuret metoda karakteristična je za sve proteine jer ovisi o prisutnosti peptidnih veza (7). Metoda je dobila ime po biuretu, spoju koji nastaje spajanjem dviju molekula uree (uz izdvajanje amonijaka), a koji također daje pozitivnu reakciju. Reakcija je prvi put opisana početkom 19. stoljeća, ali se za metodu koristi i naziv Piotrowskijev test u čast poljskog fiziologa koji ju je neovisno otkrio 20-ak godina kasnije (13). Biuret reagens sastoji se od natrijevog hidroksida, bakrovog(II) sulfata i natrijevog kalijevog tartarata. Natrijev hidroksid ima funkciju održavanja alkalnog pH neophodnog za odvijanje reakcije, molekula koja izravno reagira s proteinima je bakrov(II) sulfat, a natrijev kalijev tartarat sprječava stvaranje bakrovog hidroksida, spoja koji ima tendenciju taloženja i ometanja reakcije (14). Aminokiseline i dipeptidi tvore komplekse s bakrom(II), no to ne rezultira promjenom boje otopine. Karakteristična ljubičasta boja pojavljuje se kada su prisutni tripeptidi ili duži lanci, odnosno molekule koje sadrže najmanje dvije peptidne veze. U kompleksima, najvažniji je glavni peptidni lanac i veza između atoma bakra i dušika koja je karakteristika svih proteina. Međutim, u kompleksiranju bakra sudjeluju i atomi kisika iz glavnoga lanca te atomi dušika, kisika i sumpora iz bočnih ogranaka aminokiselina (15). Test može predstavljati kvalitativnu ili

kvantitativnu reakciju. U kvalitativnom obliku, pojava ljubičaste boje znak je pozitivnog testa i dokazuje prisutnost proteina ili peptida. U kvantitativnom obliku, koncentracija se određuje spektrofotometrijski na 540-560 nm, a intenzitet boje direktno je proporcionalan koncentraciji peptidnih veza u uzorku (14).



Slika 6. Struktura a) molekule biureta, b) prikaz jednog od mogućih kompleksa bakra

(<http://eskola.chem.pmf.hr/odgovori/odgovor.php3?sif=2272>)

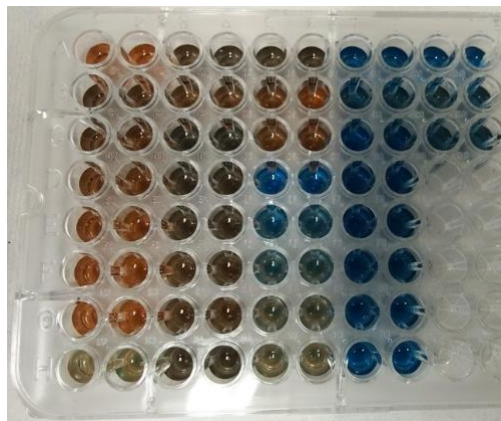
### 1.7.2. Bradford metoda

Bradfordov test predstavlja jednostavnu i točnu metodu za određivanje koncentracije proteina. Ovu metodu 1976. godine prvi je razvio Marion M. Bradford, po čijem je imenu poznata i danas (7). Ovaj se test temelji se na diferencijalnoj promjeni boje kao odgovor vezanja Bradfordovog reagensa na proteine u uzorku što, ovisno o njihovoj koncentraciji, rezultira promjenom boje koja se mjeri spektrofotometrom ili čitačem mikropločica (16). Boja Coomassie Brilliant Blue G-250 prisutna je u Bradfordovom reagensu (često označena kao Coomassie G-250 ili samo Coomassie Blue). Boja srodna ovoj, Coomassie R-250, koristi se za bojanje proteinskih gelova, za što može poslužiti i Coomassie G-250, no s manjom osjetljivošću. Pri kiselom pH, Coomassie Blue je dvostruko protoniran kation crvene boje, u neutralnim uvjetima je zelene boje, a anionski oblik je plav. Bradfordov reagens je zakiseljena otopina Coomassie G-250 (crvena otopina protonirane Coomassie Blue). Upravo je dvostruka protoniranost uvjet za stabilno vezanje ove boje za protein. U interakciji s proteinom, prvi elektron se predaje nabijenim skupinama na proteinu, narušavajući njegovu strukturu i posljedičnim izlaganjem hidrofobnih džepova. Boja se veže na te džepove, pri čemu se skupine sulfonske kiseline vežu na pozitivne amine. Osim toga, javlja se dodatna privlačnost zbog van der Waalsovih sila. Posljedica interakcije boja-protein je promjena boje reagensa u plavu uslijed promjene u neprotonirani oblik. Osim promjene boje, dolazi do promjene u maksimumu apsorpcije: crveni



Bradfordov reagens ima apsorpcijski maksimum ( $A_{\max}$ ) na 470 nm, a anionski plavi oblik boje pomiče  $A_{\max}$  na 595 nm. Obzirom da je količina plavog anionskog oblika proporcionalna količini proteina u uzorku, koncentracija proteina u uzorku može se izravno odrediti mjerenjem apsorbanije na 595 nm. Neutralni zeleni oblik Coomassie G-250 koji je donirao elektron, ali nije vezan na protein ne ometa mjerenje u testu budući da ima  $A_{\max}$  na 650 nm. U analizi se za oduzimanje bilo koje pozadine zbog interferirajućih tvari koje mogu promijeniti omjere između tri oblika boje koriste i standardi za kvantificiranje količine proteina u uzorcima, uobičajeno goveđi serumski albumin (BSA) ili goveđi  $\gamma$ -globulin (17).

U nekim istraživačkim primjenama, ovaj se test zbog nekoliko razloga preporučuje kao zamjena za druge testove iste namjene, posebno često korištenu Lowryjevu metodu. Prvo, Bradfordov test puno je lakši za korištenje: potreban je samo jedan reagens i 10 minuta inkubacije u usporedbi s tri reagensa i 30-40 minuta tipičnim za Lowry test. Drugo, budući da je apsorbanija kompleksa boja-protein relativno stabilna, Bradfordov test ne zahtijeva kritično vrijeme na koje je potrebno paziti u Lowryevom testu. Treće, na Bradfordov test ne utječu mnogi spojevi koji ograničavaju primjenu Lowryjevog testa (7).



Slika 7. Prikaz određivanja koncentracije proteina Bradfordovom metodom

(<https://www.differencebetween.com/difference-between-bradford-and-lowry-protein-assay/>)

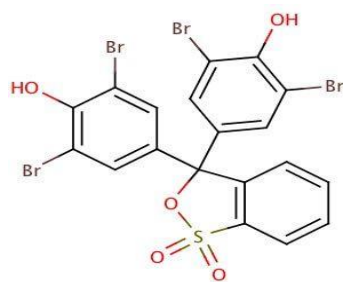
### 1.7.3. BCA metoda

BCA (engl. *bicinchoninic acid assay*) test za određivanje koncentracije proteina osmišljen je i patentiran u kemijskoj tvrtci Pierce Chemical Company 1989. godine. U reakcijskoj smjesi nastaje produkt ljubičaste boje koji se spektrofotometrijski određuje na 562 nm (7). Test uključuje dva koraka. U prvom,  $\text{Cu}^{2+}$  se dodaje uzorku te u reakciji s proteinima dolazi do

redukcije u  $\text{Cu}^+$ . Ovaj se korak mora izvesti u bazičnoj otopini s natrijevim kalijevim tartaratom (18). Prvi korak metode predstavlja biuret reakciju i rezultira stvaranjem svijetlo plave boje koja je relativno slaba i može ju biti teško kvantificirati, pogotovo u uzorcima s manjom koncentracijom proteina. Stoga se u drugom koraku uzorku dodaje bicinkoninska kiselina kako bi reagirala s  $\text{Cu}^+$  pri čemu nastaje produkt ljubičaste boje koji je puno svjetliji od produkta plave boje koji je nastao u prvom koraku (19). Dodatak bicinkoninske kiseline čini BCA test oko 100 x osjetljivijim od samog koraka 1 (odnosno biuret reakcije). BCA test uobičajeno se koristi za otkrivanje koncentracija proteina između 20 i 2000  $\mu\text{g/ml}$  (18).

#### **1.7.4. Bromfenol plavo metoda**

Krajem 70-ih godina prošlog stoljeća, američki kemičar Flores publicirao je znanstveni članak s opisom nove metode za kvantifikaciju proteina (20). Bromofenol plavo (BFB) je fenolftaleinska anionska boja koja se na proteine veže u neutralnim do kiselim uvjetima i koristi se za određivanje koncentracije proteina u različitim biološkim uzorcima, a priprema se laganim dodavanjem viška broma u vruću otopinu fenolsulfonftaleina u ledenoj octenoj kiselini. BFB se koristi i kao pH indikator s prijelaznim rasponom od  $\text{pH} = 3$  do  $\text{pH} = 4,6$  pri čemu se njegova boja reverzibilno mijenja iz žute ( $\text{pH} \leq 3$ ) u plavu ( $\text{pH} \geq 4,6$ ) te pokazuje sličan učinak kao fenolftalein s kojim i dijeli strukturnu sličnost. Osim tih namjena, koristi se i kao obojani marker za praćenje procesa elektroforeze u agaroznom gelu i elektroforeze u poliakrilamidnom gelu. Budući da BFB nosi blagi negativni naboj pri umjerenom pH, migrirat će u istom smjeru kao DNA ili protein u gelu brzinom koja varira ovisno o gustoći gela i sastavu pufera za elektroforezu (21). BFB se koristi za određivanje koncentracije proteina posebno u solubiliziranim kultiviranim stanicama i proteinima stanične membrane s visokim koncentracijama surfaktanata (22). Ta osobina ovog spoja predstavlja prednost u odnosu na rašireniju analizu koja koristi Coomassie blue boju, ali na koju utječe prisutnost surfaktanata u uzorcima (23).



**Bromfenol plavo**

Slika 8. Strukturna formula spoja bromfenol plavo

([https://www.medchemexpress.com/bromophenol-blue.html?utm\\_source=google&utm\\_medium=CPC&utm\\_campaign=Europe&utm\\_term=HY-B1571&utm\\_content=Bromophenol%20blue&gclid=Cj0KCQjw3JanBhCPARIsAJpXTx7eJs6irAXeHYkF-iSfYakzfRDevmsr14GJ\\_zdtkbtA5O7eNxTkgrUaAtVwEALw\\_wcB](https://www.medchemexpress.com/bromophenol-blue.html?utm_source=google&utm_medium=CPC&utm_campaign=Europe&utm_term=HY-B1571&utm_content=Bromophenol%20blue&gclid=Cj0KCQjw3JanBhCPARIsAJpXTx7eJs6irAXeHYkF-iSfYakzfRDevmsr14GJ_zdtkbtA5O7eNxTkgrUaAtVwEALw_wcB))

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utječe li, i na koji način, primjena različitih metoda za određivanje koncentracije proteina u biološkim uzorcima tkiva i seruma na dobivene vrijednosti, odnosno odrediti hoće li se dobiveni rezultati statistički značajno razlikovati.

## **3. MATERIJALI I METODE RADA**

### **3.1. MATERIJALI**

#### **3.1.1. Laboratorijski pribor**

- Staklene epruvete
- Automatske pipete
- Nastavci za automatske pipete
- Plastične tubice (Eppendorf tube)
- Plastične epruvete
- Centrifuga
- Mikrotitarska ploča
- Homogenizator
- Spektrofotometar
- Kapaljka
- Vaga

#### **3.1.2. Kemikalije**

- RIPA reagens
- Inhibitori proteaza i fosfataza
- PBS (fiziološka otopina fosfatnog pufera)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit
- Bradfordov reagens
- Bromfenol plavo reagens
- Otopina natrijevog klorida
- Biuret reagens
- Biuret standard
- Destilirana voda

#### **3.1.3. Biološki materijal**

U radu su korišteni dijelovi mozga i crijeva te serum mužjaka miševa soja C57BL/6 uzgojenih na Medicinskom fakultetu u Rijeci, starosti 8-12 tjedana koji su bili hranjeni standardnom

mišjom hranom i vodom *ad libitum*. Koncentracija proteina određena je u 6 uzoraka mozga, 6 uzoraka završnog dijela debeloga crijeva (kolona) te u 6 prethodno pripremljenih seruma iz uzoraka cijele krvi.

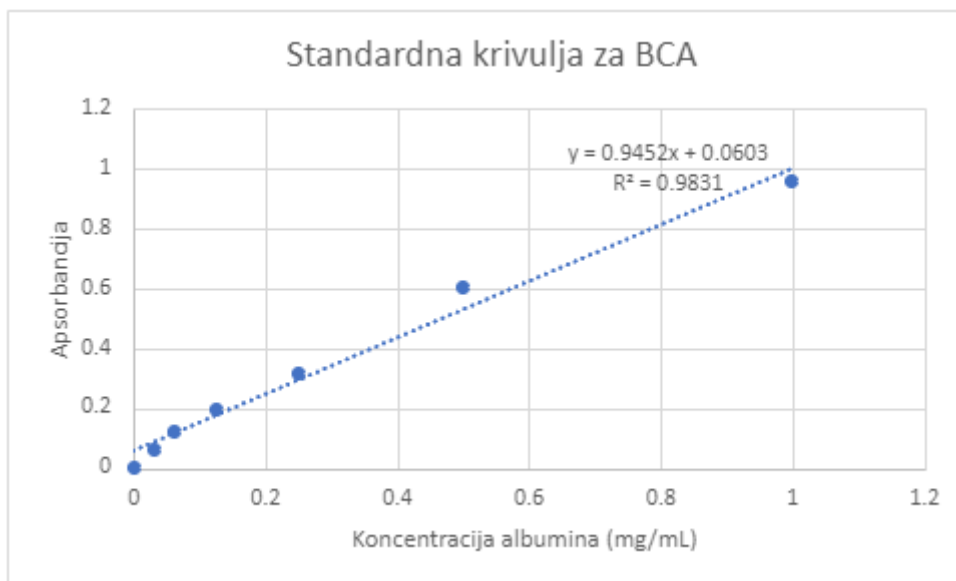
## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. Homogenizacija**

Homogenizacija je proces kojem je cilj stvoriti jednoliku suspenziju, emulziju ili otopinu te je neophodan prvi korak u analizi koncentracije proteina iz tkiva. U plastičnu epruvetu volumena 5 ml stavlja se smrznuti prethodno izvagan dio mozga odnosno crijeva te RIPA (engl. *Radioimmunoprecipitation Assay Buffer*) reagens s inhibitorima proteaza i fosfataza (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA). Korišteni su inhibitori PMSF (fenil-metil-sulfonilfluorid), natrijev ortovanadat te koktel inhibitora proteaza koji su dodani u omjeru 50 µl/svakog inhibitora u 5 ml RIPA reagensu. Omjer mase uzorka i RIPA pufera iznosio je 1 : 3. Nakon homogenizacije, sadržaj se prebacuje u plastičnu tubicu volumena 1.5 ml poslije čega slijedi inkubacija koja traje 30 minuta na ledu. Sljedeći korak u pripremi uzoraka je centrifugiranje koje se provodi na 14500 rpm/30 min na 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant koji u sebi sadrži otopljene proteine pažljivo je odvojen od taloga koji se bacio te je alikvotiran u nove čiste tubice i pohranjen do daljnje upotrebe na -80 °C.

### **3.2.2. BCA metoda**

Za provođenje BCA metode, korišten je Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). Standardne otopine proteina različitih poznatih koncentracija se pripremaju kako bi se napravila kalibracijska krivulja. Ove otopine dobivaju se iz poznatih komercijalnih standarda proteina tj. iz standarda albumina čija je početna koncentracija 2 mg/ml. Razrijeđenjem standardne otopine albumina napravljeno je sedam standardnih otopina različitih koncentracija: STD1 = 1 mg/ml, STD2 = 0,5 mg/ml, STD3 = 0,25 mg/ml, STD4 = 0,125 mg/ml, STD5 = 0,0625 mg/ml, STD6 = 0,03125 mg/ml i STD7 = 0 mg/ml.



Slika 9. Standardna krivulja albumina za BCA metodu

Uzorci mozga i crijeva razrijeđeni su u omjeru 1 : 25 (4  $\mu$ l uzorka i 96  $\mu$ l PBS-a), a serum u omjeru 1 : 100 (4  $\mu$ l uzorka i 396  $\mu$ l PBS-a). BCA reagens pripremao se miješanjem dviju komponenti - BCA reagensa A i BCA reagensa B u omjeru 50 : 1. BCA reagens sadrži bicinkoninsku kiselinu koja reagira s reduciranim bakrenim ionima stvarajući obojeni kompleks. U svaku jažicu dodalo se 25  $\mu$ l uzorka homogenata ili seruma te 200  $\mu$ l reagensa. U slijepoj probi uzorak je bio zamijenjen s istim volumenom PBS-a (25  $\mu$ l PBS-a i 200  $\mu$ l BCA reagensa). Potom su se uzorci ili standardne otopine inkubirali s BCA reagensom kako bi se omogućila reakcija između proteina i reagensa. Inkubacija se provodila pri temperaturi od 37  $^{\circ}$ C kroz 30 minuta u mraku. Nakon inkubacije, obojeni kompleksi nastali između proteina i BCA reagensa mjerili su se spektrofotometrijski (Berthold technologies GmbH & Co. KG, Njemačka). BCA kompleks apsorbira svjetlost pri valnoj duljini od oko 562 nm. Intenzitet boje kompleksa proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku.



Slika 10. Spektrofotometar Berthold technologies GmbH & Co. KG

### 3.2.3. Biuret metoda

U Biuret metodi, proba se priprema miješanjem 100  $\mu$ l uzorka i 5 ml biuret reagensa, standard miješanjem 100  $\mu$ l standarda proteina ( $c = 2 \text{ mg/mL}$ ) i 5 ml biuret reagensa, sve u staklenim epruvetama. U slijepoj probi se umjesto uzorka koristio isti volumen otopine natrijevog klorida ( $w = 0,9 \%$ ), otopine s kojom je prethodno pomiješan biuret reagens. Sadržaj epruvete inkubirao se potom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je mjerena fotometrom (Spectroquant® Pharo 100, Merck, Rahway, NJ, USA) na valnoj duljini od 550 nm. Koncentracija proteina u uzorku izračunata je prema jednadžbi:

$$c = \frac{A(\text{proba})}{A(\text{standard})} \times c(\text{standard})$$



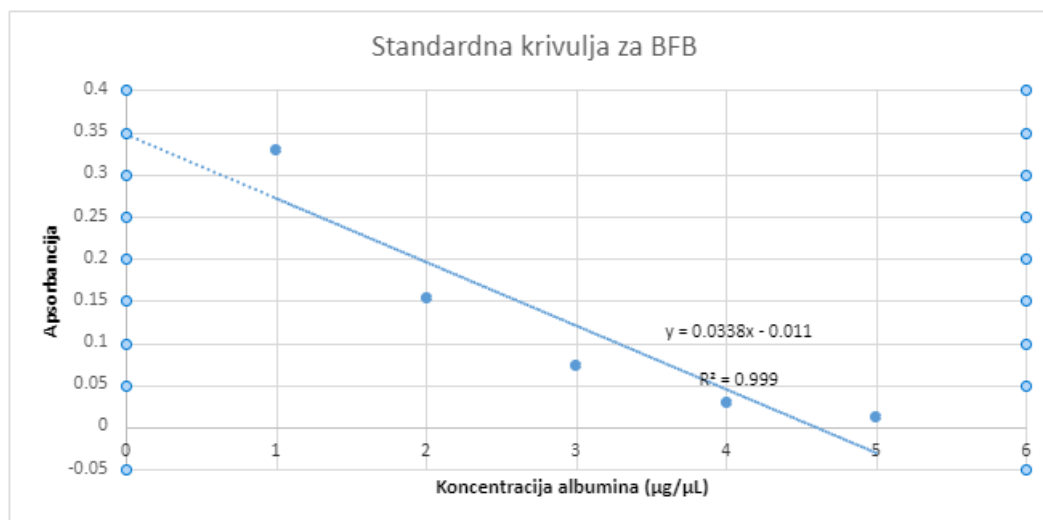


Slika 11. Spektrofotometar Spectroquant® Pharo 100

### 3.2.4. Bromfenol plavo metoda

Uzorci seruma su za ovu analizu bili razrijeđeni u omjeru 1 : 4, temeljem prethodnog pilot-pokusa. Proba se pripremala tako da je 5 µl razrijeđenog uzorka seruma ili homogenata bilo pomiješano s 1 ml bromfenol plavo reagensa u plastičnoj tubici. U slijepoj probi se umjesto uzorka koristio isti volumen destilirane vode. Apsorbancija se mjerila spektrofotometrijski na valnoj duljini od 610 nm. Koncentracija se računala prema formuli (baziranoj na baždarnom dijagramu s prethodno pripremljenim standardima):

$$c(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{(A_{\text{uzorka}} - A_{\text{slijepa proba}}) + 0,011}{0,0338}$$



Slika 12. Standardna krivulja albumina za BFB metodu



Slika 13. Spektrofotometar Thermo Spectronic Biomate 3

### 3.2.5. Bradford metoda

Uzorci crijeva i mozga za Bradford metodu bili su razrijeđeni 1 : 10, dok su uzorci seruma bili razrijeđeni 1 : 25. Standardi su pripremljeni razrijeđivanjem standardne komercijalne otopine albumina koncentracije 2 mg/ml, kako je već opisano u Odjeljku 3.2.2. Mjerenje se provodilo u mikrotitarskoj pločici ravnoga dna. Za analizu, u jažicu se dodavalo 25  $\mu$ l uzorka razrijeđenog homogenata, seruma ili standarda te 200  $\mu$ l Bradford reagensa. U slijepoj probi je uzorak zamijenjen istim volumenom PBS-a. Nakon inkubacije u trajanju od 10 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku, apsorbancija je izmjerena spektrofotometrijski na 620 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA). Koncentracije su izračunate uz pomoć 4-parametarske krivulje uz upotrebu programa spektrofotometra.

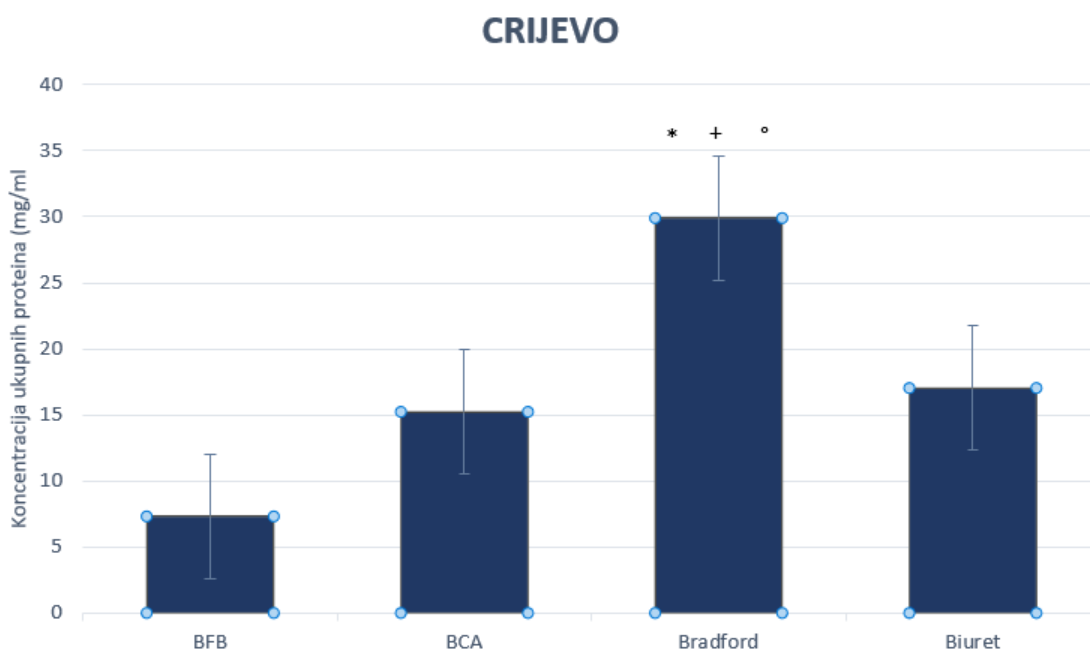
### 3.2.6. Statistička obrada podataka

Prikazane su vrijednosti kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Podaci su analizirani pomoću programskog paketa STATISTICA 12 (StatSoft Inc, OK, SAD). Da bi se ispravno odabrao statistički test, prije same analize bilo je potrebno odrediti vrstu distribucije podataka Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Za statističku analizu rezultata korišteni su neparametrijski ANOVA i Scheffe testovi.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije proteina u crijevima miša

Koncentracija proteina u homogenatima 6 uzoraka crijeva miševa soja C57BL/6 odredila se pomoću 4 različite standardno korištene metode: BCA, BFB, Bradford i biuret. Rezultati su prikazani na Slici 14. Bradford metodom dobivene su najveće vrijednosti (29,905 mg/ml) koje su se statistički značajno razlikovale od BCA (15,236 mg/ml), BFB (7,137 mg/ml) i biuret metode (17,035 mg/ml). Koncentracije dobivene BCA, BFB i biuret metodama nisu se statistički međusobno razlikovale.



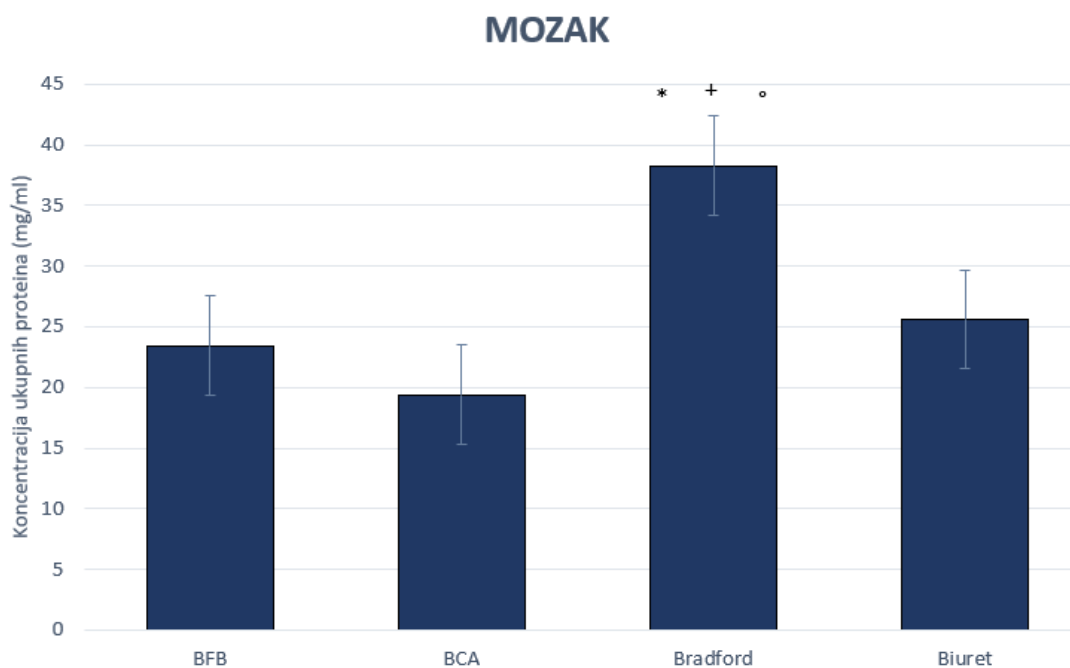
Slika 14. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije ukupnih proteina u crijevima miša. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (N = 6 miševa).

Kratice: BFB, Bromfenol plavo; BCA, Bicinchoninic acid assay

Legenda: \* značajna razlika u odnosu na BFB metodu, + značajna razlika u odnosu na BCA metodu, ° značajna razlika u odnosu na biuret metodu. Razina značajnosti je  $p < 0,05$ .

## 4.2. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije proteina u mozgu miša

Određivanjem koncentracije ukupnih proteina u 6 uzoraka mozga miša soja C57BL/6 dobiveni su rezultati prikazani na Slici 15. BCA metodom (2,968 mg/ml), BFB metodom (2,458 mg/ml) i biuret metodom (3,552 mg/ml) dobiveni su rezultati koji se međusobno statistički ne razlikuju, dok se rezultati dobiveni Bradford metodom (10,778 mg/ml) statistički razlikuju od svih ostalih metoda.



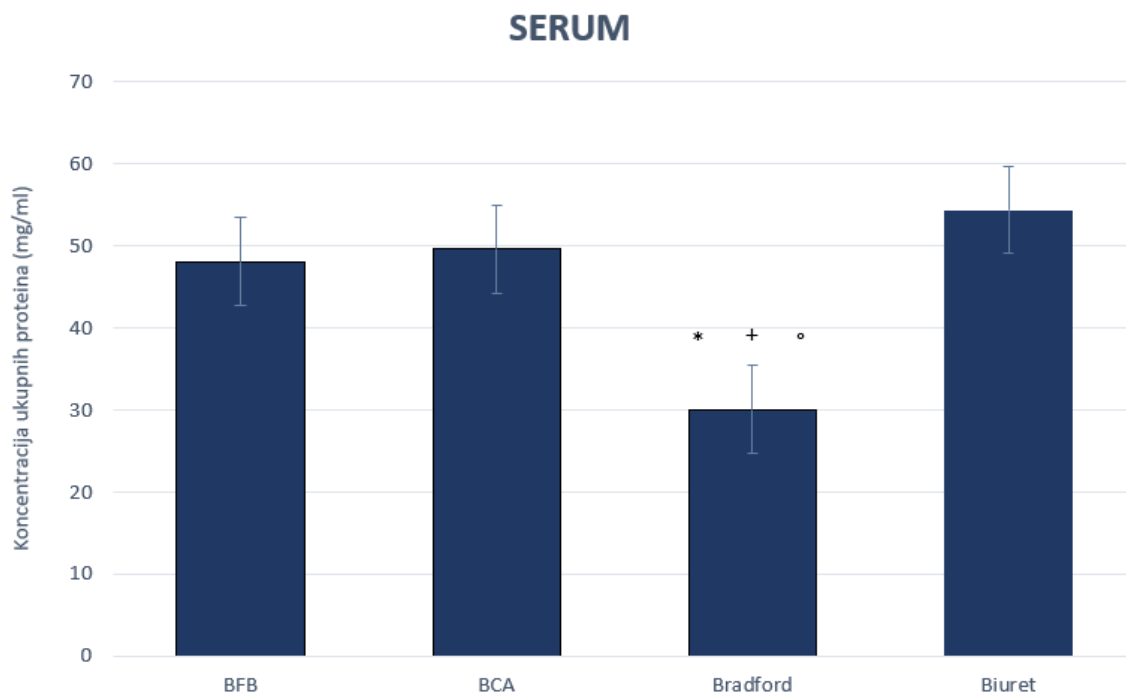
Slika 15. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije ukupnih proteina u mozgu miša  
Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (N = 6 miševa).

Kratice: BFB, Bromfenol plavo; BCA, Bicinchoninic acid assay

Legenda: \* značajna razlika u odnosu na BFB metodu, + značajna razlika u odnosu na BCA metodu, ° značajna razlika u odnosu na biuret metodu. Razina značajnosti je  $p < 0,05$ .

### 4.3. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije proteina u serumu miša

Slika 16. prikazuje rezultate dobivene pomoću 4 standardno korištene metode kojima se određivala koncentracija ukupnih proteina u serumu miša soja C57BL/6. Rezultati dobiveni Bradford metodom (1,982 mg/ml) opet se statistički značajno razlikuju i od BCA metode (11,284 mg/ml), i BFB metode (9,714 mg/ml) i od biuret metode (7,517 mg/ml). Kao i kod određivanja koncentracije proteina u crijevima i mozgu, niti kod seruma nisu uočene statistički značajne razlike između ostale tri metode.



Slika 16. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije ukupnih proteina u serumu miša. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (N = 6 miševa).

Kratice: BFB, Bromfenol plavo; BCA, Bicinchoninic acid assay

Legenda: \* značajna razlika u odnosu na BFB metodu, + značajna razlika u odnosu na BCA metodu, ° značajna razlika u odnosu na biuret metodu. Razina značajnosti je  $p < 0,05$ .

## 5. RASPRAVA

Vrijednosti proteina u serumu ili tkivu mijenja se u većini patoloških stanja u organizmu te određivanje koncentracije ukupnih proteina može imati dijagnostičku važnost ili služiti kao početni korak za složenije analize. Odabir metode koja će se koristiti za kvantifikaciju proteina ovisit će o samom uzorku i daljnjim primjenama. Na primjer, važno je znati postoje li neki reagensi koji se ne smiju unositi u uzorak ili postoje li druge komponente u uzorku koje bi mogle ometati metodu detekcije proteina. Da bi se analiza uspješno napravila, nužno je, osim poznavanja samog uzorka, razumjeti i mehanizam reakcija koje neka metoda uključuje da bi se osiguralo točno određivanje koncentracije proteina.

Neki od najčešće korištenih testova za određivanje koncentracije ukupnih proteina su test temeljen na interakciji proteina s Coomassie bojom, poznatiji kao Bradfordov test, koji uključuje izravno vezanje boje na protein te spektrofotometrijsku kvantifikaciju kolorimetrijskih ili fluorescentnih produkata. Također, rašireni su i BCA test i modificirani Lowryjev test koji koriste mehanizme kelacije bakra. Postoji i niz drugih metoda detekcije proteina koje se koriste za kvantificiranje koncentracije proteina. Možda najjednostavnija i najmanje invazivna metoda je jednostavna upotreba spektrofotometra za mjerenje apsorbancije svjetlosti na 280 nm zbog apsorpcije UV svjetlosti od strane bočnih lanaca aromatskih aminokiselina. Iako je ovaj pristup lak, brz i jednostavan način za brzu procjenu koncentracije proteina, značajnu limitaciju čini ovisnost o udjelu aromatskih aminokiselina u primarnoj strukturi proteina iz uzorka te zato ovu metodu nismo uzeli u obzir (7). Druga često korištena metoda je označavanje primarnih amina ninhidrinom ili o-ftalaldehidom i mjerenje kolorimetrijskog ili fluorescentnog produkta što je značajno kompliciranija metoda od testova ispitivanih u ovom istraživanju.

BCA test jedan je od standardno korištenih testova za kvantitativno određivanje ukupnih proteina u biološkim uzorcima u kojem je bicinkoninska kiselina reagens ključan za nastanak obojenog produkta. Princip ove metode bazira se na činjenici da proteini mogu reducirati  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^+$  ione u alkalnoj otopini (što je princip biuret reakcije), a to rezultira stvaranjem spoja ljubičaste boje u reakciji s bicinkoninskom kiselinom. Redukciju bakra uglavnom uzrokuju aminokiselinski ostaci cisteina (ili cistina), tirozina ili triptofana. Međutim, za razliku od metoda koje koriste vezanje Coomassie boje za protein, univerzalna peptidna okosnica proteina u uzorku također doprinosi formiranju boje što pomaže smanjiti varijabilnost uzrokovanu razlikama u sastavu proteina (19). U usporedbi s Bradfordovim testom, upravo zbog tog je BCA

test objektivniji, što je pokazano i našim ispitivanjem koje je otkrilo značajno odstupanje rezultata dobivenih Bradford analizom. S druge strane, jedan nedostatak BCA testa u usporedbi s Bradfordovim testom je taj što je osjetljiv na interferenciju s nekom od kemikalija koje mogu biti prisutne u biološkim uzorcima koji sadrže proteine, uključujući redukcijska sredstva kao DTT i  $\beta$ -merkaptoetanol, kelatore bakra EDTA ili EGTA te visoko koncentrirane pufere, što se može izbjeći stvaranjem razrijeđenih uzoraka (7). Homogenati organa i serum korišteni u ovom ispitivanju nisu bili izloženi niti jednoj od prethodno spomenutih kemikalija te je odstupanje rezultata dobivenih Bradfordovom metodom koje smo uočili uistinu posljedica različite osjetljivosti te metode u odnosu na ostale koje su bile ispitivane.

Proteinurija, odnosno prisutnost serumskih proteina u urinu, vrlo je koristan pokazatelj bubrežne bolesti, a nastaje kao rezultat tubularne ili glomerularne disfunkcije. Albumin, glavni serumski protein, može bolje definirati patološku proteinuriju glomerularnog podrijetla, dok je  $\beta_2$ -mikroglobulin ukazuje na tubularno podrijetlo. Uobičajeno se proteinurija u urinu određuje korištenjem test-trakica (testa s mjernom trakom). Međutim, na ovu metodu utječu volumen i boja urina, što može dovesti do netočnih rezultata (6). Stoga je kao jednostavna, precizna i točna alternativa za kvantificiranje proteinurije dostupna analiza proteina s BFB. Rezultati mogu bolje odražavati glomerularnu albuminuriju zbog većeg afiniteta za albumin nego za globulin. Naši su rezultati pokazali da koncentracija proteina izmjerena ovom metodom ne odstupa značajno od ostalih te ju se može smatrati primjerenom i za precizno određivanje koncentracije proteina i u serumu ili ostalim tkivima.

Iako je biuret test opisan kao manje osjetljiv od preostalih ispitivanih metoda, naši rezultati su pokazali da mjerenja dobivena ovom metodom ne odstupaju značajno od preciznijih BFB ili BCA testova. Prema dosad objavljenoj literaturi, biuret test nedovoljno je osjetljiv za otkrivanje malih količina proteina u uzorku. Istraživanje Fuentes i suradnika (24) pokazalo je da biuret test ima granicu detekcije od 1 mg/ml i granicu kvantifikacije od 3 mg/ml proteina. Uzorci koje smo mi ispitivali bili su bogati proteinima te stoga ta limitacija ovog testa nije bila relevantna.

## 6. ZAKLJUČAK

Određivanje koncentracije proteina ima ključnu ulogu u mnogim kliničkim i znanstvenim ispitivanjima. Svaka metoda ima svoje prednosti i ograničenja, a odabir metode ovisit će o vrsti analize te strukturi uzorka. Iz rezultata ovog istraživanja se može zaključiti da je za određivanje koncentracije proteina u serumu, mozgu i crijevu prihvatljivo koristiti BCA, BFB ili biuret metodu. Ipak, preporučljivo je koristiti kombinaciju nekoliko metoda kako bi se potvrdili rezultati i osigurala njihova točnost. Također, važno je uvijek pratiti tehnološke napretke u području laboratorijskih tehnika kako bi se osigurala što pouzdanija i preciznija analiza koncentracije proteina obzirom da se već poznate metode neprestano nadograđuju i optimiziraju. Kao i u svim biokemijskim analizama, vrlo je važno paziti na izradu i starost kemikalija te propisano držanje bioloških uzoraka za analizu jer zbog nepoštivanja pravila o njihovom rukovanju, može doći do pogrešnih rezultata.



## 7. LITERATURA

1. Aleksandar Lutkić. Albin Jurić, Biokemija. 6. izd., Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
2. Murray RK. Harper's illustrated biochemistry. New York: Mcgraw-Hill Medical; 2009.
3. Peter Karlson. Biokemija - Za studente kemije i medicine. Zagreb: Školska knjiga; 1993.
4. Noble JE, Bailey MJA. Quantitation of protein. *Methods in enzymology*. 2009;463:73–95.
5. Aitekenov S, Gaipov A, Bukasov R. Review: Detection and quantification of proteins in human urine. *Talanta*. 2020 Oct;223(1):121718.
6. Ljerka Išgum-Vorgić. Medicinska biokemija: udžbenik za zdravstveno-laboratorijske tehničare. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2003.
7. Approaches to Determinate Protein Concentration. CUSABIO. Available from: <https://www.cusabio.com/c-21049.html#a05>
8. Günzel D, Fromm M. Claudins and Other Tight Junction Proteins. *Comprehensive Physiology*. 2012 Jul;
9. Syed ZA, Zhang L, Ten Hagen KG. In vivo models of mucin biosynthesis and function. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022 May;184:114182.
10. Lim L. Proteins in brain function. *Nature*. 1978 Feb;271(5644):487–7.  
<https://doi.org/10.1038/271487b0>
11. <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/brain/human+brain>
12. Gomazkov OA. Neuroproteomics: How a Multitude of Proteins Reflect Brain Functions. *Biology Bulletin Reviews*. 2021 Mar 1;11(2):143–53.  
<https://doi.org/10.1134/S2079086421020043>
13. Gustav von Piotrowski. Eine neue Reaction auf Eiweisskörper und ihre näheren Abkömmlinge. 1857.
14. Chemistry of Protein Assay". Thermo Fisher Scientific Protein Methods Library. Archived from the original on 2022-03-24. Retrieved 2022-05-08.
15. <http://eskola.chem.pmf.hr/odgovori/odgovor.php3?sif=2272>

16. Jeffrey M. Becker, Guy A. Caldwell, Eve Ann Zachgo, Exercise 13 - Protein Assays, Biotechnology (Second Edition), Academic Press, 1996, Pages 119-124, ISBN 9780120845620, <https://doi.org/10.1016/B978-012084562-0/50069-2>
17. Ninfa, Alexander J; Ballou, David P; Benore, Marilee (2008). Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology. Wiley. p. 113. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lst/literature/4110065A.pdf>
18. Cortés-Ríos J, Zárate AM, Figueroa JD, Medina J, Fuentes-Lemus E, Rodríguez-Fernández M, et al. Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. Analytical Biochemistry. 2020 Nov;608:113904., <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32800701/>
19. He F. BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. BIO-PROTOCOL. 2011;1(5). <https://bio-protocol.org/exchange/protocoldetail?id=44&type=1>
20. Flores R. A rapid and reproducible assay for quantitative estimation of proteins using bromophenol blue. Analytical Biochemistry. 1978 Aug;88(2):605–11.
21. [https://www.medchemexpress.com/bromophenol-blue.html?utm\\_source=google&utm\\_medium=CPC&utm\\_campaign=Europe&utm\\_term=HY-B1571&utm\\_content=Bromophenol%20blue&gclid=Cj0KCQjw3JanBhCPARIsAJpXTx7eJs6irAXeHYkF-iSfYakzfrDevmsr14GJ\\_zdtkBtA5O7eNxTkgrUaAtVwEALw\\_wcB](https://www.medchemexpress.com/bromophenol-blue.html?utm_source=google&utm_medium=CPC&utm_campaign=Europe&utm_term=HY-B1571&utm_content=Bromophenol%20blue&gclid=Cj0KCQjw3JanBhCPARIsAJpXTx7eJs6irAXeHYkF-iSfYakzfrDevmsr14GJ_zdtkBtA5O7eNxTkgrUaAtVwEALw_wcB)
22. [https://www.chondrex.com/bromophenol-blue-bpb-protein-assay#:~:text=Bromophenol%20blue%20\(BPB\)%2C%20a,concentrations%20of%20surfactants%20\(8\).](https://www.chondrex.com/bromophenol-blue-bpb-protein-assay#:~:text=Bromophenol%20blue%20(BPB)%2C%20a,concentrations%20of%20surfactants%20(8).)
23. [https://www.chondrex.com/bromophenol-blue-bpb-protein-assay#:~:text=Bromophenol%20blue%20\(BPB\)%2C%20a,concentrations%20of%20surfactants%20\(8\)](https://www.chondrex.com/bromophenol-blue-bpb-protein-assay#:~:text=Bromophenol%20blue%20(BPB)%2C%20a,concentrations%20of%20surfactants%20(8))
24. Fuentes Paredes, Flor, Iván Quispe Díaz, y Jorge García Baltazar. Estandarización Del Método De Biuret Para Cuantificar Proteínas Totales En Suero Antibotrópico Polivalente Producido En El Centro Nacional De Productos Biológicos Del INS. 2012.

## **8. ŽIVOTOPIS**

Sara Borovac rođena je 12.7.2001. godine. Dolazi iz Bjelovara gdje je završila IV. osnovnu školu Bjelovar 2016. godine te srednju Medicinsku školu Bjelovar 2020., smjer zdravstveno-laboratorijski tehničar. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, prijediplomski studij Sanitarnog inženjerstva je upisala u akademskoj godini 2020./2021. Od studentskih poslova, radi u knjižnici Medicinskog fakulteta u Rijeci. Aktivno se snalazi i koristi programima MS Office paketa. Od jezika služi se engleskim.

## 9. PRILOZI

Broj slika: 16

Slika 1. Struktura globularnih proteina

Slika 2. Struktura fibrilarnih proteina

Slika 3. Prikaz peptidne veze

Slika 4. Strukturni oblici proteina

Slika 5. Struktura proteina albumina

Slika 6. Struktura a) molekule biureta, b) prikaz jednog od mogućih kompleksa bakra

Slika 7. Prikaz određivanja koncentracije proteina Bradfordovom metodom

Slika 8. Strukturna formula spoja bromfenol plavo

Slika 9. Standardna krivulja za BCA

Slika 10. Spektrofotometar Berthold technologies GmbH & Co. KG

Slika 11. Spektrofotometar Spectroquant® Pharo 100

Slika 12. Standardna krivulja albumina za BFB metodu

Slika 13. Spektrofotometar Thermo Spectronic Biomate 3

Slika 14. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije ukupnih proteina u crijevima miša

Slika 15. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije ukupnih proteina u mozgu miša

Slika 16. Usporedba različitih metoda za određivanje koncentracije ukupnih proteina u serumu miša