

Oligomerizacijsko stanje transkripcijskog regulatora QacR iz bakterije *Staphylococcus aureus*

Vitovski, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad (sveučilišni)

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:275413>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2026-09-02**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository of Faculty of Science in Split / Digitalni repozitorij Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu](#)



Dabar

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju

Mihaela Vitovski

**Oligomerizacijsko stanje transkripcijskog
regulatora QacR iz bakterije *Staphylococcus
aureus***

Diplomski rad

Split, 2023

Ovaj rad izrađen pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Matilde Šprung, predan je na ocjenu Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvala...

Od srca hvala ...

... mentorici Matildi na ukazanom povjerenju, strpljenju i vodstvu kroz izradu ovoga rada. Hvala vam na ukazanoj prilici i prenesenom znanju, izrada ovoga rada predstavlja veliko životno iskustvo za mene.

... dragoj Doris na pomoći, trudu i velikom doprinosu ovom radu. Hvala ti što si mi uvijek bila spremna pomoći i uputiti riječi ohrabrenja.

... hvala mojoj dragoj obitelji na podršci kroz moj cijeli život, prihvaćanju mojih odluka i što ste mi omogućili studiranje u gradu daleko od doma i podupiranju kroz cijeli studij.

... hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene, a posebno veliko hvala mojoj Mihaeli koja me je trpjela tijekom svih godina studiranja i uvijek bila glavna podrška.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Diplomski rad

Oligomerizacijsko stanje transkripcijskog regulatora QacR iz bakterije *Staphylococcus aureus*

Mihaela Vitovski

QacR je protein patogenih bakterija *Staphylococcus aureus* koji regulira razinu transkripcije *qacA* gena. Ovaj gen je odgovoran za ekspresiju efluks pumpe QacA koja je povezana s rezistencijom bakterije *S. aureus* na antibiotike. Pravilna oligomerizacija regulatornog proteina QacR utječe na njegov afinitet prema DNA i na regulaciju ekspresije efluks pumpe QacA. Danas se sve češće za analizu oligomerizacije proteina primjenjuju native tehnike elektroforeze. U ovome radu za provjeru oligomerizacijskog stanja transkripcijskog regulatora QacR korištena je BN-PAGE elektroforeza. BN-PAGE elektroforezom je pokazano da QacR spontano dimerizira nakon inkubacije na sobnoj temperaturi što je potvrdio i imunoblot s anti-His protutijelom. Budući da su eksperimenti provedeni s dMUT QacR varijantom proteina koja nosi zamjene na položajima Cys⁷² i Cys¹⁴¹, možemo zaključiti da spontana dimerizacija nije uvjetovana stvaranjem disulfidnih veza već vjerojatno velikom dodirnom površinom koju dijele dva monomera.

Ključne riječi:

protein QacR, rezistencija, BN-PAGE elektroforeza, oligomerizacijsko stanje

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 37 stranica, 14 grafičkih prikaza, 6 tablica i 37 literaturnih navoda.

Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: dr. sc. Matilda Šprung, izvanredni profesor

Neposredni voditelj: Doris Crnčević, mag. educ. biol. et chem.

Ocjenjivači: dr. sc. Matilda Šprung, izvanredni profesor

dr. sc. Stjepan Orhanović, izvanredni profesor

Doris Crnčević, mag. educ. biol. et chem.

Rad prihvaćen: 14. srpnja 2023.

Basic documentation card

University of Split
Faculty of Science
Department of Chemistry
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Diploma Thesis

**Oligomerization state of the transcriptional regulator QacR from the bacterium
*Staphylococcus aureus***

Mihaela Vitovski

QacR is a protein of the pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* that regulates the transcription of the *qacA* gene. This gene is responsible for the expression of the efflux pump QacA, which is associated with antibiotic resistance in *S. aureus*. Proper oligomerization of the regulatory protein QacR affects its affinity for DNA and regulation of efflux pump QacA expression. Nowadays, native electrophoresis techniques are increasingly used to analyze protein oligomerization. In this work, BN-PAGE electrophoresis was used to check the oligomerization state of the transcriptional regulator QacR. BN-PAGE electrophoresis showed that QacR dimerized spontaneously after incubation at room temperature, which was also confirmed by immunoblot with anti-His antibody. Since the experiments were performed with the dMUT-QacR protein variant carrying substitutions at positions Cys72 and Cys141, we can conclude that the spontaneous dimerization is not due to disulfide bond formation but to the large contact area between the two monomers.

Keywords: QacR protein, resistance, BN-PAGE electrophoresis, oligomerization state

Thesis deposited in the library of Faculty of Science, University of Split

Thesis consists of: 37 pages, 14 figures, 6 tables and 37 references,
original in: Croatian

Mentor: Matilda Šprung, Ph.D. Associate Professor

Assistant Supervisor: Doris Crnčević, mag. educ. biol. et chem.

Reviewers: Matilda Šprung, Ph.D. Associate Professor
Stjepan Orhanović, Ph.D. Associate Professor
Doris Crnčević, mag. educ. biol. et chem.

Thesis accepted: July, 14th 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Višestruka rezistencija bakterija i efluks pumpe	1
1.1.1. Efluks pumpe za višestruku otpornost kod bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> i efluks pumpa QacA	2
1.2. Transkripcijski regulatori iz skupine TetR	2
1.2.1. Transkripcijski faktor QacR	3
1.3. Tehnike izučavanja native strukture proteina	6
1.3.1. Elektroforetske tehnike u biokemijskom laboratoriju	6
1.3.3. Cilj rada	11
2. MATERIJALI I METODE	12
2.1. Materijali	12
2.1.1. Osnovne kemikalije	12
2.1.2. Boje i proteinski standard	12
2.1.3. Protutijela	12
2.1.4. Kromatografska kolona	12
2.1.5. Ostali materijali	13
2.1.6. Soj bakterije <i>Escherichia coli</i>	13
2.1.7. Sastojci mikrobioloških hranjivih podloga	13
2.1.8. Plazmid pET28b-qacR_dMUT	13
2.2. Metode	14
2.2.1. Ispitivanje uvjeta ekspresije proteina dMUT QacR u kulturi bakterija <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) transformiranih plazmidom pET28b-qacR_dMUT	14
2.2.2. Pročišćavanje i pohrana proteina dMUT QacR eksprimiranog u stanicama <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	15
2.2.3 Elektroforetske metode	17
3. REZULTATI	23
3.1. Ispitivanje uvjeta ekspresije proteina dMUT QacR u kulturi bakterija <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) transformiranih plazmidom pET28b_qacR_dMUT	23
3.2. Afinitetna kromatografija na uređaju FPLC (eng. <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> , FPLC)	24
3.3. BN-PAGE elektroforeza i imunodetekcija	25
3.3.1. Optimizacija gela za BN-PAGE elektroforezu	25
3.3.2. BN-PAGE elektroforeza uzoraka dMUT QacR nakon pročišćavanja postupkom afinitetne kromatografije	26
3.3.3. BN-PAGE elektroforeza različitih uzoraka proteina dMUT QacR	27

3.3.4. SDS-PAGE elektroforeza različitih uzoraka proteina dMUT QacR	28
4. RASPRAVA	30
5. ZAKLJUČAK	33

1. UVOD

1.1. Višestruka rezistencija bakterija i efluks pumpe

Bakterijska rezistencija na postojeće klase antibiotika predstavlja gorući znanstveni i javno zdravstveni problem, a razvija se kao posljedica izlaganja bakterija toksičnom reagensu. Osobito komplicirana je učestala pojava višestruke bakterijske rezistencije (MDR, engl. *multidrug resistance*) koja se definira kao stečena rezistencija na najmanje jedan lijek u tri ili više različitih klasa antibiotika [1]. Drugim riječima, višestruko rezistentni sojevi istovremeno su otporni na djelovanje većeg broja antimikrobnih reagensa. Upravo zbog simultane rezistencije na više antibiotika, infekcije višestruko rezistentnim sojevima bakterija osobito se teško liječe. Istraživanja su pokazala da bakterije koriste različite mehanizme za rezistenciju na antibiotike poput enzimske modifikacije i/ili degradacije antibiotika te promjene propusnosti membrane s pojačanom ekspresijom efluks pumpe [2,3].

Efluks pumpe su transportni proteini smješteni u citoplazmatskoj membrani bakterija, arheja i eukariota. Bakterije u osnovi koriste efluks pumpe kao prirodni obrambeni mehanizam koji se temelji na sposobnosti efluks pumpe da izbacuju široki spektar toksičnih spojeva [4,5]. Neke bakterijske efluks pumpe su specifične, odnosno prepoznaju i izbacuju jedan supstrat, a neke prepoznaju i izbacuju široki spektar strukturno nepovezanih supstrata. Efluks pumpe koje izbacuju više različitih oblika antibiotika glavna su komponenta višestruke rezistencije bakterija [6]. MDR efluks pumpe razvrstane su prema homologiji proteinskih sekvenci, ukupnoj strukturi proteina, izvoru energije (hidroliza ATP-a ili ionski elektrokemijski gradijent), specifičnosti supstrata i drugim svojstvima na sljedećih pet obitelji: MFS (engl. *major facilitator superfamily*), SMR (engl. *small multidrug resistance*), MATE (engl. *multidrug and toxic compound extrusion*), RND (engl. *resistance-nodulation-cell division*), ABC (engl. *ATP-binding cassette*) [2]. Ovi bakterijski efluks sustavi prisutni su u mnogim humanim patogenima kao što su *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* [7].

1.1.1. Efluks pumpe za višestruku otpornost kod bakterije *Staphylococcus aureus* i efluks pumpa QacA

Staphylococcus aureus glavni je bakterijski humani patogen te uzrokuje niz različitih kliničkih manifestacija. Liječenje infekcija uzrokovanih ovom bakterijom otežano je zbog pojave MDR sojeva [8]. Efluks pumpe imaju ključnu ulogu u antimikrobnoj rezistenciji kod *S. aureus*. Neke od najranije otkrivenih efluks pumpi *S. aureus* pripadaju MFS obitelji (engl. *major facilitator superfamily*) [6]. MFS predstavlja najveću i najraznovrsniju obitelj membranskih prijenosnika sveprisutnu u svim domenama živih organizama. Proteini ove obitelji građeni su od 350 do 600 aminokiselina i obično imaju 12 do 14 transmembranskih segmenata [9].

Efluks pumpa QacA jedna je od najranije otkrivenih i najbolje proučenih efluks pumpi iz bakterije *S. aureus* [8]. Ova efluks pumpa pripada MFS obitelji (engl. *major facilitator superfamily*), građena je od 514 aminokiselina i ima 14 transmembranskih regija. Efluks pumpa QacA kodirana je genom *qacA* koji se u kliničkih izolata *S. aureus* nalazi na plazmidu pSK1 [2, 10]. QacA posreduje u rezistenciji na široki spektar kationskih monovalentnih i bivalentnih aromatskih antibiotika, antiseptika i dezinficijensa [5]. Monovalentni kationi uključuju kvaterne amonijeve spojeve (engl. *Quaternary Ammonium Compounds*, QACs) te interkalirajuće boje (etidijev bromid i rodamin). Dok bivalentni kationi uključuju bigvanide (klorheksidin) i diamidine (pentamin, DAPI) [8]. QACs su najistaknutiji supstrati QacA, poput cetrimida, benzalkonija i dekvalinija, koji se obično koriste kao dezinficijensi i antiseptici [8]. Transport prethodno navedenih supstrata QacA pokreće protonska pokretačka sila preko antiporta protona [2]. Prema Schumacheru i suradnicima, neregulirana proizvodnja QacA vjerojatno bi uzrokovala narušavanje membranskog elektrokemijskog gradijenta što bi bilo toksično za stanicu [11]. Stoga ekspresija *qacA* gena mora biti pod strogom kontrolom. Transkripcijski regulator QacR, član TetR obitelji transkripcijskih regulatora, kontrolira ekspresiju *qacA* gena [7].

1.2. Transkripcijski regulatori iz skupine TetR

Obitelj TetR bakterijskih proteina jedna je od najvećih obitelji transkripcijskih regulatornih proteina, nazvana po prvo otkrivenom i detaljno proučenom istoimenom proteinu, TetR, koji kontrolira ekspresiju gena *tet* čiji produkti osiguravaju rezistenciju na tetraciklin [12]. Pripadnici ove obitelji su DNA-vezujući proteini koji reguliraju ekspresiju gena koji kodiraju za bakterijske efluks pumpe [13].

Svi regulatorni TetR proteini imaju visoko homolognu N-terminalnu DNA-veznu domenu od približno 45 aminokiselina i veću C-terminalnu domenu. Gotovo isključivo su građeni od α -uzvojnica i funkcionalno su dimeri [14]. U većini slučajeva C-terminalna domena ostvaruje interakciju s jednim ili više liganada, što utječe na afinitet proteina za DNA. Poznato je da proteini ove obitelji stupaju u interakcije sa širokim spektrom liganada [14]. Mnogi proteini ove obitelji su represori, vežu se na palidromsku sekvencu koja preklapa promotor, čime sprječavaju vezanje RNA-polimeraze i transkripciju. Operatorska mjesta na koja se vežu proteini TetR obitelji duga su uglavnom oko 15 parova baza [11]. Vezanje liganda na ove proteine dovodi do konformacijskih promjena koje uzrokuju disocijaciju proteina s DNA i time je omogućena transkripcija ciljanih gena. Osim represora, ovoj obitelji pripadaju proteini koji su aktivatori ili im uloga nije povezana s transkripcijom. Mogu biti autoregulatorni, pod kontrolom drugih transkripcijskih faktora ili mogu biti posttranslacijski regulirani [14].

1.2.1. Transkripcijski faktor QacR

Transkripcijski faktor QacR (engl. *Quaternary ammonium compound transcriptional repressor*) represor je patogenih bakterija *Staphylococcus aureus* koji kontrolira razinu transkripcije gena *qacA*. QacR pripada prethodno spomenutoj TetR obitelji transkripcijskih regulatornih proteina i funkcionalno je homodimer. Svaka podjedinica QacR građena je od devet α -uzvojnica. Tri N-terminalne uzvojnice ($\alpha 1$ - $\alpha 3$) tvore DNA-veznu domenu, koja sadrži HTH (engl. *helix-turn-helix*) motiv odgovoran za prepoznavanje veznog mjesta na molekuli DNA. Preostalih šest uzvojnica ($\alpha 4$ - $\alpha 9$) tvore ligand-veznu domenu koja uključuje dimerizacijsku površinu i vezno mjesto za više-lijekova (engl. *multidrug-binding pocket*, MDB) [15].

Za razliku od ostalih proteina obitelji TetR koji se uglavnom vežu za operatore duge 15 parova baza, QacR se veže za 28 parova baza dug operator IR1 (engl. *inverted repeat 1*) koji se preklapa s promotorom *qacA* [16]. Za operator IR1 vežu se četiri monomera QacR, odnosno dva dimera QacR, neovisno ili s ograničenim dimer-dimer interakcijama (Slika 1) [17].

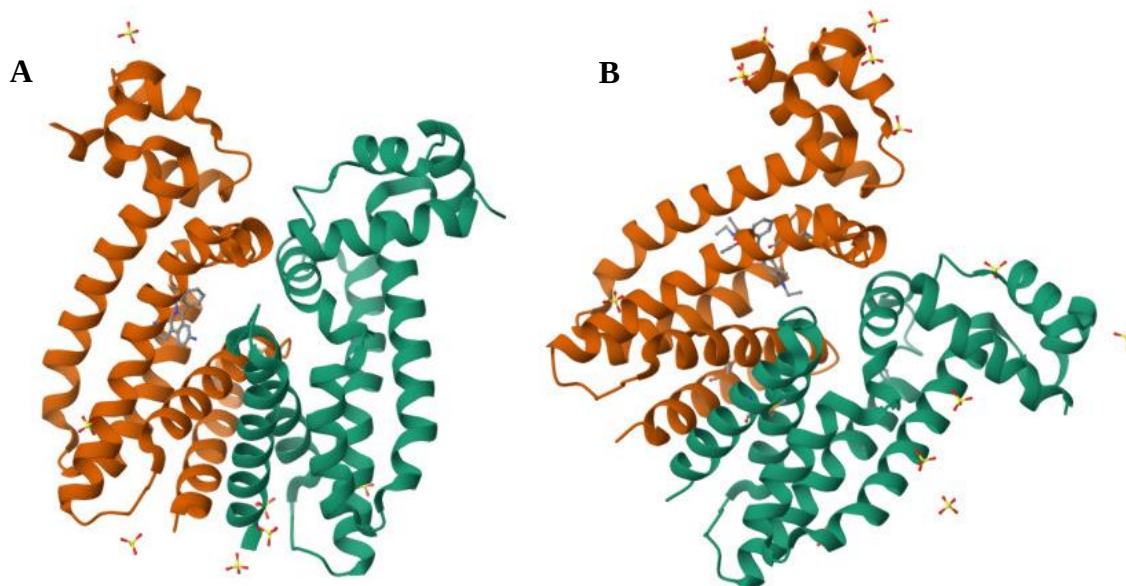


Slika 1. Prikaz kristalne strukture QacR-DNA kompleksa. Podjedinice jednog QacR dimera prikazane su kao žute i ružičaste vrpce, a drugog kao plave i zelene vrpce. Slika preuzeta iz Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/1JT0>).

Dimer QacR disocira sa svog operatorskog DNA veznog mjesta vezanjem jednog od mnogobrojnih liganda, od kojih su mnogi također supstrati efluks pumpe QacA [16]. Vezanje liganda za dimer QacR dovodi do dislokacije bočnih lanaca Tyr-92 i Tyr-93 i posljedičnog proširivanja veznog mjesta. Ova konformacijska promjena uzrokuje promjene u DNA-veznoj domeni što rezultira QacR strukturom koja nije povoljna za vezivanje na operator IR1 [18]. Gubitak represivne sposobnosti QacR uslijed vezanja liganda inducira ekspresiju gena *qacA*. Vezanje liganda za QacR omogućuje ekspresiju gena *qacA* u različitim razmjerima. Istraživanja su pokazala da induksijski nivo nije u korelaciji s afinitetom QacR za spojeve, iz čega se vidi da je aktivnost QacR regulirana alosterički [15].

Izvorno se smatralo da se samo kvaterni amonijeve spojevi vežu za QacR, no danas je poznato da se vežu raznovrsni lipofilni kationski monovalentni i bivalentni spojevi raznih veličina i oblika. Do danas je objavljeno više od 20 struktura QacR vezanog za različite spojeve, uključujući i komplekse s genetski-modificiranim varijantama QacR [15], poput strukture QacR vezanog za rodamin 6G, etidij, kristal violet, berberin i malahit zeleno [18]. Kristalna struktura kompleksa QacR-ligand otkriva da je MDB džep (engl. *multidrug binding*, MDB) QacR-a sastavljen od najmanje dva različita pododjeljka (engl. *subpockets*) koja mogu primiti

strukturno različite spojeve na različitim pozicijama. Tako se na primjer etidij (Et) i rodamin 6G (R6G) vežu za dva manja džepa, nazvana “R6G” i “Et” džepovi, koji su smješteni na suprotnim stranama većeg MDB džepa (Slika 2) [18].



Slika 2. Prikaz kristalne strukture QacR vezanog za etidij (**A**). Prikaz kristalne strukture QacR vezanog za rodamin 6G (**B**). Slike preuzete iz Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>)

1.2.1.1. Eksperimentalni dokazi o oligomerizacijskom stanju QacR

Na temelju rezultata gel filtracije i nativne elektroforeze, Grkovic i suradnici uočili su da je QacR pročišćen kao monomer te da se dimerni i multimerni oblici pojavljuju tijekom pročišćavanja i skladištenja. Za ovaj proces odgovorno je spontano formiranje disulfidnih veza između dva jedina cisteinska ostatka QacR-a (Cys⁷² i Cys¹⁴¹) (Slika 3).

>sp|P0A0N4|QACR_STAAU HTH-type transcriptional regulator QacR OS=Staphylococcus aureus
OX=1280 GN=qacR PE=1 SV=1

MNLKDKILGVAKELFIKNGYNATTTGEIVKLSESSKGNLYYHFKTENLFLEILNIEESKWQEQ
WKKEQIK[C]KTNREKFYLYNELSLTTEYYYPLQNAIIEFYTEYYKTNSINEKMNKLENKYIDAY
HVIFKEGNLNGEW[C]NDVNAVSKIAANAVNGIVTFTHEQNINERIKLMNKFSSQ IFLNGLSK

Slika 3. Aminokiselinski slijed proteina QacR s istaknutim Cys⁷² i Cys¹⁴¹. Sekvenca preuzeta iz baze podataka UniProt KB (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0A0N4/entry>)

Budući da oligomerene forme proteina nastale na ovaj način, nisu biološki funkcionalne (ne vežu DNA), autori su zaključili da Cys⁷² i Cys¹⁴¹ nisu važni za formiranje nativnog dimera [7].

Daljnja biokemijska istraživanja proteina QacR ometana su brzim formiranjem nenativnih disulfidnih veza između monomera. Rješavanje ovog problema zahtijevalo je uklanjanje dva cisteinska ostatka, što je rezultiralo proizvodnjom potpuno funkcionalnog QacR bez cisteina sa znatno poboljšanom *in vitro* stabilnošću. Ispitivanje pomoću SDS-PAGE pročišćenih QacR s uklonjenim cisteinima i QacR divljeg tipa koji su ostavljeni 4 sata na inkubaciji na sobnoj temperaturi, pokazalo je da su kod divljeg tipa proteina vidljivi oligomerni oblici, dok je kod QacR bez cisteina vidljiv samo monomerni oblik. Međutim bojanje SDS-PAGE gelova srebrovim nitratom, otkrilo je da u uzorcima QacR bez cisteinskih ostataka ipak postoje vrlo male količine dimera QacR. Dobiveni rezultati pokazali su kako se QacR i bez cisteinskih ostataka spontano strukturira u dimer što upućuje na pretpostavku da je QacR u funkcionalnom obliku dimer baš kao i ostali članovi obitelji TetR proteina [17].

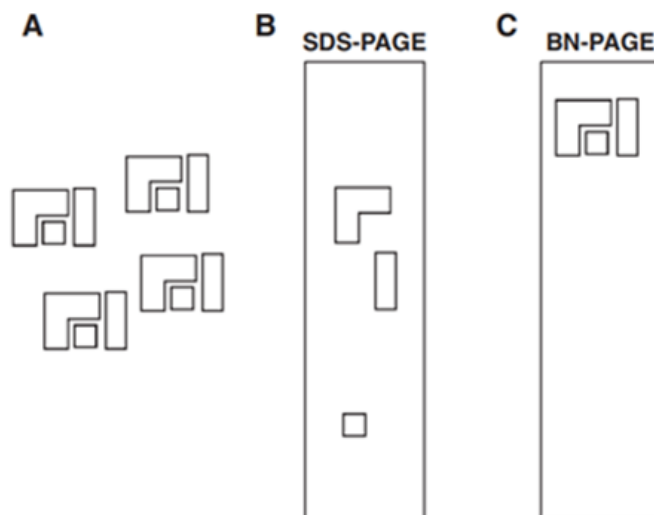
1.3. Tehnike izučavanja native strukture proteina

Promjene u strukturi proteina mogu imati velike učinke na njihovu biološku funkciju. Tako su biološki funkcionalni jedino proteini nativnih struktura. Nativna struktura odnosi se na prostornu strukturu proteina koja nastaje kao posljedica nekovalentnih interakcija unutar istog i/ili među različitim polipeptidnim lancima [19]. Protein-protein interakcije u slučaju multimernih proteinskih kompleksa uglavnom su slabe te lako pucaju u denaturirajućim uvjetima kakvi su u SDS-PAGE elektroforezi. Stoga je u pogledu biokemijske karakterizacije strukturno-složenih proteina nužno koristiti tehnike koje ne narušavaju nativnu, odnosno funkcionalnu konformaciju proteina [20]. U tom pogledu se u suvremenim biokemijskim laboratorijima koriste različite elektroforetske i ne-elektroforetske metode za proučavanje native strukture proteina [21].

1.3.1. Elektroforetske tehnike u biokemijskom laboratoriju

U tipičnom biokemijskom laboratoriju rutinski se koristi metoda elektroforeze u poliakrilamidnom gelu uz dodatak natrijevog dodecilsulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Uloga SDS-a je da proteinima daje negativan naboj zbog čega se razdvajanje proteinskih vrpca odvija zbog razlike u masi proteina. Zbog dodatka β -merkaptoetanola koji razara disulfidne veze te SDS-a koji razara nekovalentne veze, SDS-PAGE elektroforeza provodi se u denaturirajućim uvjetima. Uz navedeno, uzorak proteina se prije stavljanja na gel, 5 minuta zakuhava na temperaturi od 95 °C što dodatno denaturira i disocira većinu proteina u pojedinačne polipeptidne lance [19]. Iako je u mnogim slučajevima

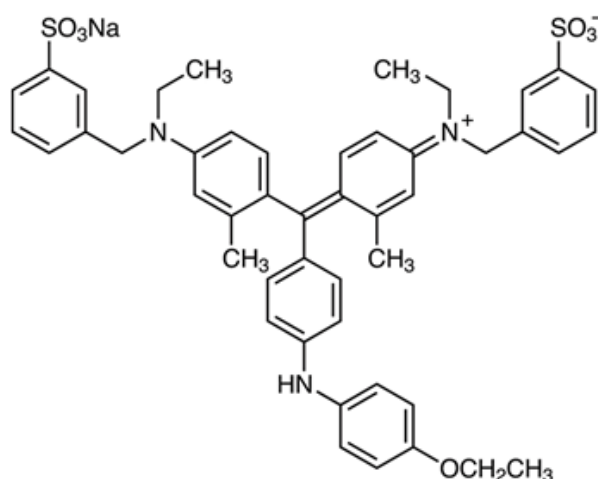
ovo vrlo korisna i učinkovita metoda, denaturacija i disocijacija proteinskih podjedinica ometa istraživanja nativnih svojstava. To je razlog zašto su se razvile različite metode elektroforeze koje ne narušavaju nativnu strukturu proteina. Na Slici 4 može se vidjeti usporedba principa razdvajanja proteina s SDS-PAGE i s jednom vrstom elektroforeze u nativnim uvjetima. Glavni izazov u provedbi elektroforeze u nativnim uvjetima je izbjegavanje reagensa koji uzrokuju denaturaciju i disocijaciju [21]. Elektroforeza u nativnim uvjetima primjenjuje se kada je potrebno sačuvati interakcije među proteinskim podjedinicama i njihovu nativnu konformaciju, što omogućava analizu biološke aktivnosti proteina (npr. aktivnost enzima, vezanje antitijela, aktivnost receptora) [22]. Općenito, nativna elektroforeza može se provesti zahvaljujući vlastitom naboju proteina koji ovisno o tome je li neto naboj proteina pozitivan ili negativan, osigurava anodnu ili katodnu migraciju na danom pH. Osim toga se u nekim varijantama ovakvih metoda dodaje kemijski reagens koji proteinima daje naboj bez da narušava njihovu nativnu strukturu [23]. Nativna poliakrilamidna elektroforeza jedna je od najmoćnijih tehnika koje se primjenjuju za proučavanje nativne strukture proteina [22]. Prvi pokušaji primjene ove tehnike bili su zasnovani na SDS-PAGE. Koristili su se isti puferi sistemi, no SDS je mijenjan Tritonom X-100 [24]. Među metodama poliakrilamidne elektroforeze u nativnim uvjetima ističe se BN-PAGE (engl. *Blue native polyacrylamid gel electrophoresis*). Ova tehnika je zasnovana na sposobnosti boje Coomassie Brilliant Blue (CBB) da se veže na površinu proteina i da ih pri tome ne denaturira. Kratko nakon BN-PAGE, opisane su i druge varijante elektroforeze u nativnim uvjetima kakva je primjerice CN-PAGE (engl. *clear-native polyacrylamid gel electrophoresis*). CN-PAGE je tehnika koja ne koristi nikakve nabijene boje, stoga elektroforetska pokretljivost ovisi samo o naboju proteina. Budući da su kiseli u vodi topljivi i membranski proteini pri fiziološkim uvjetima negativno nabijeni, oni se u CN-PAGE elektroforezi jednostavno razdvajaju putujući prema pozitivno nabijenoj anodi [25]. Bazični proteini nisu kandidati za CN-PAGE, jer zaostaju u jažicama gela zbog pozitivnog naboja. Posljednja varijanta elektroforeze u nativnim uvjetima je inačica BN-PAGE elektroforeze koja umjesto boje Coomassie Brilliant Blue koristi boju Ponceau Red S [23].



Slika 4. Shematski prikaz različitih principa razdvajanja proteina u denaturirajućoj i nativnoj elektroforezi SDS-PAGE i BN-PAGE. Uzorak multimernih kompleksa proteina koji je potrebno razdvojiti elektroforezom **(A)**, razdvajanje uzoraka proteina na pojedinačne monomere SDS-PAGE elektroforezom **(B)**, te njihovo razdvajanje BN-PAGE elektroforezom. Preuzeto iz Randelj *et al. Methods Mol Biol.* (2007) 390:417-27

1.3.1.1. Elektroforeza u nativnim uvjetima, BN-PAGE

Elektroforeza BN-PAGE (engl. *Blue native polyacrylamid gel electrophoresis*, BN-PAGE) je tehnika za razdvajanje proteina i proteinskih kompleksa u poliakrilamidnom gelu prema njihovoj molekularnoj masi uz čuvanje njihove nativne strukture. Prvi put je opisana 1991. kao metoda za izolaciju membranskih proteinskih kompleksa u rasponu masa od 10 kDa do 10 MDa [24]. Ovo je relativno ekonomična tehnika [27] koja koristi dva ključna reagensa za odvajanje proteina u njihovom nativnom stanju, boju Commassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) i aminokaproičnu kiselinu [28]. CBB G-250 je negativno nabijena boja (Slika 5) koja vezanjem na proteine daje proteinima negativan površinski naboj i pri tome ih ne denaturira. Vezanje velikog broja molekula boje uzrokuje promjenu naboja na proteinima koja omogućuje i bazičnim proteinima da putuju prema anodi tijekom BN-PAGE. Negativno nabijeni proteini se međusobno odbijaju te je na taj način spriječeno stvaranje proteinskih agregata. Uslijed vezanja boje, površine proteina gube hidrofoban karakter te oni postaju topivi u vodi bez dodatka detergenta [29]. Izostavljanje detergenta bitno je kako bi se sačuvala nativna struktura proteina osjetljivih na detergente [19]. Akrlamidne gelove nije potrebno dodatno bojati nakon završetka elektroforeze, jer proteini migriraju kao plave vrpce kroz gel.



Slika 5. Kemijska struktura boje Commassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250). Preuzeto iz Krause, F., *Electrophoresis*, **27** (2006) 2759-2781

Drugi ključni reagens je aminokaproična kiselina koja se dodaje kao komponenta pufera za pripremu uzorka te kao komponenta gel pufera. Uloga ove kiseline je poboljšavanje topljivosti proteina [30]. Bis-Tris ili imidazolski puferi primjenjuju se za stabilizaciju pH gela između 7,0 i 7,5 [25]. Schägger i suradnici pokazali su da BN-PAGE omogućuje analizu molekulskih masa većine topljivih, kao i većine membranskih proteina [31]. Samo proteini koji ne vežu CBB i nemaju, ili gotovo nemaju, negativan naboj pri pH 7,5 pokazuju značajno drugačije ponašanje.

Osim prvotne primjene, danas je ova tehnika korištena i za analizu mitohondrijskih proteinskih kompleksa, uključujući i nuklearne proteinske komplekse, proteina topivih u vodi i cjelokupnih staničnih lizata [28]. Ovom metodom moguće je analizirati proteine iz gotovo svih bioloških izvora, uključujući bakterije, kvasce, životinje i biljke [32]. Nativni proteini i proteinski kompleksi razdvajaju se na temelju molekulskih masa, a tehnika se može koristiti za analizu određivanja native mase i oligomernih stanja proteina, fizioloških protein-protein interakcija [29]. Nadalje, BN-PAGE je uspješno primijenjena u bolničkim okruženjima za dijagnosticiranje mitohondrijskih defekata koji su povezani sa humanim bolestima [28].

U usporedbi s drugim metodama, kao glavne prednost BN-PAGE ističu se mogućnost određivanja molekularne mase pozitivno i negativno nabijenih proteina, kao i membranskih proteina, mogućnost testiranja više uzoraka na istom gelu što osigurava analiziranje pod istim

uvjetima, nisu potrebne velike količine uzoraka, koristi lako dostupnu konvencionalnu opremu (standardna oprema za SDS-PAGE) [26].

Uz navedene prednosti korištenja ove tehnike, navest ćemo i neka njena ograničenja. Dodavanje CBB boje može dovesti do disocijacije slabih proteinskih kompleksa, jer negativni naboj na podjedinicama proteinskih kompleksa može uzrokovati elektrostatsko odbijanje. Afinitet vezanja CBB i posljedično elektroforetska pokretljivost ovisi o fizičkim i kemijskim svojstvima proteina (npr. veličina, oblik, hidrofobnost, posttranslacijske modifikacije, izoelektrična točka), to može otežati procjenu točne molekularne mase na BN-gelu [32]. Kao još jedan nedostatak ove metode ističe se nemogućnost naknadne primjene fluorimetrijskih tehnika [21].

1.3.2. Analiza oligomerizacije proteina

U biološkim sustavima često nalazimo primjere oligomernih proteinskih kompleksa koji su građeni od više polipeptidnih lanca. Pravilna oligomerizacija ključna je za biološku aktivnost takvih proteina. Oligomerizacija proteina kontrolira brojna biokemijska obilježja kao što su stabilnost proteina, enzimska aktivnost, rad ionskih kanala [33]. Tradicionalno, za biokemijske analize oligomerizacije proteina koriste se gel filtracija, imunoafinitetna kromatografija ili imunoprecipitacija. Ovim tehnikama se izoliraju oligomeri. Nadalje, komponente oligomera se odvajaju s SDS-PAGE i prenose na nitrocelulozne ili PVDF membrane i identificiraju obilježavanjem sa specifičnim antitijelima. Iako su osjetljive, ove metode su tehnički zahtjevne [34]. Stoga se zbog jednostavnosti i ekonomičnosti češće primjenjuju tehnike nativne elektroforeze. Da su tehnike nativne elektroforeza jednakovrijedne za istraživanje oligomernih stanja proteina potvrđuje rad iz 1994. godine u kojem autori metodom BN-PAGE identificiraju b6f kompleks iz kloroplasta kao strukturni i funkcionalni dimer [31]. Gel filtracija i BN-PAGE često se ističu kao dvije osnovne metode proučavanja oligomerizacije nativnih proteina. U usporedbi s gel filtracijom, koja zahtjeva posebnu opremu i velike količine proteina, BN-PAGE je puno osjetljivija tehnika i kao što je prethodno opisano koristi se lako dostupna konvencionalna oprema za elektroforezu [33].

1.3.3. Cilj rada

Cilj ovoga rada je ispitati i optimizirati uvjete BN-PAGE elektroforeze koji su potrebni kako bi se uspješno odredilo oligomerizacijsko stanje transkripcijskog regulatora QacR iz bakterije *Staphylococcus aureus*. Uz navedeno, koristit će se i imunoblot analiza kako bi se potvrdilo da su proteinske vrpce razdvojene BN-PAGE i SDS-PAGE elektroforezom doista monomerni i dimerni oblik QacR. Elektroforeza će se provesti odmah nakon pročišćavanja proteina na sustavu za brzu tekućinsku kromatografiju i nakon inkubacije pročišćenog proteina na sobnoj temperaturi kako bi se ustanovili uvjeti prilikom kojih dolazi do formiranja dimera. Rezultati ovog istraživanja pomoći će u razjašnjavanju uloge oligomernog oblika QacR kao i uvjeta pri kojima on spontano nastaje.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Osnovne kemikalije

Akrilamid (*Serva feinbiochemica*), aminokaproična kiselina (*Sigma-Aldrich*), amonijev persulfat (APS) (*Sigma-Aldrich*), BSA (*Capricorn*) 1,4-ditiotreitol (DTT) (*Sigma-Aldrich*), etanol (*Gram-mol*) etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Kemika*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma-Aldrich*), glicin (*ChemCruz*), glicerol (*Kemig*), imidazol (*Sigma-Aldrich*), izopronil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*Sigma-Aldrich*), β -merkaptetoetanol (*Sigma-Aldrich*), metanol (*T.T.T. doo Sveta Nedjelja*), N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED) (*Roth*), natrijev dihidrogenfosfat hidrat (*Thermo scientific*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Karl Roth*), natrijev hidrogenfosfat heptahidrat, natrijev hidrogenkarbonat (*Thermo scientific*), natrijev klorid (*Chem-lab NV*), octena kiselina (*T.T.T. doo Sveta Nedjelja*), triclin (*Sigma-Aldrich*), 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propanediol (Tris) (*VWR Chemicals*), Tween-20 (*Sigma-Aldrich*)

2.1.2. Boje i proteinski standard

Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Biorad*)

Bromfenol plavo (*Sigma-Aldrich*)

BLUeye Prestained Protein Ladder (*Sigma-Aldrich*)

2.1.3. Protutijela

Anti-6X His tag® antibody [AD1.1.10] 250ug (*Abcam*)

Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) 500ug (*Abcam*)

2.1.4. Kromatografska kolona

HisTrap HP (*GE Healthcare*)

2.1.5. Ostali materijali

Sterilni filtri veličine pora 0,22 i 0,45 μm (*TPP*), celulozno crijevo za dijalizu promjera 6 mm (*Sigma-Aldrich*)

2.1.6. Soj bakterije *Escherichia. coli*

BL21(DE3) (*F-ompThsdSb(rB-mB+)galdcM(DE3)*), s delecijom gena *lon* i *ompT* koji kodiraju stanične proteaze, poslužio je za ekspresiju proteina QacR

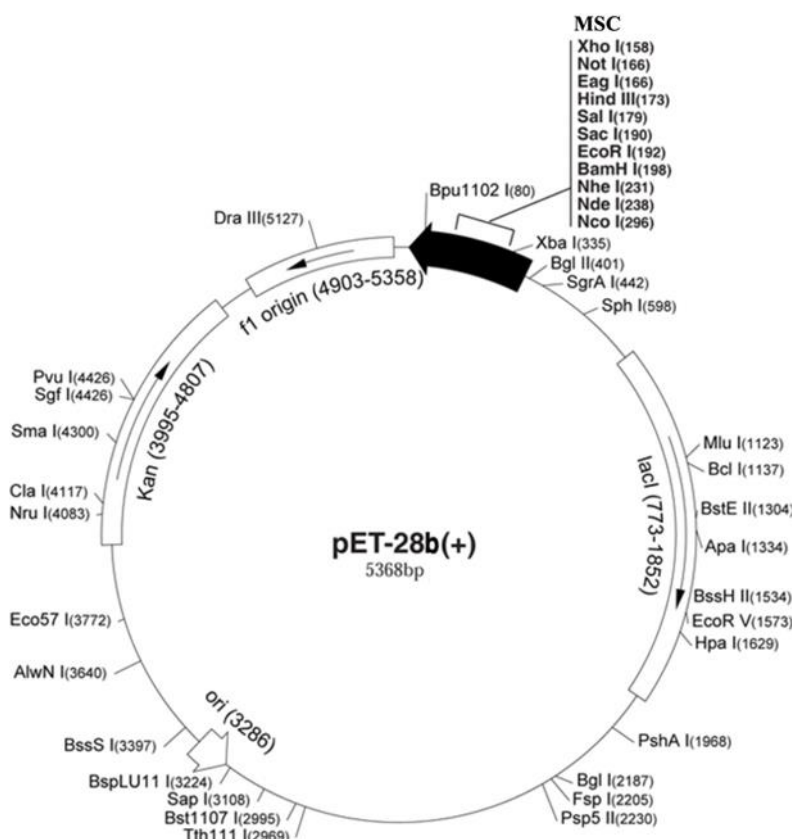
2.1.7. Sastojci mikrobioloških hranjivih podloga

Agar Bios Special LL (*Biolife*), tripton (*Roth*), ekstrakt kvasca (*Liofilchem*), kanamicin sulfat (*Roth*)

Luria-Bertani (LB) medij – osnovni mikrobiološki medij sastava: 10 g dm^{-3} triptona, 5 g dm^{-3} ekstrakta kvasca, 5 g dm^{-3} NaCl. U hranjivu podlogu, po potrebi dodaje se 15 g dm^{-3} agara. Medij se nakon otapanja komponenti autoklavira na temperaturi 121 °C, 20 min. Nakon autoklavliranja, u ohlađeni medij dodaje se kanamicin sulfat (25 mg dm^{-3}).

2.1.8. Plazmid pET28b-qacR_dMUT

Komercijalni plazmid pET28b (Novagen) (Slika 6) poslužio je za konstrukciju plazmida pET28b-qacR_dMUT kojeg je ljubazno ustupila istraživačka skupina prof. Koh Takeuchi (Nacionalni institut za naprednu industrijsku znanost i tehnologiju u Tokiju, Japan). Komercijalni plazmid sadrži višestruka mjesta za kloniranje (engl. *multiple cloning sites*, MCS) koja su pod kontrolom inducibilnog T7 promotora te kod za heksahistidinski biljeg na N-terminalnom kraju proteinskog produkta. Proteinski produkt plazmidnog konstrukta pET28b-qacR_dMUT varijanta je proteina QacR koja sadrži dvije aminokiselinske izmjene na pozicijama 72 i 141. Na ovim pozicijama se u divljem tipu QacR nalazi aminokiselina cistein dok se u varijanti proteina dMUT QacR na ovim pozicijama nalaze aminokiseline alanin na položaju 72 i serin na položaju 141 [15].



Slika 6. Vektorska mapa plazmida pET28b s istaknutim višestrukim mjestima za kloniranje (engl. *multiple cloning sites*, MTS) i genom koji kodira rezistenciju na kanamicin (Kan (3995-4807)). Preuzeto i prilagođeno s [addgene.org](https://media.addgene.org/data/plasmids/128/128642/128642-map_NVYXqDBf7jOd.pdf) (https://media.addgene.org/data/plasmids/128/128642/128642-map_NVYXqDBf7jOd.pdf)

2.2. Metode

2.2.1. Ispitivanje uvjeta ekspresije proteina dMUT QacR u kulturi bakterija *Escherichia coli* BL21(DE3) transformiranih plazmidom pET28b-qacR_dMUT

Za prekomjernu ekspresiju proteina dMUT QacR poslužio je soj bakterije *Escherichia coli* BL21(DE3) transformiran plazmidom pET28b-qacR_dMUT. Kako bi se ispitalo optimalno trajanje indukcije proteina dMUT QacR, uvjeti ekspresije ispitani su s manjim volumenima stanične kulture (engl. *small scale expresion*). Ukratko, prekonoćna kultura bakterija *E. coli* BL21(DE3) transformiranih s plazmidom pET28b-qacR_dMUT uzgajana je u tekućem LB-mediju (2.5 mL) u inkubatoru na 37 °C i 220 rpm. Sutradan je bakterijska biomasa razrijeđena u svježem LB mediju (50 mL) s dodatkom kanamicina (50 µg/mL). Nakon razrjeđivanja, kultura stanica ponovno je inkubirana na 37 °C i 180 rpm uz kontinuirano spektrofotometrijsko

praćenje optičke gustoće (OD, engl. optical density). Pri $OD_{600} \sim 0,8$ uzorkovan je 1 mL bakterijske biomase, nakon čega je kultura inducirana dodatkom IPTG (0,6 mM). Idući alikvoti uzorkovani su nakon jednog, dva, tri, četiri, pet i šesnaest sati od indukcije IPTG-om. Odmah nakon uzorkovanja, alikvoti su centrifugirani 5 min na 4 500 g. Supernatant je odstranjen, a dobiveni bakterijski talozi pohranjeni su u hladnjak na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do obrade i analize SDS-poliakrilamidnom elektroforezom.

2.2.1.2. Uzgoj kulture bakterija *Escherichia coli* BL21(DE3) transformiranih plazmidom pET28b-qacR dMUT i priprava proteinskog ekstrakata dMUT QacR

2,5 mL prekonoćne kulture *E. coli* BL21DE3 transformirane plazmidom pET28b-qacR dMUT, dodano je u LB medija (50 mL) s dodatkom kanamicina (50 $\mu\text{g/mL}$). Inokulum je podijeljen u dvije Erlenmeyerove tikvice od 2 L i stavljen u tresilicu na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 180 rpm. Kultura bakterijskih stanica ostavljena je pri navedenim uvjetima oko 3 sata, odnosno dok OD_{600} vrijednost nije dosegla približno 0,8. Ekspresija proteina inducirana je dodatkom IPTG-a, do konačne koncentracije 0,6 mM. Nakon 3 h kultura bakterijskih stanica je podijeljena u šest tuba od 500 mL koje su centrifugirane 10 min na 4 500 g pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nakon centrifugiranja supernatant je odstranjen, a talozi stanica resuspendirani su u 2,5 mL pufera A (Tablica 1) s dodatkom PMSF (1 mM). Uloga PMSF-a je da inhibicijom staničnih proteaza spriječi degradaciju prekomjerno produciranog proteinskog produkta. Resuspendirani stanični talog, soniciran je kako bi se stanične membrane lizirale i oslobodio unutarstanični sadržaja. Soniciranje resuspendiranih taloga provedeno je primjenjujući snagu sonde od 10 % u 4 ciklusa po 30 s i pauzom od 15 s između ciklusa. Tijekom resuspendiranja i sonikacije uzorci su držani na ledu kako bi se spriječila denaturacija proteina. Stanični debris uklonjen je centrifugiranjem u trajanju od 30 min na 20 000 g pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Talozi su bačeni, a supernatant profiltriran kroz filter veličine pora 0,45 μm . Pripravljeni ekstrakt ukupnih staničnih proteina držan je na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do nanošenja na kolonu za afinitetnu kromatografiju.

2.2.2. Pročišćavanje i pohrana proteina dMUT QacR eksprimiranog u stanicama *Escherichia coli* BL21(DE3)

2.2.2.1. Afinitetna kromatografija na uređaju FPLC (eng. *Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC)

Afinitetna kromatografija provedena je uz pomoć HisTrapHP kolone volumena 5 mL, spojene na sustav za brzu tekućinsku kromatografiju (FPLC). Kolona je uravnotežena propuštanjem pet

kolumnih volumena pufera A. Nakon čega je na kolonu nanoseno 12 mL proteinskog ekstrakta. Nakon nanošenja uzorka kolona je isprana s 5 kolumnih volumena pufera A kako bi se uklonili nespecifično vezani proteini. Proteini vezani na kolonu otpuštaju se s kolone u gradijentu pufera B, koji se postupno se povećava od 0 do 100 %. Dobivene frakcije analizirane su SDS-PAGE elektroforezom. Frakcije koje su sadržavale protein dMUT QacR, objedinjene su i dijalizirane u puferu za pohranu proteina.

Tablica 1. Sastav pufera korištenih za afinitetnu kromatografiju

	pufer A	pufer B
Tris	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	300 mM
imidazol	10 mM	700 mM
DTT	2 mM	2 mM

3.2.2.2. Pohrana pročišćenog proteina dMUT QacR

Nakon afinitetne kromatografije pročišćeni protein dMUT QacR nalazio se u puferu B visoke koncentracije soli i imidazola. Kako bi se spriječio nepovoljni utjecaj otopine visoke ionske jakosti na protein, pufer B zamijenjen je puferom za pohranu proteina dMUT QacR. Zamjena pufera obavljena je uz pomoć crijevca za dijalizu. Crijevce za dijalizu pripremljeno je u dva koraka. Prvo je bilo prokuhano u otopini za kuhanje crijevca (400 mL ultračiste vode koja sadrži 8 g NaHCO_3 i 0,2 g EDTA), a potom u ultračistoj vodi 10 minuta. Ovako obrađeno crijevce za dijalizu pohranjuje se u 20 % etanolu na 4 °C do uporabe.

Izmjena pufera i koncentriranje pročišćenih frakcija dMUT QacR provodi se na način da se u crijevce za dijalizu stave objedinjene frakcije proteina prethodno analizirane SDS-PAGE elektroforezom. Uzorak proteina u crijevcu za dijalizu inkubira se u puferu za dijalizu uz kontinuirano miješanje pri temperaturi 4 °C (≥ 16 sati). Nakon dijalize, uzorak proteina se po potrebi dodatno koncentrira pomoću centrifugalnih jedinica prema uputama proizvođača. Konačno, alikvoti pročišćenog proteina dMUT QacR ohranjuju se na -20 °C.

3.2.3 Elektroforetske metode

3.2.3.1. Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Priprema gela

SDS-PAGE elektroforeza provodi se u poliakrilamidnom gelu koji se priprema prema planu pipetiranja naznačenom u Tablici 2. Po miješanju komponenti, gelovi se izlijevaju između stakalaca u kalupu za izlijevanje gelova. Po izlijevanju gela za odjeljivanje na površinu gela nanosi se sloj izopropanol (~1 mL) koji izravnava površinu gela i sprječava kontakt s kisikom iz zraka koji bi inače inhibirao polimerizaciju akrilamida. Nakon što je gel za odjeljivanje polimerizirao, s površine gela filter papirom uklonjen je izopropanol. Na polimeriziran gel za razdvajanje, izlijeva se potom gel za sabijanje do samog vrha staklene ploče. Između staklenih ploča oprezno se umeće češalj za formiranje jažica kako ispod zubaca češlja ne bi zaostali mjehurići zraka. Kada je gel za sabijanje polimerizirao, uklonjen je češalj za formiranje jažica. Pripremljeni gel se odmah koristi za elektroforezu ili se čuva u hladnjaku na 4 °C do uporabe.

Tablica 2. Sastav gelova za SDS-PAGE

Gel za odjeljivanje (12 %)	Gel za sabijanje (6 %)
3 mL 4x pufera za gel za odjeljivanje (1,5 M Tris, pH 8,8)	1,25 mL 4x pufera za gel za sabijanje (0,5 M Tris, pH 6,8)
4,8 mL AA/Bis (30%)	0,83 mL AA/Bis (30%)
100 µL APS	50 µL APS
50 µL TEMED	25 µL TEMED
120 µL SDS (10 %)	50 µL SDS (10 %)
3,93 mL mQH ₂ O	2,8 mL mQH ₂ O

Priprema uzoraka

Uzorci za elektroforezu pripremljeni miješanjem 20 µL uzoraka sa 4 µL 6x pufera za nanošenje uzoraka (60 % glicerol, 12 % SDS, 0,375 M Tris-Cl, 0,03 % Bromfenol plavo). Uzorci su zatim

zakuhani 5 minuta u termobloku na 95 °C. Nakon zagrijavanja u termobloku uzorci su spremni za nanošenje u jažice gela za sabijanje.

Elektroforeza

Prethodno pripravljeni SDS-poliakrilamidni gel smješten je u kadicu za elektroforezu. U kadicu je dodan pufer za elektroforezu sastava 0,025 M Tris (pH 8,3), 0,19 M glicin, 1 g dm⁻³ SDS. U prvu jažicu nanoseno je 5 µL markera molekulske mase dok je u ostale jažice nanošeno po 10 µL prethodno pripravljenih uzoraka. Elektroforeza je provođena na sobnoj temperaturi i pri naponu od 100 V. Korišten je uređaj Mini-Protean Tetra Cell (*Biorad*). Po završetku elektroforeze gel je pažljivo izvađen iz staklenih ploča i stavljen u otopinu za bojanje gelova.

Vizualizacija proteinskih vrpca u poliakrilamidnom gelu

Proteinske vrpce su vizualizirane bojanjem gela s bojom CBB G-250. Gelovi su bojani preko noći u otopini za bojanje (0,025 % CBB G-250, 40 % metanol, 7 % octena kiselina), zatim su odbojavani u otopini za odbojavanje gelova I (40 % metanol, 7 % octena kiselina) i otopini za odbojavanje gelova II (5 % metanol, 7 % octena kiselina).

3.2.3.2. Elektroforeza proteina u nativnim uvjetima (BN-PAGE)

Puferi i otopine korišteni za BN-PAGE pripremljeni su kao što je opisano u radu [35] uz zamjenu gradijentnog gela, gelom sa 12 % (w/V) akrilamida. Sastav gelova za BN-PAGE elektroforezu prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3. Sastav gelova za BN-PAGE elektroforezu

Puferi i otopine		
3 x gel pufer	1,5 M aminokaproična kiselina	3,94 g
	150 mM Tris	0,36 g
	mQH ₂ O	20 mL
Katodni pufer	15 mM Tris	1,82 g
	50 mM triclin	8,96 g
	mQH ₂ O	1000 mL
Plavi katodni pufer	0,02 % Comassie Brilliant Blue G-250	0,04 g
	15 mM Tris	200 mL
	50 mM triclin	katodnog pufera
	mQH ₂ O	
Anodni pufer	50 mM Tris	12,11 g
	mQH ₂ O	2000 mL
Pufer za uzorke	750 mM aminokaproična kiselina	0,94 mL 2 M aminokaproične kiseline
	5 % Comassie Brilliant Blue G-250	0,125 g
	mQH ₂ O	2,5 mL
2 M aminokaproična kiselina	2 M aminokaproična kiselina	2,62 g
	mQH ₂ O	10 mL

Priprema gela

Tehnički se priprema gela za nativnu elektroforezu ne razlikuje od pripreme gela u SDS-PAGE elektroforezi, ali se razlikuju komponente za pripremu otopina gelova (Tablica 4). Gel za odjeljivanje, za razliku od SDS-PAGE izvedbe, prelije se mQH₂O i ostavlja da polimerizira (1 sat). Nakon polimerizacije, voda se uklanja filter papirom i površina gela ispire se 1x gel puferom (u 3 mL 3x pufera dodano 6 mL mQH₂O). Površina gela za odjeljivanje posušena je filter papirom i kapaljkom je uliven gel za sabijanje (4 %) i stavljen je češalj za formiranje jažica. Nakon 30 minuta polimerizirani gel ispran je s 1x gel puferom. Oprezno je uklonjen češalj za formiranje jažica te je gel pohranjen u hladnjak na 4 °C do uporabe.

Tablica 4. Sastav gelova za BN-PAGE

	Gel za odjeljivanje (12 %)	Gel za sabijanje (4 %)
3x gel pufer	3,8 mL	1,7 mL
AA/Bis (30 %)	2,2 mL	0,7 mL
mQH ₂ O	5,9 mL	2,9 mL
APS (10 %)	69 µL	62 µL
TEMED	5 µL	6,2 µL

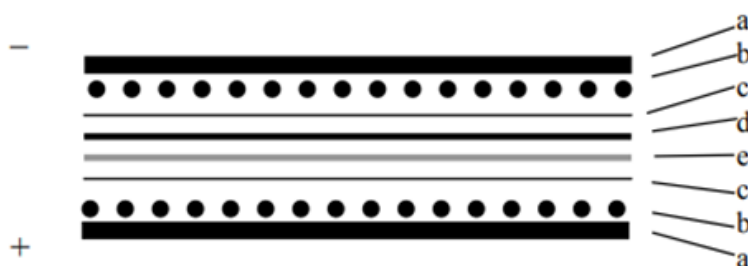
Elektroforeza

Pripravljeni gel stavljen je u kadicu za elektroforezu. Posudica s gelom ispunjena je plavim katodnim puferom negdje do jažica. Zbog lakšeg dodavanja uzorka jažice su uz pomoć pipete isprane plavim katodni puferom. U prvu jažicu dodano je 5 µL markera molekulske mase, a u ostale 10 µL uzoraka proteina dMUT QacR različitih koncentracija. Uzorci su pripremljeni tako što su u količine od 10 i 15 µL ekstrakta proteina dMUT QacR dodane različite količine pufera za uzorke (2, 5 i 10 µL). Nakon dodatka pufera u ekstrakt proteina, uzorci su pažljivo resuspendirani pipetom. Posudica s gelom ispunjena je do vrha jažica plavim katodnim puferom, a u kadicu za elektroforezu dodan je anodni pufer. Elektroforeza se provodi na sobnoj temperaturi. Prvih 15 minuta primjenjuje se napon struje od 40 V, a nakon toga na 80 V do kraja eksperimenta. Kada razina boje dostigne do 2/3 gela, plavi katodni pufer zamijeni se katodnim puferom koji u svom sastavu ne sadrži CBB G-250. Ovaj korak je važan kako bi se

kasnije spriječilo prekomjerno taloženje boje tijekom prijenosa na membranu. Elektroforeza se nastavi sve dok fronta plave boje ne dođe do dna gela za razdvajanje. Po završetku elektroforeze proteini su preneseni na PVDF membrane.

2.2.3.3. Prijenos proteina i imunodetekcija

Nakon što su uzorci pročišćenog proteina analizirani s BN-PAGE, bilo je potrebno potvrditi da su vrpce dobivene na gelu protein dMUT QacR. Uzorci proteina razdvojeni BN-PAGE elektroforezom se s gela prenesu na poliviniliden difluorid (PVDF) membranu u puferu za transfer (25 mM Tris, 192 mM glicin, 10 % metanol). U posudu s puferom za transfer postavljen je plastični okvir (kaseta) za prijenos s tamnom stranom prema dolje. Na njega je stavljena spužvice i filter papir te je sve dobro namočeno u puferu za transfer. Na namočeni filter papir slaže se redom: PVDF membrana, BN-PAGE gel i zatim još jedan namočeni filter papir i spužvica pazeći pri tome da nigdje ne zaostanu mjehurića zraka. Sendvič za transfer se učvrsti unutar plastičnog kalupa (Slika 7.) te se postavi između katode i anode u uspravnu kadiku za transfer. Kadica za transfer se ispuni transfer puferom i pusti se struja jakosti 100 mA oko 60 minuta.



Slika 7. Prikaz načina slaganja "sendviča" za transfer : a = plastični okvir b = spužva c = filter papir d = gel e = membrana. Preuzeto iz M. Krsnik-Rasol *et al.*, Elektroforetske tehnike istraživanja proteina, PMF Biološki odsjek, 2004./2005.

Nakon prijenosa na PVDF membranu, prisutnost proteina dMUT QacR potvrđivana je imunodetekcijom. Sastav pufera korištenih za imunodetekciju naveden je u Tablici 5. PVDF membrana blokirana je u TBS-BSA puferu. Ovaj korak je važan kako bi se blokirala mjesta na membrani na kojima nema proteina i na taj način reduciralo nespecifično vezanje protutijela na proteine ili membranu. Nakon blokiranja, membrana se inkubira s primarnim protutijelom (Anti-6X His tag® antibody [AD1.1.10] 250ug) u TBS-Tween puferu 60 minuta na tresilici, a potom se ispiru 5 puta po 15 minuta u TBS-Tween puferu. Sekundarno protutijelo (Goat Anti-

Mouse IgG H&L (HRP) 500ug) razrijedi se 20 000 puta u TBS-Tween puferu s dodatkom 5 % mlijeka u prahu. U pripremljenu otopinu sekundarnog protutijela inkubira se membrana 60 minuta, potom se membrana ponovno ispiri 5 puta po 15 minuta u TBS-Tween puferu.

Tablica 5. Sastav pufera korištenih za imunodetekciju

Puferi	
TBS	50 mM Tris
	150 mM NaCl
TBS-Tween	TBS
	0,05 % Tween-20
TBS-BSA	TBS
	5 % BSA

Protein dMUT QacR vizualiziran je kemiluminiscencijskom reakcijom. U tamnoj boci pomiješa se 1 mL otopine A i 1 mL otopine B potrebnih za kemiluminiscenciju (engl. *enhanced chemiluminescence, ECL*), sastav otopina prikazan je u Tablici 6. U pripremljenoj otopini membrana se inkubira 60 minuta.

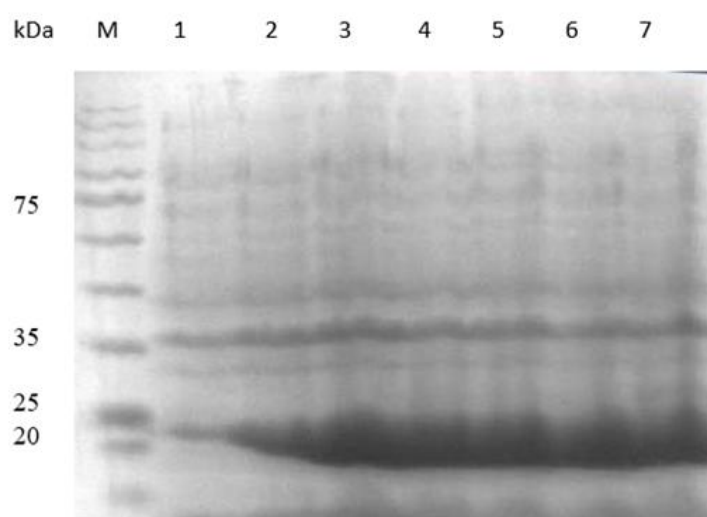
Tablica 6. Sastav otopina za kemiluminiscenciju

Sastojak	ECL otopina A	ECL otopina B
250 mM luminol	1 mL	-
90 mM p-kumarinska kiselina	0,44 mL	-
1 M tris-HCl	10 mL	10 mL
30 % vodikov peroksid	-	0,064 mL
voda	88,56 mL	89,936 mL

3. REZULTATI

3.1. Ispitivanje uvjeta ekspresije proteina dMUT QacR u kulturi bakterija *Escherichia coli* BL21(DE3) transformiranih plazmidom pET28b_qacR_dMUT

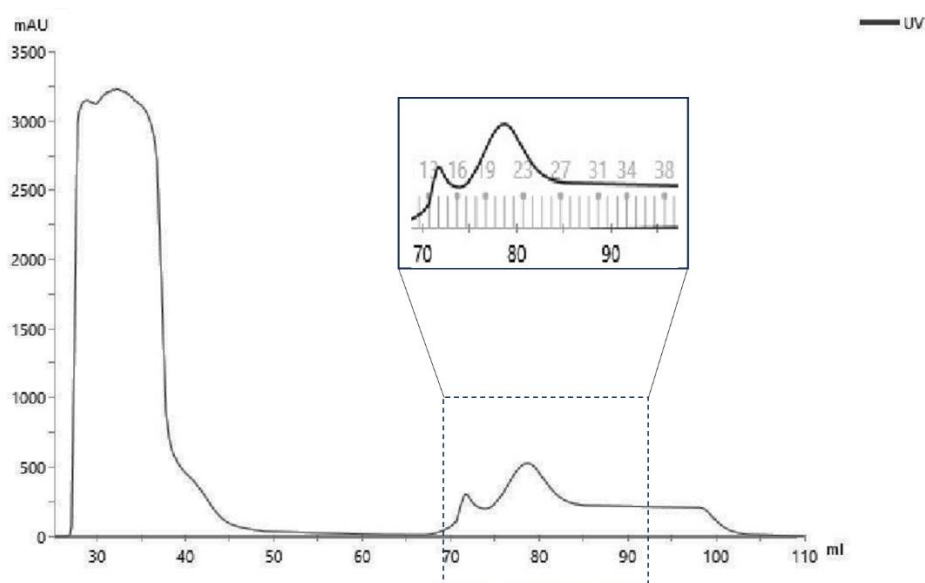
Optimalni uvjeti ekspresije dMUT QacR ispitani su koristeći bakterije *Escherichia coli* BL21(DE3) transformirane plazmidom pET28b_qacR_dMUT. Nakon što su bakterije dostigle logaritamsku fazu rasta, proizvodnja dMUT QacR inducirana je dodatkom IPTG-a. Uzorci bakterija sakupljani su prije i nakon indukcije, nakon čega je ukupni sadržaj proteina analiziran SDS-PAGE elektroforezom. Na Slici 8. može se uočiti da je u uzorku prije indukcije vidljiva tanka vrpca koja odgovara masi između 20 i 25 kDa, što odgovara teoretskoj molekularnoj masi proteina dMUT QacR s histidinskim privjeskom (~ 23 kDa) [7]. Iz toga se može zaključiti da i prije dodatka IPTG-a dolazi do niske razine ekspresije željenog proteina. U uzorcima uzetim 1, 2 i 3 sata nakon indukcije IPTG-om, vrpce na očekivanom području za monomer QacR proteina postaju intenzivnije, dok se prinos eksprimiranog proteina ne povećava značajno u uzorcima uzetim nakon 3 sata od indukcije. Na temelju ovih rezultata, zaključujemo da se dostatna količina željenog proteina proizvede 3 sata nakon indukcije IPTG-om. Ovi uvjeti primijenjeni su kod pročišćavanja dMUT QacR na sustavu za brzu tekućinsku kromatografiju proteina (engl. *fast protein liquid chromatography*, FPLC).



Slika 8. Gel nakon SDS-PAGE elektroforeze uzoraka uzetih prije i poslije indukcije ekspresije IPTG-om. Na gel su naneseni: M – marker molekulske mase, 1 – uzorak uzet prije indukcije, 2 – uzorak uzet 1 sat nakon indukcije, 3 – uzorak uzet 2 sata nakon indukcije, 4 – uzorak uzet 3 sata nakon indukcije, 5 – uzorak uzet 4 sata nakon indukcije, 6 – uzorak uzet 5 sati nakon indukcije, 7 – uzorak uzet 16 sati nakon indukcije.

3.2. Afinitetna kromatografija na uređaju FPLC (eng. *Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC)

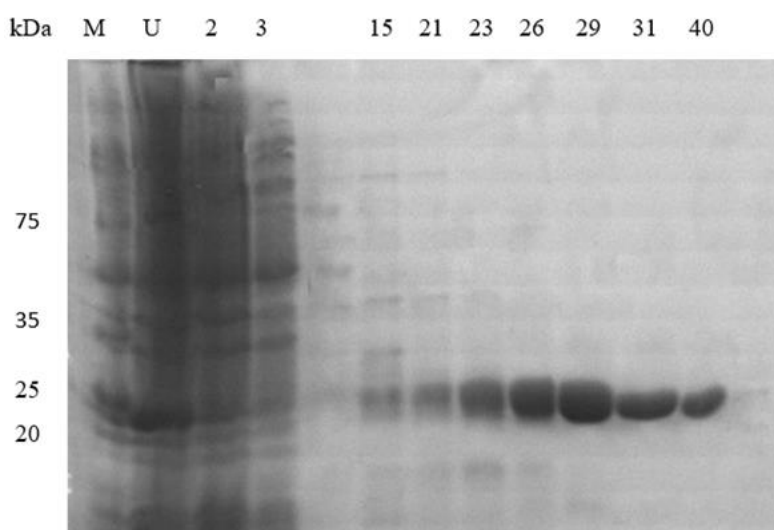
Zahvaljujući histidinskom biljegu, protein dMUT QacR mogao se izolirati jednostavnom afinitetnom kromatografijom uz pomoć HisTrapHP kolone. Tijekom nanošenja ekstrakta staničnih proteina na kolonu, dMUT QacR se specifično vezao na Ni^{2+} ione stacionarne faze kolone. Tijekom kromatografije mjerena je apsorbancija frakcija koje izlaze s kolone te je na taj način opažena prisutnost proteina u uzorku. Tijek kromatografije može se pratiti na kromatogramu koji je prikazan na Slici 9.



Slika 9. Kromatogram tijekom pročišćavanja na *HisTrap* HP koloni supernatanta nakon lize bakterijskih stanica. Na apscisi je prikazan volumen pufera za ispiranje u mL, a na ordinati apsorbancija u mAU (eng. *mili absorbance unit*) detektirana pri 280 nm

Za provjeru uspješnosti pročišćavanja proteina dMUT QacR afinitetnom kromatografijom prikupljani su uzorci tijekom ispiranja nespecifično vezanih staničnih proteina s kolone te tijekom elucije. Uzorci su analizirani SDS-PAGE elektroforezom, dobiveni gel nakon elektroforeze prikazan je na Slici 10. Na ovom gelu može se uočiti da uzorak ukupnih staničnih proteina koji nisu pročišćeni afinitetnom kromatografijom sadrži proteine u širokom rasponu masa. Također, i linije na gelu koje potječu od frakcija 2 i 3, dobivene ispiranjem nespecifično vezanih staničnih proteina, sadrže proteine u širokom rasponu masa. Kod svih linija na gelu koje potječu od eluiranih frakcija, može se uočiti da se najizraženija vrpca nalazi na području između 20 i 25 kDa, što odgovara masi monomera dMUT QacR. Eluirana frakcija 15 na gelu pokazuje dodatne vrpce što je moguće posljedica velike koncentracije eksprimiranih proteina

koji se nisu uspjeli isprati u fazi ispiranja nespecifično vezanih proteina. Kod ostalih frakcija nema dodatnih vrpce. Iz toga je vidljivo da je pročišćavanjem afinitetnom kromatografijom dobiven ciljani protein željene čistoće i potvrđena je uspješnost pročišćavanja. Eluirane frakcije od 23 do 40 su spojene i koncentrirane te su korištene za daljnje ispitivanje oligomerizacijskog stanja dMUT QacR nakon pročišćavanja.



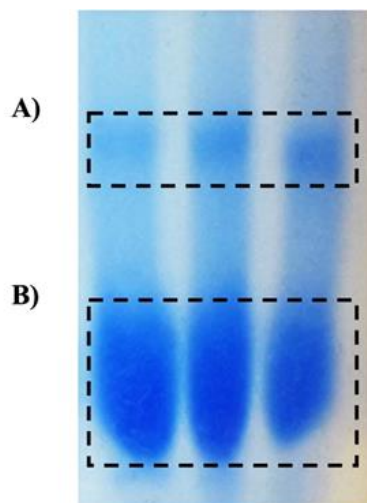
Slika 10. Gel nakon SDS-PAGE elektroforeze. Provjera uspješnosti afinitetne kromatografije. Na gel su nanoseni: marker molekularnih masa (M), uzorak ukupnih staničnih proteina uzet prije afinitetne kromatografije (U), frakcija staničnih proteina koji se nisu afinitetno vezali za kolonu (2 i 3), frakcije skupljene tijekom eluiranja dMUT QacR puferom B (15, 21, 23, 26, 29, 31, 40)

3.3. BN-PAGE elektroforeza i imunodetekcija

3.3.1. Optimizacija gela za BN-PAGE elektroforezu

Kako bi ispitali uvjete za uspješno razdvajanje proteina dMUT QacR BN-PAGE elektroforezom, bilo je potrebno ustanoviti odgovarajući sastav akrilamidnog gela. Akrilamidni gel pripremljen je od 12 % akrilamida u gelu za odjeljivanje i 4 % akrilamida u gelu za sabijanje. U jažice gela nanoseni su uzorci različitih koncentracija proteina dMUT QacR koji je bio skladišten na -70°C oko godinu dana i frakcija koje su nakon kromatografije inkubirane na sobnoj temperaturi. Rezultati nakon provođenja BN-PAGE elektroforeze prikazani su na Slici 11. Na gelu na slici možemo uočiti da je u sve tri linije uspješno razdvojen monomer (~ 23 kDa) i dimer (~ 46 kDa) proteina dMUT QacR. Kako se ovaj sastav gela pokazao povoljan za razdvajanje proteina od interesa, napravljeno je još nekoliko elektroforeza s gelom istog

sastava. Nakon ponovnog dobivanja uspješnih rezultata odlučeno je da će se gel ovog sastava koristiti za analizu dMUT QacR nakon ekspresije i pročišćavanja afinitetnom kromatografijom.

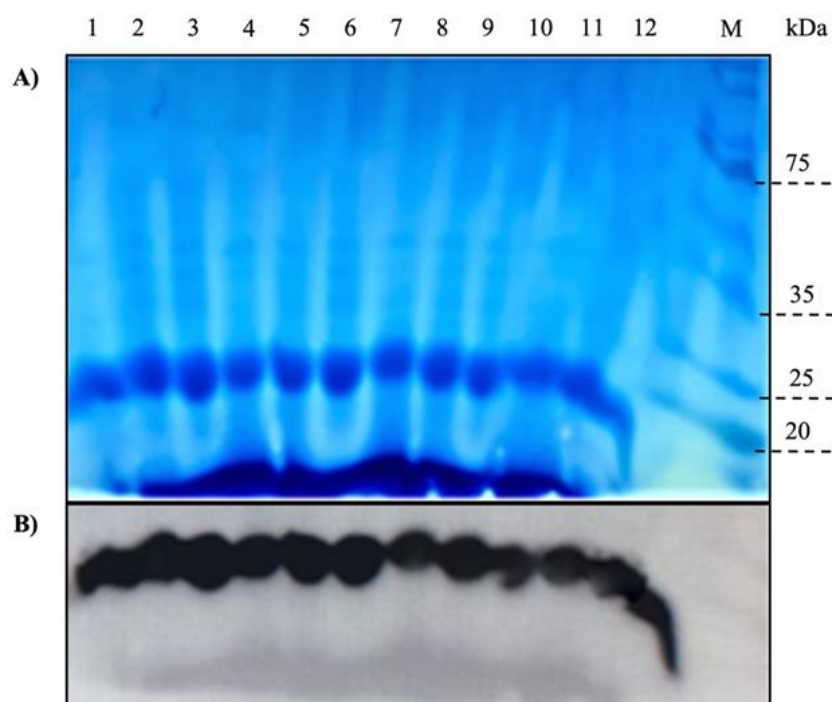


Slika 11. Probni gel nakon BN-PAGE elektroforeze. Na gel su nanaseni: uzorci dMUT QacR proteina različitih koncentracija u sve tri jažice. Dimerni oblik (A) i monomerni oblik proteina dMUT QacR (B) nakon provedene BN-PAGE elektroforeze vizualizirani bojom Coomassie Brilliant Blue.

3.3.2. BN-PAGE elektroforeza uzoraka dMUT QacR nakon pročišćavanja postupkom afinitetne kromatografije

Nakon što je određen sastav gela na kojem se uspješno može analizirati protein dMUT QacR BN-PAGE elektroforezom, pripremljen je gel i na njega su nanaseni uzorci QacR proteina odmah nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom. Na gel su nanesene različite koncentracije QacR proteina koji je nakon kromatografije dodatno koncentriran, također su nanesene različite koncentracije uzoraka koji nisu dodatno koncentrirani. Dodatno koncentrirani (jažice 1-9) i uzorci koji nisu dodatno koncentrirani (jažice 10-12) uspješno su vizualizirani na gelu nakon BN-PAGE elektroforeze (Slika 12, A). Iako su u jažice nanošene različite koncentracije proteina, nakon elektroforeze nema značajne razlike u debljinama vrpca na gelu za koje se pretpostavlja da se u njima nalazi proteina dMUT QacR. Kao proteinski standard za BN-PAGE korišten je isti marker molekulske mase kao i za SDS-PAGE BLUEye Prestained Protein Ladder. Nakon BN-PAGE elektroforeze uočeno je kako korišteni marker nije pogodan za ovaj tip elektroforeze. Najizraženije vrpce kod svih uzoraka proteina, osim uzorka 12, nalaze se između 20 i 25 kDa, što odgovara masi monomera dMUT QacR. Kod uzorka 12 možemo primijetiti da je došlo do izlijevanja uzorka iz gela i dio proteina iz 12. jažice je tijekom vizualizacije izgubljen.

Za potvrdu uspješnosti razdvajanja proteina dMUT QacR BN-PAGE elektroforezom, proteini s gela prenose na PVDF membranu, obilježavaju protutijelima i vizualiziraju kemiluminiscencijom. Rezultati imunodetekcije proteina dMUT QacR, koji je odmah nakon pročišćavanja podvrgnut BN-PAGE elektroforezi, prikazani su na Slici 12, B. Imunodetekcijom je potvrđeno da je protein dMUT QacR razdvojen BN-PAGE elektroforezom kao monomer i nije uočena prisutnost dimera.

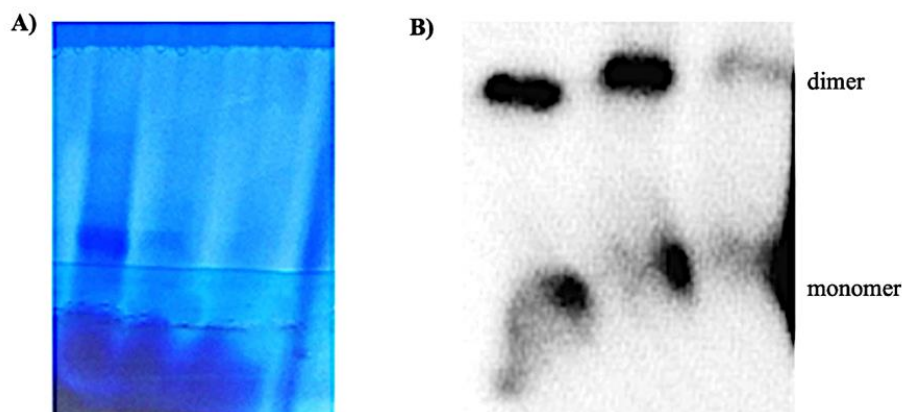


Slika 12. (A) Gel nakon BN-PAGE elektroforeze svježe pročišćenog proteina. Na gel su nanoseni: uzorci dMUT QacR proteina različitih koncentracija koji su nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom dodatno koncentrirani (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), uzorci dMUT QacR proteina koji nisu dodatno koncentrirani (10, 11, 12) te marker molekulskih masa (M). (B) Imunodetekcija i vizualizacija proteinskih vrpca kemiluminiscencijom nakon BN-PAGE elektroforeze.

3.3.3. BN-PAGE elektroforeza različitih uzoraka proteina dMUT QacR

Nakon afinitetne kromatografije pročišćeni protein dMUT QacR pohranjen je na -20°C . Za potrebe ovog rada, a kako bi analizirali utjecaj uvjeta pohrane na oligomerizacijsko stanje proteina, jedan alikvot ostavljen je na sobnoj temperaturi. Nakon mjesec dana ovaj uzorak dMUT QacR podvrgnut je BN-PAGE elektroforezi. U tri jažice gela nanosen je protein različitih koncentracija. Na Slici 13, A može se vidjeti slika BN-PAGE gela tijekom izvođenja elektroforeze. Po završetku elektroforeze, proteini su preneseni na PVDF membranu, koja je tretirana anti-His protutijelom (Slika 13, B). Nakon kemiluminiscentne vizualizacije, na

membrani su specifično obilježene vrpce koje detektira anti-His protutijelo, a koje dokazuju prisustvo dMUT QacR u dvije forme. Jedna forma odgovara dimeru, a druga forma monomeru ovog proteina.



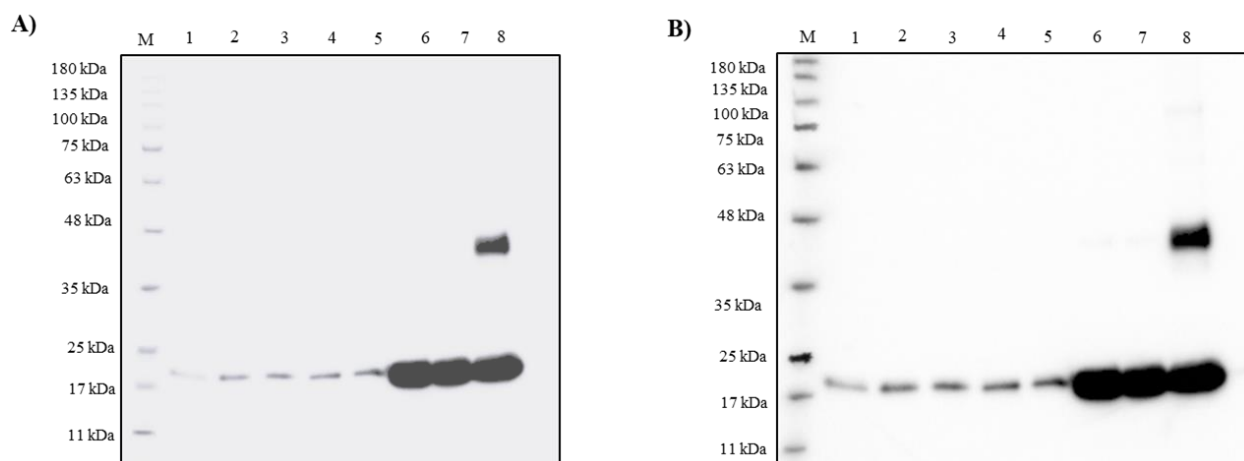
Slika 13. BN-PAGE elektroforeza dMUT QacR čuvanog mjesec dana na sobnoj temperaturi (A), Imunodetekcija i vizualizacija proteinskih vrpce dMUT QacR nakon prijenosa na PVDF membranu s označenim položajima monomera, odnosno dimera (B).

3.3.4. SDS-PAGE elektroforeza različitih uzoraka proteina dMUT QacR

Uzorci proteina phranjeni na -20°C i alikvot ostavljen na sobnoj temperaturi nakon mjesec dana od pročišćavanja podvrgnuti su SDS-PAGE elektroforezi. Na gel su nanesene različite koncentracije uzorka proteina pohranjenog na -20°C (jažice 1-7) i proteina pohranjenog na sobnoj temperaturi (jažica 8). Na Slici 14., A može se vidjeti gel nakon SDS-PAGE elektroforeze. Kod svih uzoraka na gelu prisutna je vrpca na $\sim 23\text{ kDa}$ koja odgovara masi monomera dMUT QacR. Kod uzorka čuvanog na sobnoj temperaturi (jažica 8) može se uočiti dodatna vrpca na $\sim 46\text{ kDa}$.

Kako bi potvrdili da su vrpce na gelu zaista vrpce proteina dMUT QacR, proteini s gela preneseni su na PVDF membranu koja je tretirana anti-His protutijelom (Slika 14., B). Nakon kemiluminiscentne vizualizacije potvrđena je prisutnost dMUT QacR u dvije forme i to samo u uzorku proteina pohranjenom na sobnoj temperaturi. Budući da se SDS-PAGE elektroforeza provodi u denaturirajućim uvjetima, identifikacija dimernog oblika proteina svakako je neočekivani ishod. S obzirom na dobiveni rezultat, tj. na postojanje dimera dMUT QacR koji ostaje očuvan u SDS-PAGE elektroforezi, može se zaključiti da su protein-protein interakcije

u slučaju dMUT QacR brojne tako da dimer ostaje očuvan u denaturirajućim uvjetima.



Slika 14. (A) Gel nakon SDS-PAGE elektroforeze dMUT QacR pohranjenog mjesec dana. Na gel su naneseni: uzorci dMUT QacR različitih koncentracija (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), uzorak proteina čuvanog na sobnoj temperaturi (8) te marker molekulskih masa (M). **(B)** Imunodetekcija i vizualizacija proteinskih vrpca dMUT QacR nakon prijenosa na PVDF membranu. Slika gela i PVDF membrane ustupljena je ljubaznošću Ivana Blaževića, mag. mol. biol.

4. RASPRAVA

Prije same analize oligomerizacijskog stanja transkripcijskog regulatora QacR BN-PAGE elektroforezom, bilo je potrebno eksprimirati i pročititi protein. Za ekspresiju proteina poslužio je soj bakterije *Escherichia coli* BL21(DE3) transformiran plazmidom pET28b-qacR_dMUT. Proteinski produkt ovog plazmidnog konstrukta je protein dMUT QacR kojemu su izmijenjen dva cisteinska ostatka (Cys⁷² i Cys¹⁴¹) odgovorna za formiranje multimernih QacR oblika tijekom pročišćavanja i skladištenja. Izmjena ove dvije aminokiseline osigurava bolje uvjete pročišćavanja i skladištenja. Zahvaljujući heksahistidinskom biljegu na N-terminalnom kraju proteina dMUT QacR, ciljani protein pročišćen je jednostavnom afinitetnom kromatografijom uz pomoć HisTrapHP kolone. Kolona za ovaj oblik kromatografije punjena je agaroznim matriksom na koji je vezana Ni²⁺-nitrilotrioctena kiselina (Ni-NTA). Ni-NTA ima veliki afinitet prema histidinu. Kada je filtrirani stanični lizat nakon ekspresije QacR proteina propušten kroz kolonu, protein dMUT QacR s heksahistidinskim biljgom vezao se za Ni²⁺ ione. Ostali proteini isprani su puferom A koji sadrži nisku koncentraciju imidazola. Protein dMUT QacR otpušten je s kolone u gradijentu pufera B, koji sadrži veću koncentraciju imidazola. Imidazol se snažnije veže za Ni²⁺ nego što se veže histidin te je s kolone istisnuo protein dMUT QacR heksahistidinskim biljgom. Učinkovitost afinitetne kromatografije i čistoća dobivenog proteina analizirana je s SDS-PAGE elektroforezom. Analizom gela na Slici 9 uočeno je da se u elucijskoj frakciji 15, osim vrpce proteina dMUT QacR (~23 kDa) mogu uočiti i vrpce drugih proteina. Uzrok ovomu je vjerojatno veliki volumen ekstrakta staničnih proteina nanesen na kolonu (12 mL). Ova situacija se vjerojatno mogla izbjeći da se kolona nakon nanošenja uzorka isprala s većim volumenom pufera A. No unatoč tome, analizirajući ostale frakcije na gelu potvrđeno je da je dobiven protein odgovarajuće čistoće.

Za razliku od jednostavnog i široko primjenjivog protokola za SDS-PAGE elektroforezu, korištenje BN-PAGE elektroforeze obično zahtijeva optimizaciju uvjeta razdvajanja za odgovarajući uzorak [36]. Stoga je prije razdvajanja pročišćenog dMUT QacR proteina s BN-PAGE, bilo potrebno ispitati sastav gela pogodan za njegovo razdvajanje. BN-PAGE se često izvodi na gradijentnim gelovima, no u ovom radu odlučeno je ispitati primjenjivost ne-gradijentni gel. Protokol za pripremu gradijentnog gela [36] modificiran je kako bi se pripremio ne-gradijentnog gela. Planirano je bilo ispitivati različite koncentracije akrilamida u gelu za sabijanje, no odmah prvi pripremljeni gel sastavljen od 4 % akrilamida u gela za sabijanje i 12 akrilamida u gela za odjeljivanje pokazao se pogodan za razdvajanje dMUT QacR proteina

(Slika 10). Pripravljan je diskontinuirani gel kako bi se postigla što bolja rezolucija gela tijekom BN-PAGE elektroforeze. Prednost diskontinuiranog gela je ta što se na gel mogu nanositi relativno velike količine uzorka koje se tijekom putovanja kroz gel za sabijanje koncentriraju u tanku zonu. Oštrija proteinska traka na početku elektroforeze rezultira i oštrijim proteinskim trakama nakon elektroforeze. Na probni gel nanošeni su uzorci dMUT QacR-a koji su bili pohranjeni oko godinu dana u hladnjaku na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, zatim su stajali na sobnoj temperaturi nekoliko dana. Na probnom gelu može se vidjeti da je uspješno razdvojen monomerni i dimerni oblik dMUT QacR-a.

Razdvajanjem dMUT QacR proteina s BN-PAGE elektroforezom odmah nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom vidljivo je da se najizraženija vrpca na gelu nalazi na području molekulske mase između 20 i 25 kDa (Slika 10), što odgovara monomeru dMUT QacR. BN-PAGE elektroforza ne pruža izravne informacije o identitetu proteina, stoga je imunoblotom s anti-His protutijelima bilo potrebno potvrditi da je protein razdvojen na gelu dMUT QacR. Nakon prijenosa proteina s gela na PVDF membranu, obilježavanja proteina protutijelima i vizualizacije kemiluminiscencijom potvrđeno je da je protein dMUT QacR, koji je odmah nakon pročišćavanja analiziran BN-PAGE elektroforezom, razdvojen kao monomer (Slika 11). Iako je nativni oblik proteina QacR dimer, u nekom koraku prilikom izolacije i pročišćavanja nativni dimer monomerizira. Gel filtracijom i nativom elektroforezom, Grkovic i suradnici dobili su jednak rezultat u radu u kojem je za istraživanje korišten divlji tip proteina QacR koji sadrži dva izrazito reaktivna cisteina (Cys⁷² i Cys¹⁴¹) [7]. U ovom radu korišten mutirani tip proteina QacR s zamijenjenim cisteinima na položajima Cys⁷² i Cys¹⁴¹ unatoč tome BN-PAGE elektroforezom, uzoraka odmah nakon pročišćavanja, dobiveni su jednaki rezultati.

Alikvot pročišćenih proteina koji je ostavljen na sobnoj temperaturi i nakon mjesec dana analiziran s BN-PAGE elektroforezom pokazuje značajno drugačije rezultate. Nakon imunoblota s anti-His protutijelima i vizualizacije kemiluminiscencijom, osim monomera dMUT QacR uočena je prisutnost dimera (Slika 12). Ovaj rezultat, jasno je pokazao da je protein na sobnoj temperaturi i u puferu pohrane stabilan te da se stajanjem spontano formira dimer čak i bez prisutstva prirodnog liganda (DNA).

Oligomerizacijsko stanje starijih uzoraka pročišćenog proteina dMUT QacR ispitano je i SDS-PAGE elektroforezom. Analizom gela nakon ove elektroforeze (Slika 13), kod svih uzoraka uočena je vrpca na $\sim 23\text{ kDa}$ koja odgovara monomeru dMUT QacR. No kod uzorka čuvanog na sobnoj temperaturi uočena je još jedna vrpca na $\sim 46\text{ kDa}$ koja odgovara dimeru dMUT QacR. Imunoblot analizom potvrđeno je da vrpce potječu od monomernog i dimernog oblika

dMUT QacR. Ovaj rezultat je pomalo neočekivan s obzirom da je u denturirajućim uvjetima određeni dio dimera dMUT QacR ostao očuvan. S obzirom na ove rezultate možemo zaključiti da spontana dimerizacija nije uvjetovana stvaranjem disulfidnih veza, već vjerojatno velikom dodirnom površinom koju dijele dva dimera.

5. ZAKLJUČAK

- Proteini dMUT QacR obilježeni heksahistidinskim biljekom uspješno su pročišćeni metodom afinitetne kromatografije uz pomoć HisTrap HP kolone.
- Diskontinuirani gel za BN-PAGE elektroforezu sastavljen od 4 % akrilamida u gelu za sabijanje i 12% akrilamida u gelu za odijeljivanje pogodan je za razdvajanje proteina dMUT QacR.
- Proteini dMUT QacR analizirani BN-PAGE elektroforezom odmah nakon pročišćavanja, migriraju u gelu kao monomeri, dimerni oblici nisu detektirani.
- Uzorak proteina dMUT QacR čuvan na sobnoj temperaturi mjesec dana, analiziran BN-PAGE elektroforezom sadrži monomerni i dimerni oblik proteina
- Uzorak proteina dMUT QacR čuvan na sobnoj temperaturi mjesec dana, analiziran SDS-PAGE elektroforezom sadrži monomerni i dimerni oblik proteina.

6. LITERATURA

1. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18:268-81.
2. Costa, S. S., Viveiros, M., Amaral, L., Couto, I. (2013). Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J*, 7:59-71.
3. Alekshun, M. N., Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128: 1037-50.
4. Majumder, P., Khare, S., Athreya, A., Hussain, N., Gulati, A., Penmatsa, A. (2019). Dissection of protonation sites for antibacterial recognition and transport in QacA, a multi-drug efflux transporter. *J Mol Biol*, **431**(11):2163–2179.
5. Dashtbani-Roozbehani, A., Brown, M. H. (2021) Efflux Pump Mediated Antimicrobial Resistance by *Staphylococci* in Health-Related Environments: Challenges and the Quest for Inhibition. *Antibiotics*, 10, 1502.
6. Lekshmi, M., Ammini, P., Adjei, J., et al. (2018). Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. *AIMS Microbiol*, 4(1):1-18
7. Grkovic, S., Brown, M. H., Roberts, N. J., Paulsen, I. T., Skurray, R. A. (1998). QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J. Biol. Chem.* 273, 18665–18673
8. Taylor, T. A., Unakal, C. G. (2022). *Staphylococcus aureus*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan
9. Brooks, B. E., Piro K. M., Brennan R. G. (2007) Multidrug-binding transcription factor QacR binds the bivalent aromatic diamidines DB75 and DB359 in multiple positions. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 8389–8395.
10. Mitchell, B. A., Brown, M. H., Skurray, R. A. (1998). QacA Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus*: Comparative Analysis of Resistance to Diamidines, Biguanidines, and Guanyldrazones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(2), 475–477.
11. Schumacher, M. A, Miller, M. C, Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A., Brennan R. G. (2002). Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. *EMBO J.* Mar 1;21(5):1210-8.

12. Ramos, J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:326–356.
13. Colclough, A. L., Scadden, J., Blair, J. M. A. (2019). TetR-family transcription factors in Gram-negative bacteria: conservation, variation and implications for efflux-mediated antimicrobial resistance. *BMC Genomics* 20, 731
14. Cuthbertson, L., Nodwell, J. R., (2013). The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev.* 77(3):440–75.
15. Takeuchi, K., Imai, M., Shimada, I. (2019). Conformational equilibrium defines the variable induction of the multidrug-binding transcriptional repressor QacR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 116:19963–19972.
16. Schumacher, M. A, Miller, M. C, Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A., Brennan R. G. (2002). Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. *EMBO J.* Mar 1;21(5):1210-8.
17. Grkovic, S., Brown, M. H., Schumacher, M. A., Brennan, R. G., Skurray, R. A., (2001) The staphylococcal QacR multidrug regulator binds a correctly spaced operator as a pair of dimers. *J. Bacteriol.* 183, 7102–7109
18. Schumacher, M. A, Miller, M. C, Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A., Brennan R. G. (2001). Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* 294, 2158–2163
19. Balen B. 2016. Promjene u ekspresiji biljnih proteina izazvane nanočesticama srebra. *Educ. biol.*, 2:115-131
20. van Schaick, G., Haselberg, R., Somsen, G. W., Wuhrer, M, Domínguez-Vega, E. (2022). Studying protein structure and function by native separation-mass spectrometry. *Nat Rev Chem.* Mar;6(3):215-231.
21. Diéguez-Casal, E., Freixeiro, P., Costoya, L., Criado, M. T., Ferreirós, C., Sánchez, S. (2014). High resolution clear native electrophoresis is a good alternative to blue native electrophoresis for the characterization of the Escherichia coli membrane complexes. *Journal of Microbiological Methods*, 102, 45–54.
22. Krsnik-Rasol, M., Balen, B., Maček, B., Pavoković, D. Elektroforetske tehnike istraživanja proteina (2004/2005), interna skripta
23. Dráb, T., Kračmerová, J., Tichá, I., Hanzlíková, E., Tichá, M., Ryšlavá, H., ... Liberda, J. (2011). Native Red Electrophoresis - A new method suitable for separation of native proteins. *ELECTROPHORESIS*, 32(24), 3597–3599.

24. Schagger, H., von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, 199(2), 223–231.
25. Wittig, I., Schagger, H. (2009). Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *PROTEOMICS*, 9(23), 5214–5223.
26. Randelj O. A., Rassow, J., Motz, C. (2009). Separation of Proteins by Blue Native Electrophoresis (BN-PAGE). *The Protein Protocols Handbook*, 201–210.
27. Crichton, P. G., Harding, M., Ruprecht, J. J., Lee, Y., Kunji, E. R. (2013). Lipid, detergent, and Coomassie Blue G-250 affect the migration of small membrane proteins in blue native gels: mitochondrial carriers migrate as monomers not dimers. *J Biol Chem*. Jul 26;288(30):22163-73.
28. Yan, L. J., Forster, M. J. (2009). Resolving mitochondrial protein complexes using nongradient blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 389:143–149.
29. Wittig, I., Braun, H. P., Schagger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1, 418–428
30. Yan, L. J., Yang, S. H., Shu, H., Prokai, L., Forster, M. J. (2007). Histochemical staining and quantification of dihydrolipoamide dehydrogenase diaphorase activity using blue native PAGE. *ELECTROPHORESIS*, 28(7), 1036–1045.
31. Schagger, H., Cramer, W. A., and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis *Anal. Biochem.* 217, 220–230
32. Eubel, H., Braun, H. P., Millar, A. (2005). Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods* 1, 11
33. Ayutthaya, P. P., Lundberg, D., Weigel, D., Li, L. (2020) Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for the analysis of protein oligomers in plants. *Curr Protoc Plant Biol* 5: e20107
34. Cubillos-Rojas, M., Schneider, T., Sanchez-Tena, S., Bartrons, R., Ventura, F., Rosa, J.L. (2016). Analysis of Protein Oligomerization by Electrophoresis. In: Matthiesen, R. (eds) *Proteostasis. Methods in Molecular Biology*, vol 1449. Humana Press, New York, NY.
35. Konovalova, S. (2019). Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes in Cultured Human Cells using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Immunoblotting. *Journal of Visualized Experiments*, no. 144 , 59269 .

36. Arndt, C., Koristka, S., Feldmann, A., & Bachmann, M. (2018). Native Polyacrylamide Gels. *Electrophoretic Separation of Proteins*, 87–91.
37. Krause, F. (2006). Detection and analysis of protein–protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *ELECTROPHORESIS*, 27(13), 2759–2781.

METODIČKI DIO

Priprema za izvođenje nastavnog sata

Škola: Gimnazija

Predmet: Kemija

Razred: 4.

Nastavna tema: Proteini

Tematska cjelina: Kemija odabranih biomolekula

Cilj sata : Upoznati učenike s građom i funkcijom proteina

Jezični termini koje su učenici trebali ranije usvojiti:

aminokiseline, peptidi, peptidna veza, denaturacija

Jezični termini koje treba usvojiti tijekom ove nastavne jedinice:

primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura proteina, nativna konformacija proteina

Temeljni koncepti (temeljne ideje):

Proteini su polipeptidi velike molekulske mase izgrađeni od velikog broja aminokiselina. Struktura proteina organizirana je u četiri razine i ona je ključna za funkciju proteina. Primarna, sekundarna, tercijarna i ponegdje kvaterna struktura omogućuju nastajanje oblika proteina koji najbolje odgovara biološkoj ulozi i naziva se nativnom (prirodnom) konformacijom. Denaturiranje je proces narušavanja nativne konformacije, ali se pri tom ne narušava primarna struktura proteina.

Ishodi učenja:

Učenici nakon odrađenog sata:

I-1 Opisati građu proteina

I-2 Razlikovati primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu strukturu proteina

I-3 Povezati prostornu građu proteina s njihovom biološkom funkcijom

Zadatak/pitanje za provjeru ishoda učenja:

I-1 Što se dokazuje biuret reakcijom?

I-2 Usporedite strukture mioglobina i hemoglobina prikazane na slici., Koje razine strukture proteina opažete na slici?

I-3 Zbog čega je povišena tjelesna temperatura opasna za zdravlje?

Poveznica submikroskopskog i makroskopskog „svijeta“:

Bjelanjak tijekom kuhanja poprima drugačiji izgled i svojstva, uzrok tomu je narušavanje kvaterne, tercijarne i sekundarne strukture proteina što je posljedica pucanja vodikovih veza, disulfidnih veza i slabljenja ionskih međudjelovanja i van der Waalsovih privlačenja zbog dovođenja topline.

Artikulacija (pregledni nacrt nastavnog sata):

STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA	AKTIVNOSTI UČENIKA	SOCIOLOŠKI OBLIK RADA	TRAJANJE
<i>Uvod</i>	slušanje, uspoređivanje, zaključivanje	frontalni rad	5 min
<i>Obrada</i>	opažanje, zaključivanje, uspoređivanje, analiziranje, slušanje, pisanje,	frontalni rad, rad u skupinama	35 min
<i>Ponavljanje</i>	pisanje, proučavanje, primjenjivanje, analiziranje	samostalni rad frontalni rad	10 min

Izvori znanja

Izvor znanja		Konkretan opis što se želi postići svakim od navedenih izvora znanja (navesti prednosti i eventualne nedostatke izvora znanja)
<i>tip</i>	<i>Značenje</i>	
<i>pokus 1</i>	biuret reakcija	Pokusom se želi dokazati prisutnost proteina u uzorcima
<i>slika 1</i>	prikaz kompleksa koji nastaje biuret reakcijom	Slikom se želi pojasniti zašto plava boja biuret reagensa postaje ljubičasta/ružičasta u otopinama u kojima su otopljeni proteini.
<i>slika 2</i>	prikaz primarne strukture proteina	Iz slike učenici trebaju opaziti da primarna struktura podrazumijeva samo vrstu, broj i redoslijed aminokiselina
<i>animacija 1</i>	α -uzvojnica	Animacijom se želi pojasniti formiranje α -uzvojnica

animacija 2	β - nabrana ploča	Animacijom se želi pojasniti formiranje β - nabranih ploča
slika 3	tercijarna struktura proteina	Na slici učenici trebaju opaziti da tercijarna struktura daje prostor i međusoban odnos i vrlo udaljenih aminokiselina u lancu
slika 4	prikaz strukture mioglobina i hemoglobina	Slikom se želi ukazati na razlike između tercijarne i kvaterne strukture proteina
slika 5	prikaz QacR proteina	Slikama se želi potaknuti na razmišljanje o važnosti native konformacije proteina za njegovu biološku funkciju.
slika 6	prikaz QacR proteina vezanog za DNA	
pokus 2	zagrijavanje bjelanjka	Pokusom se želi potaknuti na promišljanje o denaturaciji proteina

Ključni pojmovi

KLJUČNI POJAM	Detaljan opis kako će se učenici dovesti do razumijevanja ključnog pojma (u opisu navesti nastavne metode, spoznajne postupke, oblike rada, slike, dijagrame, animaciju...)
proteini	Učenici izvođenjem pokusa biuret reakcija u skupinama dolaze do spoznaje da se biuret reakcijom može potvrditi prisutnost proteina u uzorku. Promatrajući Sliku 1, učenici uviđaju da bakrovi ioni iz biuret reagensa stvaraju komplekse s peptidnim vezama i povezuju da su proteini polipeptidi.
jednostavni i konjugirani proteini	Tijekom obrade nastavnog sadržaja navodim definiciju i razlike između jednostavnih i konjugiranih proteina. Kroz zadatak iz listića za ponavljanje učenici samostalno istražuju proteine i razvrstavaju ih prema sastavu.
primarna struktura proteina	Prikazujem Sliku 2 i pitam učenike što vide na slici (redoslijed aminokiselina). Učenici gledajući sliku opažaju da se primarna struktura proteina odnosi na redoslijed aminokiselina povezanih peptidnim vezama.
sekundarna struktura proteina	Pitam učenike što misle jesu li proteini izgrađeni od slijeda aminokiselina povezanih peptidnim vezama bez interakcija među tim aminokiselinama, te koje bi veze mogle nastajati između aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Opisujemo sekundarnu strukturu kao prostornu građu polipeptidnog lanca nastalu zbog međumolekulskih vodikovih veza između peptidnih skupina.

α - uzvojnica i β - nabrana ploča	Prikazujem učenicima animacije α - uzvojnice i β - nabrana ploče i pitam ih koju razliku uočavaju. Zaključujemo da se α - uzvojnice formira kada vodikove veze nastaju unutar istog lanca, dok se struktura β - nabrana ploče nabrane ploče postiže kada se vodikove veze stvaraju između dva lanca.
tercijarna struktura proteina	Prikazujem sliku tercijarne strukture proteina (Slika 3) i pitam učenike što vide na slici. Postavljam pod pitanja i dolazimo do zapažanja da tercijarna struktura daje prostorni razmještaj i međusoban odnos i vrlo udaljenih aminokiselina u lancu i da je stabilizirana nekovalentnim interakcijama kao što su vodikove veze, ionska međudjelovanja i van der Waalsova privlačenja, ali i kovalentnim vezama kao što su disulfidne veze, –S–S–.
kvaterna struktura proteina	Prikazujem učenicima prikaz strukture mioglobina (Slika 4) i pitam ih koja bi to bila strukturna razina (tercijarna), zatim prikazujem i sliku strukture hemoglobina i tražim učenike da zaključe što bi to bila kvaterna struktura proteina.
nativna (prirodna) konformacija proteina	Prikazujem učenicima sliku proteina QacR, objašnjavam da je to jedan protein iz bakterije <i>S. aureus</i> koji sudjeluje u regulaciji ekspresije jednog proteina koji je odgovoran za rezistenciju ove bakterije na antibiotike. Prikazujem sliku na kojoj je QacR protein vezan za DNA i pitam učenike da razmisle bi li bilo moguće vezanje ovog proteina za DNA da je drugačije strukturiran. Zaključujemo da je nativna konformacija proteina, ona konformacija koja najbolje odgovara biološkoj ulozi proteina.
denaturiranje proteina	Denaturiranje proteina objašnjavam uz pomoć demonstracije zagrijavanja bjelanjka. U epruvetu ulijevam bjelanjak koji zagrijavam na vatri. Pitam učenike da opaze i obrazlože promjene. Dolazimo do pojma denaturacije i uz pomoć dodatnih primjera zaključujemo da je denaturacija najčešće nepovratan proces (koagulacija), a ponekad je ipak moguće renaturiranje.

Tijek nastavnog sata

UVOD: Pozdravljam učenike i započinjem razgovor o povišenoj tjelesnoj temperaturi. Pitanjima ih dovodim do odgovora da povišena temperatura može dovesti do denaturacije proteina. Nastavljamo razgovor o proteinima u našem tijelu i zaključujemo da su proteini vrlo važni za izgradnju i funkciju našeg tijela. Pitam učenike što znaju o Alzheimovoj bolesti i kroz razgovor zaključujemo da je pravilna struktura proteina važna za njihovu biološku aktivnost. Najavljujem učenicima da ćemo na ovome satu govoriti o proteinima i njihovoj strukturi te pišem naslov na ploču.

OBRADA: Učenicima dijelim radne listiće i dajem upute za izvođenje učeničkog pokusa. Učenici izvode pokus u skupinama i samostalno popunjavaju radni listić, koji odmah zatim

provjeravamo. Po završetku pokusa definiramo da su proteini polipeptidi velikih molekulskih masa izgrađeni od velikog broja aminokiselina. Navodim da se proteini prema sastavu dijela na jednostavne, koje u svom sastavu imaju samo aminokiseline, i konjugirane, u kojima je proteinski dio vezan za neproteinsku prostetičku skupinu. Nakon toga proučavamo četiri razine strukture proteina, analizirajući slike i animacije zajednički ih opisujemo. Važnost native konformacije objašnjavam na primjeru proteina QacR. Izvodim demonstracijski pokus zagrijavanja bjelanjka iz jajeta za objašnjavanje denaturacije proteina.

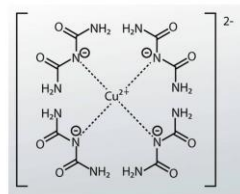
PONAVLJANJE: Učenici samostalno rješavaju radni listić koji zajedno provjeravamo.

Prilozi:

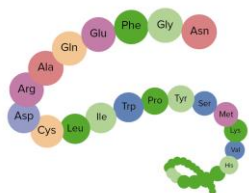
1) PowerPoint prezentacija

Pokus 1. Biuret reakcija

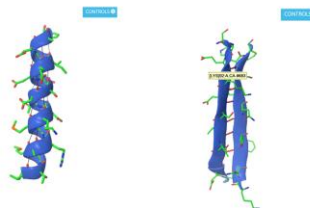
PROTEINI



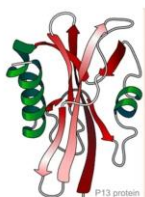
Primarna struktura proteina



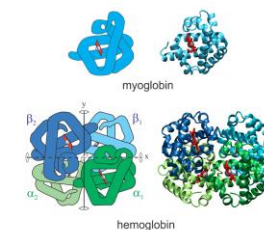
Sekundarna struktura proteina



Tercijarna struktura proteina



Kvaternarna struktura proteina



	Radni listić	Zapišite zapažanja:
Pokus 1. Biuret reakcija	Pribor i kemikalije:	
	<ul style="list-style-type: none">• bjelanjak jajeta• mlijeko• voćni sok• destilirana voda• vodena otopina natrijeva klorida/ fiziološka otopina ($w = 0,9 \%$)• natrijeva lužina ($w = 20 \%$)• otopina bakrova(II) sulfata• četiri epruvete• stalak za epruvete• stakleni štapić• čaša od 250 mL	
	Napomena: Obavezno nošenje rukavica i zaštitnih naočala	
	Postupak:	
	1) Bjelanjak jajeta istucite staklenim štapićem.	
	2) U tučeni bjelanjak ulijte 100 mL vodene otopine natrijeva klorida.	
	3) U 1. epruvetu ulijte se 2 mL destilirane vode, u 2. epruvetu ulijte se 2 mL otopine bjeljanka, u 3. epruvetu ulijte se 2 mL mlijeka, a u 4. se epruvetu ulijte 2 mL razrijeđenog voćnog soka.	
	4) U svaku se epruvetu oprezno dodajte 2 mL otopine natrijeve lužine i jednu kap otopine bakrova(II) sulfata.	
	5) Pažljivo promućkajte sadržaj svake epruvete.	
		Razmišljajući o opažanjima odgovorite na sljedeća pitanja: 1) U kojim epruvetama opažaš da se dogodila pozitivna biuret reakcija?

LISTIĆ ZA PONAVLJANJE

1. Istraži strukturu navedenih proteina i prema sastavu razvrstaj ih na jednostavne i konjugirane. Uz konjugirane proteine upiši koju prostetičku skupinu sadrže.

ALBUMIN, CITOKROM, MUCIN, MIOZIN, FERITIN, KERATIN, MIOGLOBIN

Jednostavni:

Konjugirani:

2. Suha kosa kraća je od kose oprane u vrućoj vodi. Razmisli i obja
sni ovu pojavu.

3. Navedi primjere gdje se u industrijskoj proizvodnji koristi dena
turacija proteina?

Literatura:

1. A. Habuš, M. Barić Tominac, A. Dragobratović, S. Liber, A. Kučak, D. Bajić (2019). Kemija 4, udžbenik kemije za četvrti razred gimnazije, PROFIL Klett
2. Biology Online. <https://www.biologyonline.com/dictionary/biuret-test> (pristupljeno 5.7.2023.)
3. Chem Tube 3D. <https://www.chemtube3d.com/bc-26-3-2/> (pristupljeno 5.7.2023.)
4. *Journal of Biological Physics*. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-structures-of-myoglobin-and-hemoglobin-Images-on-right-show-polypeptide_fig1_356146404 (pristupljeno 5.7.2023.)
5. PROTEIN DATA BANK. <https://www.rcsb.org/> (pristupljeno 5.7.2023.)

