

## 2. ANALIZA JAKOŚCIOWA AMINOKWASÓW. ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA BIAŁEK

### 2.1. Analiza jakościowa aminokwasów

Spośród około 200 aminokwasów występujących w przyrodzie jedynie 20 stanowi budulec białek. Aminokwasy spełniają też inne funkcje lub są prekursorami w syntezie związków istotnych dla życia. Na przykład glicyna jest prekursorem w syntezie porfiryn; glicyna, glutamina i kwas asparaginowy – w syntezie puryn, a glutamina i kwas asparaginowy także w syntezie pirymidyn. Glicyna, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy a także GABA (kwas  $\gamma$ -aminomasłowy, produkt dekarboksylacji kwasu glutaminowego) są neuroprzekaźnikami. L-DOPA (L-3,4-dihydroksyfenyloalanina), produkt hydroksylacji tyrozyny jest prekursorem w syntezie innych neuroprzekaźników: dopaminy i adrenaliny. S-adenozylometionina jest donorem grup  $-\text{CH}_3$  w wielu reakcjach metylacji zachodzących w komórce. Warto pamiętać o cytrulinie i ornitynie – dwóch aminokwasach cyklu mocznikowego; ornityna jest także prekursorem poliamin (putrescyny, spermidyny, sperminy). Arginina jest substratem w syntezie tlenku azotu – najmniejszej cząsteczki regulatorowej w organizmie. Trijodotyronina i tyroksyna (hormony tarczycy) – to także aminokwasy – pochodne tyrozyny.

Z wyjątkiem proliny (iminokwas) wszystkie aminokwasy białkowe są  $\alpha$ -aminokwasami (tzn. grupa aminowa występuje przy atomie węgla  $\alpha$ ). Oprócz glicyny – nieaktywnej optycznie, wszystkie są stereoizomerami szeregu konfiguracyjnego L. Poza grupą aminową i karboksylową każdy aminokwas ma charakterystyczną dla siebie resztę aminokwasową (R). Ze względu na podobieństwo właściwości chemicznych można podzielić reszty aminokwasowe na 4 grupy:

1. Hydrofobowe (występują w: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro);
2. Hydrofilowe, obojętne (występują w: Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln);
3. Hydrofilowe, kwaśne (występują w: Asp, Glu);
4. Hydrofilowe, zasadowe (występują w: Lys, Arg, His).

W roztworach wodnych aminokwasy są związkami amfoterycznymi, tzn. w zależności od pH roztworu mogą zachowywać się jak kwas (oddawać protony) lub zasada (przyjmować protony). W środowisku kwaśnym aminokwasy występują w formie bogatej w protony (grupa karboksylowa:  $-\text{COOH}$ , a grupa aminowa:  $-\text{NH}_3^+$ ). Gdy pH środowiska będzie wzrastać, to najpierw grupa  $-\text{COOH}$ , a później grupa  $-\text{NH}_3^+$  będą oddawać protony. W środowisku zasadowym grupa karboksylowa aminokwasu będzie występowała w formie  $-\text{COO}^-$ , a grupa aminowa w formie  $-\text{NH}_2$ . Dla każdego aminokwasu istnieje taka wartość pH, przy której aminokwas znajduje się w formie elektrycznie obojętnej. Tę wartość pH nazywamy punktem izoelektrycznym (pI). Nie znaczy to, że gdy pH roztworu jest równe pI aminokwasu, to ani grupy karboksylowe, ani grupy aminowe nie są zjonizowane, lecz że są zjonizowane w takim stopniu, że

wypadkowy ładunek aminokwasu wynosi zero. W przypadku aminokwasów posiadających niejonizujące reszty aminokwasowe (R) – aminokwas występuje wówczas w formie jonu obojnego ( $-\text{COO}^-$ ;  $-\text{NH}_3^+$ ).

Aminokwasy różnią się znacznie rozpuszczalnością w wodzie, najtrudniej rozpuszczalne są aminokwasy hydrofobowe. Aminokwasy białkowe nie pochłaniają światła widzialnego (są bezbarwne), natomiast trzy aminokwasy aromatyczne pochłaniają światło ultrafioletowe (głównie tyrozyna i tryptofan; maksimum absorpcji przy 280 nm), co wykorzystuje się przy ilościowym oznaczaniu zarówno tych aminokwasów, jak i większości białek.

Aminokwasy wolne oraz końcowe aminokwasy peptydów i białek reagują z różnymi związkami poprzez grupy  $\alpha$ -aminową i  $\alpha$ -karboksylową, dając szereg reakcji charakterystycznych dla tej grupy związków. Obecność specyficznych grup bocznych (wchodzących w skład reszt aminokwasowych) pozwala na wykrywanie i ilościowe oznaczanie niektórych aminokwasów na podstawie swoistych dla nich reakcji barwnych (np. dla aminokwasów aromatycznych, histydyny, tryptofanu, argininy czy cysteiny).

### ZAGADNIENIA DO OPRACOWANIA:

- Budowa, podział, właściwości chemiczne i fizyczne aminokwasów (student powinien umieć narysować wzory 20 aminokwasów białkowych oraz cytruliny i ornityny).
- Funkcje aminokwasów w organizmie.
- Peptydy i białka, właściwości chemiczne i fizyczne, wiązanie peptydowe (student powinien umieć narysować wskazany di- i tripeptyd).
- Struktura przestrzenna białek.
- Rozpuszczalność i wysalanie białek.
- Denaturacja i renaturacja białek.
- Funkcje biologiczne peptydów (m.in. glutationu, hormonów peptydowych).
- Funkcje biologiczne białek, białka proste i złożone (przykłady).
- Zasady wszystkich wykonywanych na ćwiczeniach oznaczeń.

#### 2.1.1. Reakcja ninhydrynowa

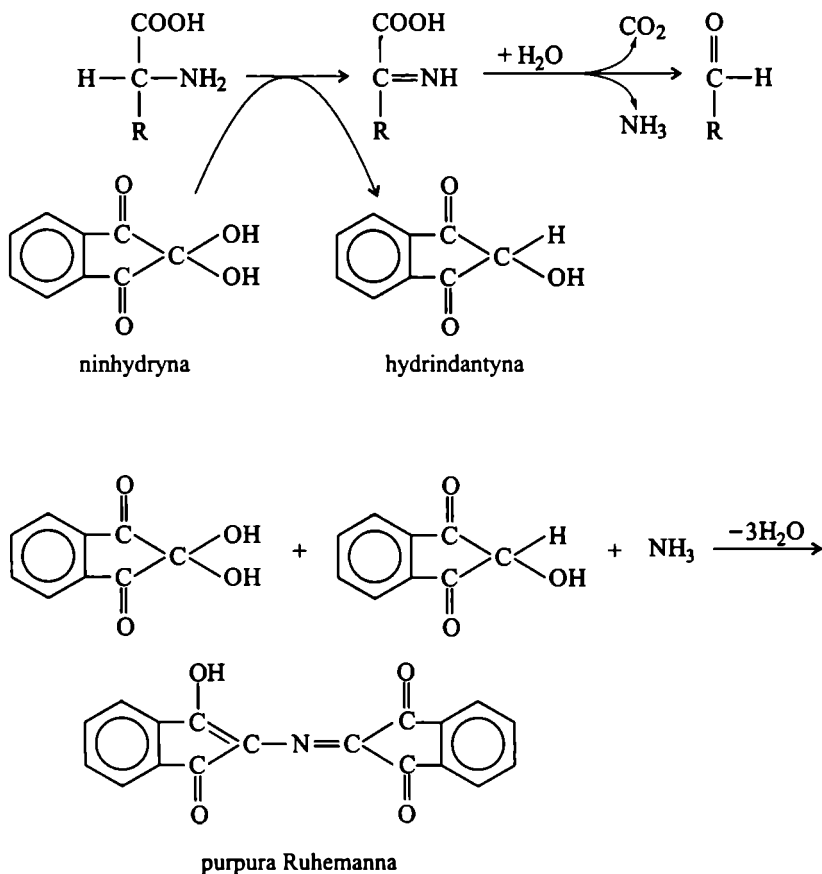
##### ZASADA:

Aminokwasy ogrzewane z roztworem ninhydryny (wodzian triketohydrindenu) ulegają dekarboksylacji i oksydatywnej deaminacji. W reakcji tej powstaje aldehyd uboższy o jeden atom węgla od aminokwasu, amoniak oraz dwutlenek węgla, a ninhydryna zostaje zredukowana do hydrindantyny. Cząsteczka hydrindantyny łączy się z amoniakiem i cząsteczką ninhydryny dając niebieskofioletkowy związek tzw. purpurę Ruhemanna. Intensywność powstałej barwy jest proporcjonalna do zawartości wolnych grup  $\alpha$ -aminowych w próbce. Prolina i hydroksyprolina, aminokwasy, które nie zawierają grupy  $\alpha$ -aminowej, dają z ninhydryną kompleksy innego typu, o barwie żółtej. Reakcja ninhydrynowa pozwala na ilościowe oznaczenie aminokwasów. Należy jednak pamiętać, że reakcja ninhydrynowa jest specyficzna nie tylko dla aminokwasów, ale i dla innych związków zawierających pierwszorzędową grupę aminową.

Barwny produkt reakcji z ninhydraną dają więc również m.in. peptydy, białka, a nawet sole amonowe i amoniak.

### WYKONANIE:

Do 1 ml 0,1% roztworu glicyny dodać 0,5 ml 0,1% roztworu ninhydryny w 50% etanolu. Próbkę ogrzać do wrzenia. Pojawia się niebieskofioletkowe zabarwienie. Analogiczną próbę przeprowadzić dla 1% roztworu proliny. Porównać wyniki.



### 2.1.2. Wykrywanie aminokwasów aromatycznych. Reakcja ksantoproteinowa

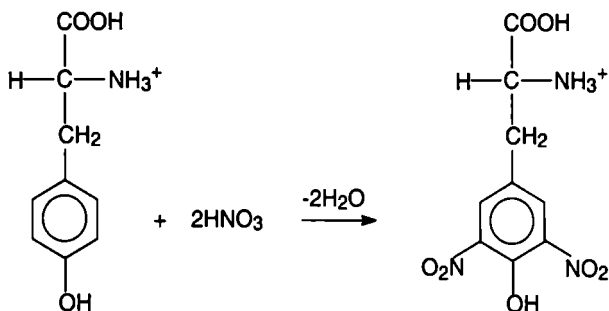
#### ZASADA:

Podczas ogrzewania ze stężonym kwasem azotowym aminokwasy aromatyczne ulegają reakcji nitrowania dając żółto zabarwione pochodne nitrowe. Po zalkalizowaniu powstają pochodne intensywniej zabarwione.

#### WYKONANIE:

Do 0,5 ml 0,1% roztworu tyrozyny dodać 1 ml stężonego HNO<sub>3</sub> i lekko podgrzać. Roztwór przyjmuje barwę żółtą. Po oziębieniu zalkalizować próbkę 30% NaOH (UWAGA: reakcja silnie egzotermiczna).

Pojawia się zabarwienie żółtopomarańczowe. Analogiczną próbę przeprowadzić dla surowicy  $10 \times$  rozcieńczonej solą fizjologiczną (0,9% NaCl). Porównać wyniki.



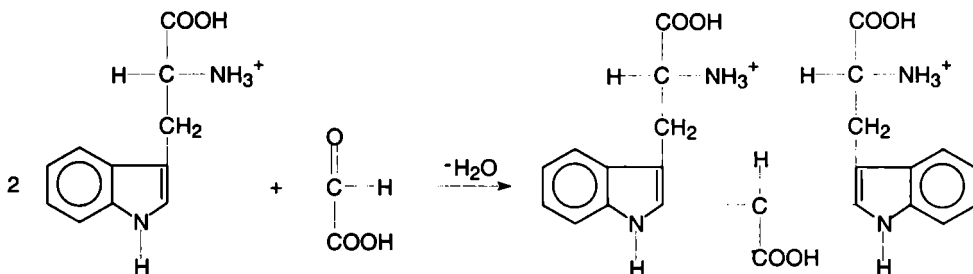
### 2.1.3. Wykrywanie układu indolowego. Reakcja Adamkiewicza-Hopkinsa

#### ZASADA:

W środowisku stężonych kwasów nieorganicznych związki zawierające układ indolowy ulegają kondensacji z aldehydami np. z aldehydem mrówkowym (reakcja Voiseneta) lub z kwasem glioksalowym (reakcja Adamkiewicza-Hopkinsa), tworząc barwne kompleksy.

#### WYKONANIE:

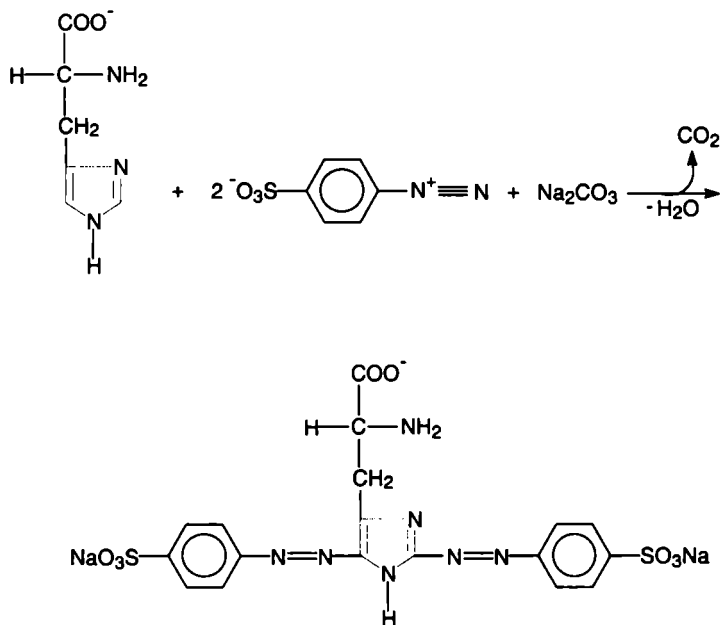
Do 1 ml 0,5% roztworu tryptofanu dodać 1 ml roztworu kwasu glioksalowego i podwarstwzić jednym mililitrem stężonego  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Na granicy faz tworzy się fioletowy pierścień. Analogiczną próbę przeprowadzić dla 2% roztworu albuminy i 2% roztworu żelatyny (co to jest żelatyna?). Porównać i na podstawie literatury wyjaśnić wyniki.



### 2.1.4. Wykrywanie układu imidazolowego. Reakcja Pauli'ego

#### ZASADA:

W środowisku alkalicznym pierścień imidazolowy histydyny ulega reakcji sprzężenia z jonem *p*-sulfobenzenodiazoniowym, tworząc pomarańczowy barwnik azowy.



## WYKONANIE:

Do 5 ml 0,5% kwasu sulfanilowego dodać 0,5 ml 0,5% roztworu  $\text{NaNO}_2$ , chłodząc probówkę w zimnej wodzie – powstaje roztwór soli diazoniowej. Zalkalizować roztwór za pomocą  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  *in subst.*, sprawdzając pH roztworu papierkiem wskaźnikowym, a następnie przenieść po około 2,5 ml do probówek zawierających: (1) 1 ml 0,5% roztworu histydyny, (2) 1 ml surowicy 10 × rozcieńczonej solą fizjologiczną. Tworzy się pomarańczowe zabarwienie.

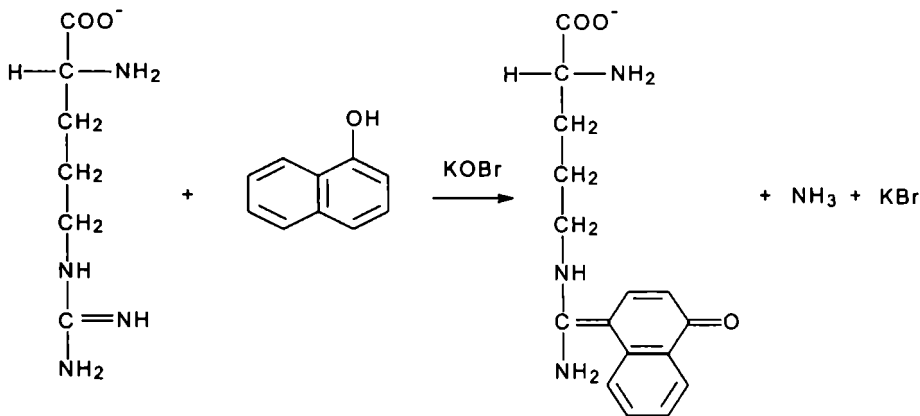
### 2.1.5. Wykrywanie układu guanidynowego. Odczyn Sakaguchi'ego

#### ZASADA:

W obecności bromianu (I) sodu lub potasu jako utleniacza, grupa guanidynowa argininy tworzy z  $\alpha$ -naftolem pomarańczowoczerwony barwnik. Prawdopodobny przebieg reakcji i strukturę powstałego związku przedstawia poniższy rysunek. Mocznik stabilizuje utworzony barwnik.

#### WYKONANIE:

Do 2 ml 0,1% roztworu argininy dodać 2 ml 10%  $\text{NaOH}$  i kilka kropli 0,2% alkoholowego roztworu  $\alpha$ -naftolu. Wymieszać energicznie, dodać 0,5 ml bromianu (I) sodu i ponownie wymieszać. Dodać 1 ml 40% mocznika dla stabilizacji pojawiającego się pomarańczowoczerwonego barwnika. Analogiczną próbę przeprowadzić dla surowicy rozcieńczonej 10 razy solą fizjologiczną.



## 2.1.6. Wykrywanie grup tiolowych. Reakcja z nitroprusydkiem sodu

### ZASADA:

Związki zawierające grupy tiolowe (-SH) tworzą z nitroprusydkiem sodu połączenia kompleksowe o czerwono-fioletowym zabarwieniu.



### WYKONANIE:

Do 1 ml świeżo przygotowanego 0,1% roztworu cysteiny dodać 1 ml 1% roztworu nitroprusydku sodu. Nasycić roztwór siarczanem amonu i powoli dodawać amoniaku w celu zalkalizowania próbki. Po osiągnięciu zasadowego odczynu pojawia się czerwono-fioletowe zabarwienie. Analogiczną próbę przeprowadzić dla surowicy rozcieńczonej 10 razy solą fizjologiczną.

## 2.2. Analiza jakościowa i ilościowa białek

Białka to bardzo różnorodna grupa związków pełniących w organizmie i w każdej żywej komórce podstawowe funkcje. Stanowią substancje budulcowe, elementy kurczliwe, enzymy, hormony, cząsteczki transportujące, receptory komórkowe, czynniki wzrostu i różnicowania komórek, regulatory funkcji komórkowych, czynniki transkrypcyjne, substancje odpowiedzialne za odporność organizmu, substancje zapasowe, toksyny i inne.

Białka są związkami makrocząsteczkowymi. Mogą być zbudowane z jednego lub kilku łańcuchów polipeptydowych zawierających od 100 do ponad 1000 aminokwasów. Masy cząsteczkowe białek wyraża się zwykle w daltonach (Da) lub kilodaltonach (kDa) (1 kDa = 1000 Da; 1 Da = 1/12 masy izotopu węgla  $^{12}\text{C}$ ). Masy cząsteczkowe białek mieszczą się w szerokich granicach – od kilkunastu tysięcy do kilku milionów daltonów; np. masa cząsteczkowa lizozymu wynosi 14 kDa; albuminy – 68 kDa; a konektyny (tityny) – ponad 3800 kDa. Oprócz białek prostych, zbudowanych jedynie z aminokwasów, istnieją również białka złożone, takie jak np. glikoproteiny, lipoproteiny, metaloproteiny i chromoproteiny, zawierające trwale wbudowany składnik niebiałkowy: cukrowy, lipidowy, jon metalu lub naturalny barwnik. Opisu-

ją budowę białek wyróżnia się kilka poziomów organizacji ich struktury; mówimy o strukturze pierwszorzędowej, drugo-, trzecio- i czwartorzędowej. Struktura pierwszorzędowa białek to sekwencja aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym; sekwencję aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym podajemy zawsze od N-końca. Struktura drugorzędowa to rodzaj regularnego przestrzennego ułożenia łańcucha polipeptydowego. Struktura ta stabilizowana jest wiązaniami wodorowymi między grupami pochodzącymi z różnych wiązań peptydowych:

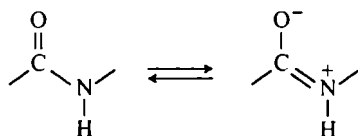


Najczęściej opisywanymi strukturami drugorzędowymi są  $\alpha$ -helisa i  $\beta$ -harmonijka. Struktura trzeciorzędowa to przestrzenne ułożenie całego łańcucha polipeptydowego. Jest ona stabilizowana przez wzajemne oddziaływania bocznych reszt aminokwasowych (oddziaływania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe, mostki disiarczkowe i in.). Pojęcie struktury czwartorzędowej dotyczy jedynie białek oligomerycznych czyli zbudowanych z kilku łańcuchów polipeptydowych (podjednostek). Struktura ta określa wzajemne położenia poszczególnych łańcuchów polipeptydowych. Białka oligomeryczne w zależności od ilości budujących je podjednostek mogą tworzyć dimery, trimery, tetramery itd; mogą one składać się z identycznych podjednostek tworząc np. homodimery lub z całkowicie różnych łańcuchów polipeptydowych tworząc np. heterotrimery.

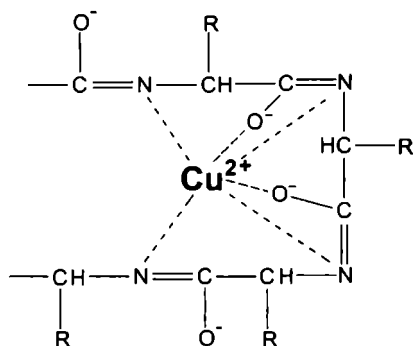
### 2.2.1. Ogólny odczyn na białka. Reakcja biuretowa (Piotrowskiego)

#### ZASADA:

Reakcja biuretowa jest charakterystyczna dla wiązań peptydowych, przy czym dają ją związki posiadające w cząsteczce co najmniej dwa takie wiązania. Nazwa metody pochodzi od biuretu (dimocznika), najprostszego związku spełniającego ten warunek. W środowisku zasadowym wiązanie peptydowe ulega tautomeryzacji i występuje w formie enolowej.



Jony miedzi ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ulegają skompleksowaniu przez enolowe formy wiązań peptydowych, a w kompleksach takich jony miedzi tworzą dwa wiązania jonowe z atomami tlenu oraz cztery wiązania koordynacyjne z atomami azotu. Kompleks ma barwę fioletową.



#### WYKONANIE:

Do 2 ml nierozcieńczonej surowicy dodać 2 ml 10%  $\text{NaOH}$  i kilka kropli 0,5%  $\text{CuSO}_4$ . Pojawia się fioletowa barwa. Wybierając

dowolny aminokwas sprawdzić, że reakcja biuretowa daje z aminokwasami wynik ujemny.

### 2.2.2. Wysalanie białek osocza

#### ZASADA:

Większość białek dobrze rozpuszcza się w wodzie lub w wodnych roztworach soli o niskim stężeniu. Wynika to z faktu oddziaływania grup polarnych białek z dipolowymi cząsteczkami wody, dzięki czemu cząsteczki białek ulegają hydratacji. Wysokie stężenia soli powodują jednak wypadanie białek z roztworu. Zjawisko to, nazywane wysalaniem białek, wynika z tego, że jony dobrze rozpuszczalnych soli konkurują z cząsteczkami białek o cząsteczki wody. Ponieważ jony tych soli znacznie silniej oddziałują z wodą niż białka, to odciągają płaszcz hydratacyjny białek powodując wytrącenie ich z roztworu. Do wysalania białek używa się takich soli obojętnych, których jony tworzą hydraty, np. siarczanu amonu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Wysalanie białek jest procesem odwracalnym. Obniżenie stężenia soli w roztworze przez dodanie czystej wody lub w wyniku dializy powoduje ponowne rozpuszczenie białek. Białka różnią się między sobą rozpuszczalnością oraz podatnością na wysalanie, tzn. różne białka ulegają wysoleniu pod wpływem różnych stężeń soli. Proces wysalania najłatwiej przebiega w pH równym punktowi izoelektrycznemu danego białka (dlaczego?). Wysalanie stosuje się często do wstępnego frakcjonowania mieszanin białek, np. białek osocza. Przy 25% nasyceniu siarczanem amonu z osocza wysala się głównie fibrynogen, przy 50% nasyceniu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wysoleniu ulega większość globulin (np. immunoglobuliny), a do wysolenia albumin i niektórych dobrze rozpuszczalnych globulin (np. niektórych glikoprotein) wymagane jest 80% nasycenie  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Zwróć uwagę, że procent nasycenia nie jest równy procentowości roztworu! Np. roztwór  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  o 100% nasyceniu to roztwór 76,7% (w/o).

#### WYKONANIE:

Do 3 ponumerowanych probówek typu Eppendorf (o objętości 2 ml) odmierzyć po 0,5 ml osocza i do poszczególnych probówek dodać:

- nr 1: 0,17 ml nasyconego roztworu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (końcowe nasycenie = 25%);
- nr 2: 0,5 ml nasyconego roztworu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (końcowe nasycenie = 50%);
- nr 3: 1,5 ml nasyconego roztworu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (końcowe nasycenie = 75%).

Zawartość probówek dokładnie wymieszać i odwirować (3 min, 14 000 obr./min); pamiętać o przygotowaniu 3 dodatkowych probówek przeciwwagowych zawierających tyle wody, aby zrównoważyć probówki nr 1, 2 i 3. Po zakończeniu wirowania porównać ilości osadów w poszczególnych probówkach. Zdekantować (zlać) nadsącz z probówki nr 2. Do osadu w probówce nr 2 (zawierającego fibrynogen i globuliny) dodawać porcjami wodę (po 100  $\mu\text{l}$ ) i rozpipetowywać osad. Zaobserwować przy jakiej objętości dodanej wody osad ulegnie całkowitemu rozpuszczeniu. Wyjaśnić dlaczego.



## 2.2.3. Denaturacja białek

### ZASADA:

Struktura, jaką przyjmuje dane białko w komórce (organizmie) i jaka umożliwia mu pełnienie określonych funkcji biologicznych nazywana jest natywną konformacją białka. Denaturacja białek to naruszenie lub zniszczenie tej struktury, pociągające za sobą utratę ich biologicznych aktywności (aktywności enzymów, hormonów, białek transportujących, czynników wzrostowych i in.). Denaturacja białek może zachodzić m.in. pod wpływem:

- wysokiej temperatury;
- mocnych kwasów nieorganicznych (np.  $\text{HNO}_3$ );
- mocnych zasad (np.  $\text{NaOH}$ ). Stężone zasady powodują denaturację białek – większość z nich pozostaje jednak w stanie rozpuszczonym w środowisku zasadowym. Zobojętnienie roztworu prowadzi do wytrącenia zdenaturowanego białka;
- niektórych kwasów organicznych (kwas trichlorooctowy, kwas sulfosalicylowy, kwas pikrynowy, kwas fosforowolframowy). W pH niższym od punktu izoelektrycznego białka obdarzone są ładunkiem dodatnim, niektóre kwasy organiczne tworzą z nimi nierozpuszczalne połączenia;
- rozpuszczalników organicznych – np. alkohole, aceton (w temperaturze pokojowej);
- kationów metali ciężkich ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ). W pH wyższym od punktu izoelektrycznego białka obdarzone są ładunkiem ujemnym, mogą więc reagować z kationami. Kationy metali ciężkich tworzą z białkami nierozpuszczalne kompleksy. Sole metali ciężkich stosuje się niekiedy w preparatyce białek.

Zdenaturowane białka są gorzej rozpuszczalne i często ulegają wytrąceniu z roztworu (zwłaszcza w pH bliskim pI danego białka). Właściwość tę wykorzystuje się do odbiałczania próbek (czyli do usuwania białka z próbek), w których chcemy badać związki drobnocząsteczkowe lub z których chcemy wyizolować inne związki. Do odbiałczania próbek osocza stosuje się często kwas trichlorooctowy (TCA), a wytrącone białko usuwa się przez odwirowanie próbek.

### 2.2.3.1. Denaturacja cieplna białek

#### WYKONANIE:

Do 1 ml surowicy rozcieńczonej 5 razy solą fizjologiczną dodać 1 kroplę 1% kwasu octowego (większość białek osocza ma pI < 7,0) i ogrzewać do wrzenia. Tworzy się biały kłaczkowaty osad. Po dodaniu niewielkiej ilości  $\text{NaCl}$  lub  $\text{MgSO}_4$  osad staje się wyraźniejszy (dlaczego?).

### 2.2.3.2. Działanie stężonego $\text{HNO}_3$ (odczyn Hellera)

#### WYKONANIE:

Na 1 ml stężonego  $\text{HNO}_3$  nawarstwić ostrożnie 0,5 ml surowicy rozcieńczonej 5 razy solą fizjologiczną. W miejscu zetknięcia się roztworów tworzy się biały pierścień zdenaturowanego i wytrąconego białka.

### 2.2.3.3. Działanie kwasu trichlorooctowego (TCA)

#### WYKONANIE:

Do próbki typu Eppendorf o objętości 2 ml dodać 0,5 ml surowicy rozcieńczonej 5 razy solą fizjologiczną i 0,5 ml 10% roztworu kwasu trichlorooctowego. Zaobserwować wytrącone kompleksy. Osad odwirować (3 min, 14 000 obr./min); należy pamiętać o przygotowaniu próbki zawierającej 1 ml wody do zrównoważenia próbki podczas wirowania. Zdekantować nasącz, a do osadu dodawać porcjami wodę (po 400  $\mu$ l) i rozpipetować osad. Czy osad ulega rozpuczeniu? Porównaj proces wysalania białek i denaturacji z wytrąceniem białka.

### 2.2.4. Oznaczanie ilościowe białka metodą Lowry'ego

Do ilościowego oznaczania substancji w próbkach biologicznych stosuje się najczęściej metody kolorymetryczne. W metodach tych reakcja chemiczna, w której substratem jest badana substancja, daje barwny produkt pochłaniający światło o określonej długości fali. Zgodnie z prawem Lamberta-Beera stężenie badanej substancji jest w pewnym zakresie stężeń proporcjonalne do absorbancji próbki.

$$A = \epsilon \times l \times c$$

gdzie: A – absorbancja (zdefiniowana w podrozdziale 1.1),  $\epsilon$  – molowy współczynnik absorpcji, l – grubość warstwy, przez którą przechodzi światło, c – stężenie molowe substancji.

Oczywiście wartość absorbancji jest wprost proporcjonalna do stężenia substancji wyrażonej także w innych jednostkach (np. mg/ml, stężenie procentowe, itd.). Wzór Lamberta-Beera można stosować w przypadku, gdy substancja, której stężenie chcemy oznaczyć pochłania światło o określonej długości fali, a w próbce nie znajdują się inne substancje pochłaniające światło o tej samej długości fali. Jeśli natomiast przeprowadzamy reakcję chemiczną, w której bierze udział badana substancja, a barwny jest produkt tej reakcji, to wartość absorbancji zależy nie tylko od stężenia badanej substancji, ale także od warunków reakcji. W takim przypadku stężenie substancji w próbce określamy na podstawie krzywej wzorcowej obrazującej zależność pomiędzy absorbancją, a stężeniem produktu powstałego w wyniku reakcji barwnej. Na przykład, gdy chcemy oznaczyć stężenie białka w próbce, przygotowujemy krzywą wzorcową, która obrazuje zależność absorbancji roztworów od różnych stężeń wzorcowego białka (najczęściej albuminy wołowej), na którym przeprowadziliśmy reakcję chemiczną. Równocześnie przeprowadzamy tę samą reakcję w naszych próbkach. Ponieważ reakcja zachodziła dokładnie w tych samych warunkach, stężenie białka w badanej próbce można odczytać z krzywej wzorcowej. Ponieważ reakcję dla próbek krzywej wzorcowej i próbek badanych prowadzi się w tej samej objętości, absorbancja próbek będzie proporcjonalna nie tylko do stężenia białka w próbce, ale także do ilości białka w próbce. Często na osi odciętych zaznacza się ilość substancji w próbce zamiast jej stężenia.

#### ZASADA:

Wiązanie peptydowe oraz aminokwasy aromatyczne reagują z odczynnikiem Folina-Ciocalteu, będącego mieszaniną kwasu fosforowolframowego i kwasu fosfomolibdenowego, w środowisku zasadowym w obecności jonów miedzi (II). Miedź związa-

na z białkiem oraz tyrozyna i tryptofan redukują powyższe kwasy do odpowiednich tlenków. Metoda Lowry'ego pozwala na oznaczenie białka nawet w stężeniu 50 µg/ml, jest więc około 20 razy bardziej czuła niż metoda biuretowa. Ponieważ poszczególne białka dają różne natężenie barwy z odczynnikiem Folina (np. trypsyna daje trzy razy większe natężenie barwy niż żelatyna o tym samym stężeniu), należy więc do oznaczeń stosować właściwe wzorce białkowe. Gdy jest to niemożliwe (np. gdy oznaczamy stężenie mieszaniny białek w próbce osocza, lizacie komórkowym czy innym preparacie zawierającym rozmaite białka) sporządzamy krzywą wzorcową w oparciu o różne stężenia albuminy, zdając sobie jednak sprawę z tego, że w ten sposób uzyskujemy przybliżone wartości stężenia białka. Trzeba pamiętać o tym, że fenole, nitrofenole a także w mniejszym stopniu puryny i pirymidyny, kwas moczowy oraz niektóre detergenty reagują z odczynnikiem Folina, zwiększając natężenie barwy. Natomiast takie związki jak  $ZnSO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $CCl_3COOH$ ,  $HClO_4$ , aceton, etanol, sacharoza, zależnie od stężenia obniżają intensywność barwy.

### WYKONANIE:

Na ćwiczeniach studenci będą oznaczać stężenie białka w surowicy wołowej. Oznaczenia ilościowe należy wykonywać w dwóch równoległych powtórzeniach. Oznaczając stężenie jakiegokolwiek substancji należy pamiętać, że krzywą kalibracyjną można stosować tylko w tym zakresie, w którym jest ona prostoliniowa. Przy bardzo dużych stężeniach badanej substancji dochodzi do utraty liniowości zależności absorbancji od stężenia substancji. Nie można również traktować jako rzetelne wyników, wskazujących na stężenie substancji niższe niż najniższe stężenie substancji użyte do sporządzenia krzywej kalibracyjnej.

### WYKONANIE A (z użyciem próbek i spektrofotometru):

Przygotowanie próbek do krzywej kalibracyjnej: Przygotować 13 próbek. Do pierwszej dodać 0,3 ml wody (ślepa odczynnikowa). Do pozostałych próbek (po dwie dla każdego punktu krzywej) dodać roztwór albuminy (o stężeniu 1 mg/ml) i wodę zgodnie z poniższą tabelką:

Po dwie próbki o numerach:	Objętość roztworu albuminy	Objętość wody
1	50 µl	250 µl
2	100 µl	200 µl
3	150 µl	150 µl
4	200 µl	100 µl
5	250 µl	50 µl
6	300 µl	0

Przygotowanie próbek badanych: Rozcieńczyć surowicę wołową 100 razy (np. dodając 10 µl surowicy do 990 µl wody); po rozcieńczeniu próbkę dokładnie wymieszać. Do dwóch próbek oznaczonych P1 dodać po 150 µl rozcieńczonej surowicy i po 150 µl wody, a do kolejnych dwóch, oznaczonych P2, dodać po 300 µl rozcieńczonej surowicy.

Wykonanie oznaczenia: Do wszystkich próbek (13 próbek krzywej kalibracyjnej oraz 4 próbki badane) dodać po 0,3 ml 1 M NaOH, a następnie 3 ml roztworu węglan-winian-CuSO<sub>4</sub> (świeżo przygotowanego przez studentów – patrz poniżej: Odczynniki), wymieszać i pozostawić na 15 min. Następnie dodać po 0,3 ml odczynnika Folina z jednoczesnym energicznym wytrząsaniem, gdyż, choć redukcja kwasu fosfomolibdenowego zachodzi szybciej przy pH około 10, w tych warunkach kwas ten jest nietrwały i ulega hydrolizie do kwasu fosforowego i molibdenowego. Po 30 min odczytać wartości absorbancji przy długości fali 500 nm wobec próby kontrolnej (ślepa odczynnikowa zawiera 0,3 ml H<sub>2</sub>O).

### WYKONANIE B (z użyciem mikro płytki testowej i czytnika do mikro płytek):

Oznaczanie stężeń substancji z wykorzystaniem mikro płytek testowych pozwala na zaoszczędzenie odczynników i czasu przeznaczanego na wykonanie oznaczenia.

Przygotować w dwóch kolejnych rzędach mikro płytki (np. rzędy A i B) rozcieńczenia albuminy zgodnie z poniższym schematem (górny wiersz wskazuje liczbę µl roztworu albuminy o stężeniu 1 mg/ml, dolny liczbę µl wody).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	3	6	9	12	15	18	10	15	0
20	17	14	11	8	5	2	10	5	20
krzywa kalibracyjna – albumina (1 mg/ml)							Pr1	Pr2	Φ

Rozcieńczyć surowicę wołową 50 razy (np. dodać 5 µl surowicy do 245 µl wody); dokładnie przepipetować roztwór. Do dwóch studzienek dodać po 10 µl rozcieńczonej surowicy (próbka badana) i 10 µl wody, a do dwóch kolejnych studzienek dodać po 15 µl rozcieńczonej surowicy i po 5 µl wody. Ostatnia para studzienek oznaczona na rysunku symbolem Φ stanowi ślepa odczynnikowa. Do wszystkich studzienek płytki, w których znajdują się roztwory białka lub ślepe odczynnikowe, dodać kolejno po 10 µl 1 M NaOH i po 100 µl roztworu węglan-winian-CuSO<sub>4</sub> (świeżo przygotowanego przez studentów – patrz poniżej: Odczynniki) i zawartość studzienek wymieszać przez delikatne przepipetowanie (bez tworzenia bąbelków). Inkubować płytkę przez 15 min w temperaturze pokojowej. Następnie do wszystkich studzienek dodać po 10 µl odczynnika Folina (dodając odczynnik zawartość studzienek przepipetować). Za każdym razem należy zmienić końcówkę, aby nie zanieczyścić białkiem odczynnika Folina. Po 30 min zmierzyć absorbancję próbek na czytniku do mikro płytek przy długości fali 500 nm wobec próby kontrolnej (ślepa odczynnikowa zawierająca 20 µl H<sub>2</sub>O zamiast surowicy).

### OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Obliczyć średnią absorbancję próbek ze sporządzonych duplikatów. Wykreślić krzywą kalibracyjną zależności absorbancji od zawartości białka w próbce. Pamiętać, że istotnym punktem krzywej jest punkt o współrzędnych (0, 0) – przy braku białka jakakolwiek barwa nie wynika z obecności białka! Dlatego pomiaru dokonuje się względem ślepej odczynnikowej. Można również zmierzyć absorbancję wszystkich

próbek (łącznie ze ślepą odczynnikową) względem wody i odjąć wartość absorbancji uzyskaną dla ślepej odczynnikowej od wszystkich pozostałych wartości (dla ślepej odczynnikowej, w której stężenie białka jest równe 0, uzyskalibyśmy wartość 0). Po wykreśleniu krzywej wzorcowej znaleźć wzór opisujący krzywą w jej odcinku prostoliniowym, a następnie obliczyć zawartość białka w badanych próbkach lub odczytać zawartość białka z wykreślonej krzywej wzorcowej. Uwzględniając ilość surowicy wziętej do badania oraz jej rozcieńczenie obliczyć stężenie białka w surowicy wołowej. Porównać wynik z oczekiwanym (surowica wołowa powinna zawierać 50–60 mg białka w jednym ml). Jeśli uzyskany wynik odbiega od oczekiwanego, spróbować wyjaśnić przyczynę rozbieżności.

### **ODCZYNNIKI:**

Do analizy aminokwasów: wodne 2% roztwory albuminy i żelatyny w 0,9% NaCl; 0,1% wodny roztwór glicyny; 1% wodny roztwór proliny; 0,1% roztwór tyrozyny w 0,1 M HCl; 0,5% roztwór tryptofanu w 0,1 M HCl; 0,5% wodny roztwór histydyny; 0,1% wodny roztwór argininy; 0,1% roztwór cysteiny w 0,1 M HCl; stężony  $H_2SO_4$ ; stężony  $HNO_3$ ; 30% NaOH; 10% NaOH; stężony  $NH_3$  *aq.*; 0,1% roztwór ninhydryny w 50% etanolu; kwas glioksalowy; 0,5% roztwór kwasu sulfanilowego w 2 M HCl; 0,5% roztwór  $NaNO_2$ ;  $Na_2CO_3$  *in subst.*; 1% wodny roztwór nitroprusydku sodu;  $(NH_4)_2SO_4$  *in subst.*; 0,2% etanolowy roztwór  $\alpha$ -naftolu; roztwór NaOBr: 0,62 ml bromu rozpuścić w 100 ml 5% NaOH; 40% roztwór mocznika.

Do analizy białek: 10% NaOH; 0,5% wodny roztwór  $CuSO_4$ ; roztwór nasycony  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,9% NaCl; 1% roztwór kwasu octowego; stężony  $HNO_3$ ;  $MgSO_4$  *in subst.*; NaCl *in subst.*; 10% roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA).

Odczynnik węglan-winian- $CuSO_4$  przygotowuje się bezpośrednio przed oznaczeniem, mieszając 1 ml 1% winianu sodowo-potasowego, 1 ml 0,5%  $CuSO_4$  i 98 ml 2%  $Na_2CO_3$ .

Odczynnik Folina-Ciocalteu jest stosowany w stężeniu 1 M (przygotowywany przez dwukrotne rozcieńczenie handlowo dostępnego roztworu 2 M).

### **MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:**

Do analizy aminokwasów: surowica lub osocze dializowane do 0,9% NaCl.

Do analizy białek: surowica i osocze (niedializowane).

Wirówka z rotorem na próbki typu Eppendorf, spektrofotometr, czytnik mikroplitek.