

Ćwiczenie nr B12

WPŁYW pH NA ROZPUSZCZALNOŚĆ BIAŁEK

I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie metodą spektrofotometryczną punktu izoelektrycznego kazeiny.

II. Zagadnienia wprowadzające

1. Budowa białek.
2. Struktury drugorzędowe.
3. Czynniki wpływające na stabilność białek.
4. Prawo Lamberta-Beera.
5. Metody oznaczania stężenia białka.

Literatura obowiązuja:

1. T. Kędryna, M. Gałka-Walczak, B. Ostrowska, *Wybrane zagadnienia z biochemii ogólnej z ćwiczeniami*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków (2001).
2. H. Jakubke, H. Jeschkeit, *Aminokwasy, peptydy, białka*, PWN, Warszawa (1982).
3. B.D. Hames, N.M. Hooper, *Biochemia*, PWN, Warszawa (2002).
4. L. Stryer., *Biochemia*, PWN, Warszawa (1997).
5. K. Kulka, A. Rejowski, *Biochemia*, PWN, Warszawa (1993).

III. Część teoretyczna

III.1. Funkcje i zastosowanie białek

Białka stanowią grupę makrocząsteczkowych związków polipeptydowych o bardzo skomplikowanej budowie i specyficznych właściwościach. Odgrywają ważną rolę w procesach życiowych - czynnościach i budowie komórki. Są głównym materiałem budulcowym skóry, mięśni, ścięgien, nerwów i krwi a ponadto enzymów, przeciwciał i wielu hormonów. Białka pełnią funkcję strukturalną (kolagen, elastyna) oraz katalityczną jako enzymy, w obecności których reakcje przebiegają w optymalnych warunkach znacznie szybciej niż gdyby zachodziły w inny sposób. Odpowiedzialne są za transport elektronów podczas oddychania i fotosyntezy, a także produktów metabolicznych i gazów (albuminy). Na przykład hemoglobina transportuje tlen w krwinkach czerwonych a mioglobina w mięśniach. Żelazo jest przenoszone w osoczu krwi przez transferynę, a przechowywane w wątrobie, w kompleksie z innym białkiem - ferrytyną. Stanowią również swoistego rodzaju ochronę komórek przed ciałami obcymi (immunoglobuliny) oraz regulacyjną (kulmudulina). Odpowiadają za regulację genową (histony) i hormonalną (insulina) oraz za prawidłowe działanie mięśni (aktyna, miozyna).

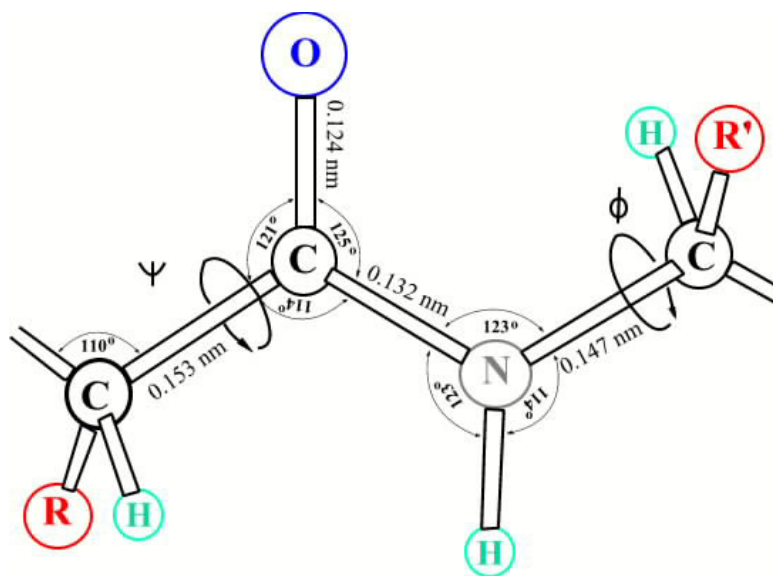
Rozwój biotechnologii i metod optycznych spowodował intensywny wzrost zainteresowania oddziaływaniem białek z organicznymi i nieorganicznymi ciałami stałymi. Szczególne znaczenia nabrały w ostatnich latach badania zjawiska adsorpcji protein w układach ciecz/ciało stałe. Badania dowiodły, że adsorpcja białek wywołuje szereg problemów zdrowotnych: kardiologiczne, stomatologiczne, urologiczne itp. Z drugiej strony właściwości fizykochemiczne „biologicznie” modyfikowanych powierzchni (BioSS – Biological Surface Science) pozwalają na zastosowanie ich jako biomateriałów, biosensorów i biochipów w diagnostyce, m.in. do kontroli stężenia glukozy we krwi w celu regulowania poziomu insuliny w przypadku pacjentów chorych na cukrzycę oraz wykonywania innych testów serologicznych i w bioelektronice [2].

W ostatniej dekadzie XX wieku nastąpił gwałtowny rozwój metod chromatograficznych związany z aplikacją tych technik do rozdzielania białek oraz mieszanin związków chemicznych stosowanych w rolnictwie, farmacji i innych gałęziach przemysłu. Stosowane w farmacji leki stanowią często mieszaninę enancjomerów, z których tylko jeden jest aktywny biologicznie [3]. Przykładem leku będącego mieszaniną enancjomerów był talidomid. Enancjomer R ma działanie uspokajające, ale enancjomer S wykazuje działanie teratogenne. Jego obecność w leku powodowała niedorozwój kończyn u dzieci, spowodowany stosowaniem przez ich matki talidomidu w czasie ciąży jako leku uspokajającego. Enancjomery to związki o identycznych właściwościach fizykochemicznych, lecz różnych

konfiguracjach podstawników przy asymetrycznym atomie w cząsteczce. Nie można ich rozdzielić prostymi metodami fizykochemicznymi, dlatego poszukuje się nowych chiralnych faz stacjonarnych, aby poprawić selektywność rozdzielania oraz skrócić czas analizy. Aktualnie w chromatografii cieczowej trwają prace nad syntezą oraz opisem chiralnych właściwości adsorbentów organicznych (polimery) i nieorganicznych z immobilizowanym białkiem. W skutek oddziaływań polarnych i hydrofobowych części białek z próbką, tworzą się kompleksy, w wyniku czego następuje rozdział enancjomerów. Rozdział jest wypadkową wszystkich efektów związanych z fazą stacjonarną, na której znajduje się substancja aktywna, w tym także metody immobilizacji stacjonarnej, składu i właściwości fazy ruchomej jak również warunków rozdzielania temperatury i pH.

III.2. Budowa białek

Białka stanowią wielkocząsteczkowe kopolimery zbudowane z różnych L-aminokwasów, związanych ze sobą wiązaniami peptydowymi (rys. 1). Wiązanie peptydowe jest wiązaniem kowalencyjnym powstającym pomiędzy grupami α -aminową oraz α -karboksylową sąsiednich aminokwasów. Wiązania w łańcuchu peptydowym (ψ i ϕ) wykazują szczególną zdolność do rotacji.



Rys. 1. Geometria wiązania peptydowego. [4,5]

Silne zróżnicowanie łańcuchów bocznych powoduje wysokie ich powinowactwo w stosunku do powierzchni międzyfazowych. Wynika ono z charakteru grup funkcyjnych α ($6 < pK_a < 8$) i ϵ ($8 < pK_a < 10,5$),

karboksylowe, tiolowe}, polarności, rozmiaru oraz ładunku danej grupy. Grypy aminowe lokalizują się na powierzchni makrocząsteczek, są czynnikami silnie nukleofilowymi.

Do opisu struktury białka Linderstorm-Lang wprowadził określenia: struktura pierwszorzędowa, drugorzędowa i trzeciorzędowa. Strukturę pierwszorzędową białka wyznaczają liczba, rodzaj i kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym oraz mostków siarczkowych umieszczonych w łańcuchach. Łańcuchy takie mogą być różnie usytuowane w przestrzeni, co stanowi strukturę wtórną białka. W ramach struktury wtórnej rozróżnia się jej trzy poziomy: drugorzędową, trzeciorzędową i czwartorzędową.

Strukturą drugorzędową białka określa się regularne pofałdowanie segmentów łańcucha polipeptydowego. Najczęściej występującymi sposobami pofałdowania białka są α helisa i struktura β . W przypominającej cylinder α helisie aminokwasy ustawiają się w taki sposób, że powstaje regularna struktura określana jako spiralna (rys. 3a). Jednorodne grupy, tzn. wiązania peptydowe, znajdują się wewnątrz helisy, natomiast boczne łańcuchy reszt aminokwasowych, zawierające różne grupy funkcyjne, skierowane są na zewnątrz makrocząsteczki, co umożliwia im kontakt z cząsteczkami w najbliższym otoczeniu. Tlen karbonylowy każdego wiązania peptydowego jest połączony wiązaniem wodorowym z wodorem grupy aminowej czwartego z kolei aminokwasu, przy czym wiązanie wodorowe przebiega prawie równoległe do osi helisy. Na jeden obrót α helisy przypada 3,5 aminokwasów, co odpowiada 0,54 nm, natomiast odległość między dwoma aminokwasami wzdłuż osi α helisy wynosi 0,15 nm. Struktura spiralna powstaje głównie dzięki alaninie, fenyloalaninie, asparaginie, glutaminie, histydynie, leucynie, metioninie, tyrozynie i tryptofanowi. Walina i izoleucyna ze względu na duże rozmiary łańcuchów bocznych nie mogą uczestniczyć w formowaniu stabilnej struktury α helisy. Seryna, treonina, prolina i hydroksyprolina zakłócają struktury regularne helisy. Dwa pierwsze aminokwasy z powodu dodatkowych wiązań wodorowych tworzonych przez ich grupy hydroksylowe. W przypadku proliny atom azotu wbudowany jest w pierścień heterocykliczny, co wyklucza możliwość obrotu wokół wiązania węgiel-azot (C-N) oraz wytworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Obecność proliny jest powodem, że łańcuch może ulec przegięciu lub nawet utworzyć pętlę [6].

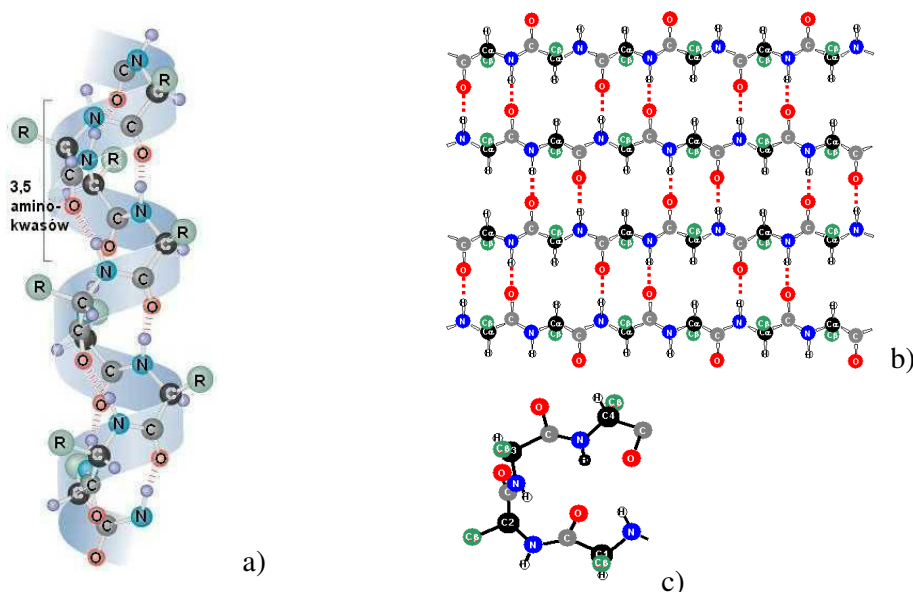
Drugim rodzajem konformacji łańcuchów polipeptydowych budujących białka jest struktura β -warstw, zwana inaczej dywanową lub harmonijkową (rys. 2b). W białkach o typowej strukturze fałdowej łańcuchy polipeptydowe są ułożone obok siebie równoległe albo przeciwrównoległe. W porównaniu jednak z konformacją spiralną łańcuchy są znacznie rozciągnięte, wobec czego nie mogą powstawać wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe. Taką konformację białka stabilizują poprzeczne mostki wodorowe występujące pomiędzy równoległe biegnącymi w przestrzeni łańcuchami polipeptydowymi. Nie wszystkie białka mają budowę

śrubową. W obrębie nawet określonego rodzaju białka stwierdza się obecność obu typów struktury, które bywają przedzielone obszarami nieuporządkowanymi, a rotacje dodatkowo ograniczają efekty związane z pęcznieniem łańcuchów bocznych. Obliczenia teoretyczne wykazały, że konformacje uporządkowanych struktur drugorzędowych (α -helisa, β -warstwa) stanowią 25% całkowitej liczby możliwych konformacji [8].

W cząsteczkach białek wyróżnić można również element struktury zwany β -zgięciem (rys. 2c). Na β -zgięciu składają się cztery reszty aminokwasów, przy czym drugą resztą najczęściej bywa prolina. Trzecią resztę β -zgięcia stanowi bardzo często glicyna lub aspargina

Struktura trzeciorzędowa dotyczy przestrzennego ułożenia aminokwasów zarówno odległych w sekwencji liniowej, jak i tych, które ze sobą sąsiadują. Końcowa struktura przestrzenna jest determinowana przez sekwencję aminokwasów. W przypadku rozpuszczalnych w wodzie białek globularnych takich jak mioglobina, siłą odpowiedzialną za fałdowanie się łańcucha polipeptydowego jest energetyczny wymóg oddzielenia niepolarnych aminokwasów od hydrofilowego otoczenia przez schowanie ich w hydrofobowym wnętrzu. Łańcuch polipeptydowy fałduje się spontanicznie w ten sposób, że większość jego hydrofobowych łańcuchów bocznych zostaje skierowana do wnętrza powstającej struktury, a większość jego polarnych łańcuchów bocznych znajduje się na jej powierzchni. Biologicznie aktywna (natywna) przestrzenna konformacja białka jest utrzymywana nie tylko dzięki oddziaływaniom hydrofobowym, ale także przez siły elektrostatyczne, wiązania wodorowe i kowalencyjne wiązania dwusiarczkowe. Siły elektrostatyczne obejmują wiązania jonowe między przeciwnie naładowanymi grupami i liczne słabe oddziaływania van der Waalsa między ściśle upakowanymi alifatycznymi łańcuchami bocznymi we wnętrzu białka [9,10].

Pojęcie struktury czwartorzędowej wprowadzone przez J.D. Bernol określa stopień asocjacji lub polimeryzacji poszczególnych monomerów białkowych lub łańcuchów polipeptydowych w większe zespoły, zazwyczaj oligomery. Ta struktura jest utrwalana przede wszystkim przez wiązania disulfidowe, a także przez kleszczowe (chelatowe), tworzące się z udziałem grup fenolowych, aminowych, karboksylowych i za pośrednictwem jonów metali, oraz siłami van der Waalsa. Są znane przykłady przekształcania się przez asocjację białka nieaktywnego w aktywne, np. fosforylaza *b* w fosforylaza *a*.



Rys. 2. Struktury drugorzędowe białek: a) α -helisa, b) β -warstwa, c) β -zgięcia . [7]

III.3. Czynniki wpływające na stabilność białek

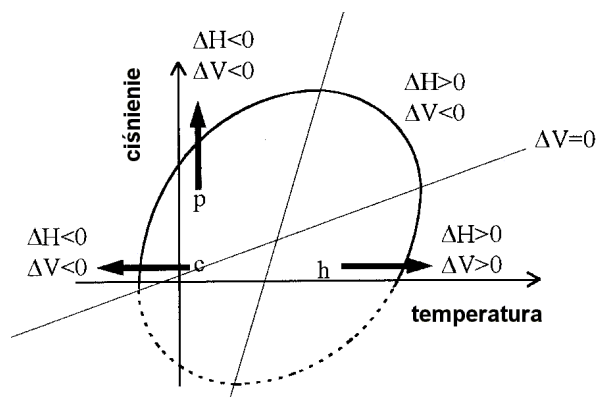
Skomplikowana a jednocześnie bardzo delikatna struktura białek zależy od wielu czynników. Niektóre z nich stabilizują formę natywną inne natomiast destabilizują strukturę, powodując denaturację cząsteczek. Entalpia swobodna przejść formy natywnej w formę zdenaturowaną jest funkcją wielu zmiennych, którą obrazuje równanie [11]:

$$\Delta G = \Delta G_0 + f(T, P, c_x, \text{pH}, \dots)$$

i którą można zapisać poprzez parametry charakteryzujące denaturację w określonym rozpuszczalniku [15]:

$$\Delta G = \Delta G_0 - \Delta S_0(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 + \Delta V_0(p - p_0) + \frac{\Delta B}{2}(p - p_0)^2 + \Delta \hat{\alpha}(p - p_0)(T - T_0) + \text{człony wyższego rzędu}$$

gdzie: T - temperatura, p - ciśnienie, c_x - stężenie współrozpuszczalnika, ΔG_0 , ΔS_0 - zmiany entalpii swobodnej i entropii w odniesieniu do temperatury T_0 i ciśnienia p_0 , T , p - aktualna temperatura i ciśnienie przejść, $\hat{\beta}$, $\hat{\alpha}$ - różnica współczynników ściśliwości ($\hat{\beta} = \beta V$) i $\hat{\alpha}$ - rozszerzalności cieplnej ($\hat{\alpha} = \alpha V$) stanu zdenaturowanego i natywnego, ΔC_p - zmiany pojemności cieplnych.



Rys. 3. Diagram fazowy stabilności białek. Wnętrze elipsy wyznacza granice istnienia formy biologicznie czynnej białka. [12]

W przypadku, gdy $\Delta G=0$ wykresy zależności $p = f(T)$ przedstawiają diagramy fazowe stabilności białek (rys 3). W zależności od warunków białka mogą ulegać denaturacji pod wpływem wysokich ciśnień (p), jak również wysokich (h) oraz niskich temperatur (c).

III.3.1. Rozpuszczalnik i pH roztworu

Duży wpływ na właściwości i stabilność struktur drugorzędowych białek ma charakter rozpuszczalnika, w szczególności wody. Ze względu na specyficzne właściwości (wysoka: stała dielektryczna, moment dipolowy oraz temperatura wrzenia; mały moment bezwładności), woda bierze udział w: katalizie enzymatycznej, fałdowaniu] i stabilności konformacyjnej białek], ich plastyczności (objętości swobodnej i ruchliwości)], a także odgrywa ważną rolę w specyficznych oddziaływaniach np. leków przeciwrakowych z DNA]. W środowisku wodnym cząsteczki białek otoczone są warstwą hydratacyjną rozpuszczalnika. Powstaje ona w efekcie oddziaływań hydrofobowych, wiązań wodorowych, oddziaływań elektrostatycznych typu dipol-dipol cząsteczek wody z grupami polarnymi (-OH,-SH,-CONH₂) lub zjonizowanymi grupami (-NH₃⁺,-COO⁻) łańcuchów bocznych, znajdujących się na powierzchni białka oraz sił van der Waalsa. Trwałość wiązań wodorowych pomiędzy polarnymi/zjonizowanymi grupami białek a cząsteczkami wody jest 5-10 razy większa niż w czystej cieczy [13]. Grubość powłoki hydratacyjnej wynosi średnio 4-8 Å. W wyniku oddziaływania następuje uporządkowanie cząsteczek wody wobec niepolarnych składników związane z obniżeniem entropii oraz wzrostem entalpii swobodnej, co jest niekorzystne termodynamicznie. W wyniku tego reszty hydrofobowe są ukryte wewnątrz cząsteczek białek a grupy hydrofilowe są na powierzchni. Otoczka wodna chroni te

cząsteczki przed łączeniem się w większe zespoły, a tym samym przed wytrącaniem z roztworu. Jednocześnie w roztworach wodnych istnieje tendencja do zmniejszania kontaktu z grupami niepolarnymi co może zachodzić poprzez samorzutną agregację. Proces ten związany jest ze zmniejszeniem entalpii swobodnej a tym samym jest korzystny termodynamicznie. Proces hydratacji cząsteczek białek nie jest jeszcze do końca wyjaśniony. Obecnie wśród badaczy przeważa pogląd, że cząsteczki wody w pobliżu białek ulegają ciągłym powolnym zmianom. Dynamika wody jest wynikiem oddziaływania z grupami hydrofilowymi, jak również hydrofobowymi. Czynniki hydrofobowe powodują lokalne zmiany w otaczającej warstwie.

W niektórych przypadkach w wyniku rozciągania cząsteczek białek może dojść do nieodwracalnej agregacji białek. Reaktywność i ruchliwość białek rośnie w miarę wzrostu stopnia wilgotności, w wyniku czego wzrasta prawdopodobieństwo zajścia reakcji denaturacji, agregacji, utleniania, podziału czy usuwania grup amidowych (deamidacji). W warunkach przemysłowych białka produkowane są metodą liofizacji (suszenia sublimacyjnego przy zredukowanym ciśnieniu- „freeze-dried – lyophilized”), która zapewnia minimalny poziom wody.

W obecności niektórych rozpuszczalników organicznych cząsteczki białek ulegają denaturacji. Proces ten związany jest z usuwaniem cząsteczek wody z warstwy hydratacyjnej, co powoduje zmianę zwartej globularnej struktury trzeciorzędowej białek w nieaktywne biologicznie, nieuporządkowane łańcuchy polipeptydowe. Badania zachowania lizozymu w obecności formamidu i dimetyloformamidu (DMF), dimetylosulfotlenku (DMSO) wykazały, że polarne rozpuszczalniki mogące tworzyć silne wiązania wodorowe z fragmentami białka a tym samym zastępować wodę, zwykle powodują denaturację białek. Alkohole powodują zmiany struktury trzeciorzędowych białek (np. β -laktoglobulin lub cytochromu) bez makroskopowej zmiany struktur drugorzędowych, choć metanol powoduje denaturację białek. Stabilność białek w rozpuszczalnikach organicznych można zwiększyć poprzez tworzenie szczelnych warstw hydratacyjnych wokół białka poprzez: dodatek surfaktantu lub czynników silnie hydrofilowych (np. polimerów).

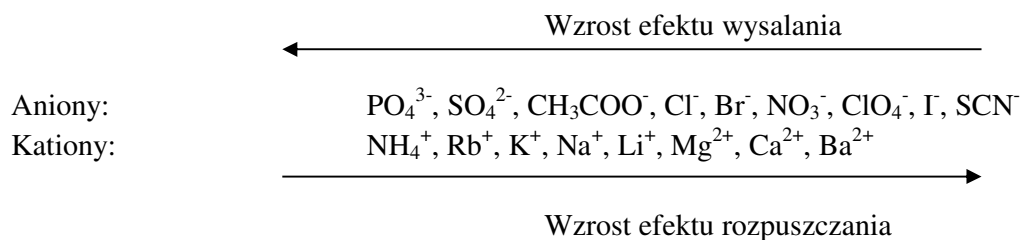
Duży wpływ na stabilność oraz właściwości białek ma kwasowość środowiska (wartość pH). W wyniku działania silnych kwasów zmniejsza się stopień dysocjacji grup karboksylowych. Grupy te tracą wówczas ładunek elektryczny, co jest przyczyną rozerwania wiązań jonowych przy jednoczesnej destrukcji wiązań wodorowych. Mocne zasady zobojętniają grupy amoniowe w wyniku czego w skrajnych przypadkach może dojść do fragmentacji łańcucha peptydowego na skutek zerwania wiązań peptydowych. Zmiany pH roztworów wpływają silnie na ładunek cząsteczek białek. Zmienność konformacji zależna od pH wynika z nierównomiernego rozmieszczenia ładunków w cząsteczce białka, które powoduje labilność wiązań jonowych. Dlatego nawet niewielkie zmiany pH, przez zmianę siły wiązań jonowych zmieniają strukturę trzeciorzędową cząsteczek. Ma to szczególnie

istotne znaczenie dla białek biologicznie czynnych (np. enzymów), gdyż ich aktywność zależy ściśle od konformacji cząsteczek. Istnieje taka wartość pH, dla której ładunek powierzchniowy białka jest zerowy (pI). W tabeli 2 przedstawiono masy cząsteczkowe i wartości odpowiadające punktowi izoelektrycznemu niektórych białek.

Tabela 2. Masy cząsteczkowe i wartości punktów izoelektrycznych wybranych białek. [14]

Białko	Masa cząsteczkowa g/mol	Punkt izoelektryczny
mioglobina	17 000	7
β -laktoglobulina	18000 - 36000	5,2
ovomukoidy	28 000	4,1
ovoglikoproteina	30 000	4,1
pepsyna	34 600	<1
kwasy α_1 -glikoproteinowy	41 000	2,7
ovalbumina	45 000	4,7
HSA	66 000	4,7
BSA	66 466	4,7-4,9
conalbumina	70 000 - 78000	6,1-6,6
glukoamylaza	97 000	5
ferrytyna	450 000	4,4

Bardzo ważne dla rozpuszczalności białek jest stężenie elektrolitu. Często konieczne jest utrzymanie pewnego stężenia soli, aby w roztworze utrzymać białko o znacznej asymetrii rozmieszczenia ładunku (np. albumina surowicy). Ten efekt zwiększenia rozpuszczalności białka w wyniku dodania soli związany jest z agregacją lub asocjacją cząsteczek białka. Jony soli gromadzą się na powierzchni cząsteczki białka i silnie podwyższają stopień hydratacji, co powoduje podwyższenie rozpuszczalności. Zarówno kationy jak i aniony odgrywają dużą rolę w procesie rozpuszczania białek. Zostały one sklasyfikowane w szereg Hofmeistera [15-17] :



Efekt wytrącenia białka na skutek dodania soli do roztworu (wysalanie) związany jest z odwodnieniem cząsteczki białka, co jest wynikiem koniecznej

hydratacji dużego nadmiaru elektrolitu. Ponieważ różne białka wytrącają się przy różnym stężeniu elektrolitu, metodę wysalania zalicza się do bardzo ważnych metod wstępnego rozdzielania mieszaniny białek w łagodnych warunkach.

III.3.2. Temperatura i ciśnienie

Jedną z cech charakterystycznych białek jest silna zależność struktury od temperatury. Białka ulegają denaturacji termicznej zarówno w wysokich jak i niskich temperaturach. W wysokich temperaturach następuje rozrywanie wiązań wodorowych oraz hydrofobowych, co prowadzi do zmiany agregacji. Zmiany te prowadzą do agregacji oraz wytrącenia białka (koagulacji). Proces ten zależy od rodzaju i zawartości aminokwasów w strukturze białka. Termiczna stabilność aminokwasów tworzących białka zmienia się w szeregu [18]: Val, Leu>Ile>Tyr>Lys>His>Met>Thr>Ser>Trp>Asp, Glu, Arg, Cys (pełne nazwy aminokwasów zamieszczono w tabeli Z1w załączniku do skryptu B11).

Proces denaturacji albumin przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie ogrzewania do około 65 °C (maksimum pików na termogramie DSC) następuje częściowe rozwijanie struktur spiralnych, a cząsteczki przegrupowują się w struktury „dywanowe” przy udziale wyłącznie wiązań wodorowych. Powyżej temperatury 65°C stopniowo odsłaniana jest grupa –SH (cys-34) [19], w wyniku czego mogą się tworzyć mostki siarczkowe (S-S) pomiędzy monomerami, a sam proces jest nieodwracalny. Proces ten w dużej mierze zależy od czasu ogrzewania próbki. W zależności od charakteru białka procesy towarzyszące ogrzewaniu mogą zachodzić wieloetapowo.

Zimna denaturacja jest wynikiem oddziaływania niepolarnych grup białek z wodą [20]. Zachodzi ona w obszarze wysokiego ciśnienia (>0,2 GPa). Zmniejszenie temperatury powoduje rozwijanie natywnej struktury białek w wyniku działania niskich temperatur, a tym samym odsłonięcia wewnętrznych grup niepolarnych. Z obniżeniem temperatury zmniejsza się potencjał termodynamiczny hydratacji, co sprawia, że proces ten jest korzystny termodynamicznie. Zmiany te wynikają z osłabienia hydrofobowych oddziaływań, wzrostu wewnątrzpeptydowych oraz bezpośrednich oddziaływań pomiędzy wodą, polarnymi i zjonizowanymi grupami cząsteczek białek. Proces denaturacji w niskich temperaturach jest całkowicie odwracalny w przeciwieństwie do wysokotemperaturowej denaturacji.

Delikatne struktury białek ulegają odkształceniom pod wpływem wysokich ciśnień. Stan ten charakteryzuje się zmniejszeniem objętości w stosunku do formy natywnej. W zakresie niższych stężeń oraz dostatecznych temperatur tworzą się przypadkowe zwoje. W wyniku kompresji cząsteczek białka cząsteczki wody z warstwy hydratacyjnej przenikają do hydrofobowego rdzenia.

III.4. Metody ilościowego oznaczania białek

Historyczną metodą oznaczania zawartości białek była metoda Kjeldahla (1883). Polega ona na mineralizacji próbki organicznej kwasem siarkowym wobec katalizatora, destylacji uwolnionego amoniaku, a następnie zmiareczkowaniu go roztworem kwasu solnego. Metoda ta ze względu na znaczny czas analizy oraz niszczenie próbek została wyparta przez nowoczesne metody badawcze, do których zaliczyć można metody spektroskopowe [21].

III.4.1. Spektroskopia UV-Vis

Jednymi z najczęściej stosowanych metod badawczych w analizie białek są metody optyczne. Stosuje się je do określenia stężenia oraz zmian konformacyjnych białek. Zjawisko absorpcji promieniowania związane jest z podwyższeniem stanu energetycznego pochłaniających cząstek. Absorpcja lub emisja promieniowania w układach mikro odbywa się w sposób skwantowany, a wartość energii wymienianej z otoczeniem opisana jest równaniem:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (4)$$

gdzie: E – zmiana energii cząsteczki (atomu); h – stała Plancka; ν – częstość drgań promieniowania; c - prędkość światła; λ – długość fali promieniowania.

Po krótkim czasie życia cząsteczki w stanie wzbudzonym następuje często jej powrót do stanu podstawowego z towarzyszącą temu aktowi emisją promieniowania o długości fali emitowanej niekoniecznie równej długości promieniowania zaabsorbowanego lub dezaktywacja cząsteczki przez przejście bezpromieniste.

Podstawą spektrofotometrii absorpcyjnej w badaniach roztworów jest prawo Bouguera-Lamberta-Beera (Beera-Waltera), określające liniową zależność absorbancji od stężenia:

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (5)$$

gdzie: A - absorbancja, ϵ - molowy współczynnik absorpcji, c - stężenie, l - grubość warstwy absorbującej.

Prawo to spełnione jest dla roztworów rozcieńczonych. W przypadku stężonych roztworów obserwuje się odstępstwa od liniowości, wynikające z nakładania się przekrojów czynnych obiektów absorbujących promieniowanie bądź w wyniku tworzenia się asocjatów, polimerów lub dodatkowych oddziaływań.

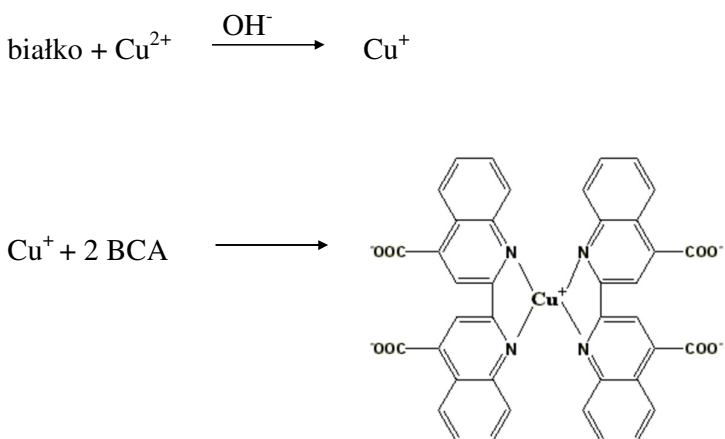
Białka absorbują i emitują promieniowanie w zakresie nadfioletu. W widmie absorpcyjnym wyróżnić można bardzo intensywne pasmo w zakresie 230-300 nm z

maximum absorpcji (A_{\max}) położonym w pobliżu $\lambda=280$ nm oraz z minimalną absorpcją w zakresie widzialnym. Pasma to powstaje w wyniku dozwolonych przejść elektronowych w obrębie wiązania peptydowego (silna absorpcja w pobliżu 230 nm) i dwusiarczkowego (maksimum przy 250 nm), a w szczególności z obecności w ich cząsteczkach aromatycznych aminokwasów: tyrozyny, tryptofanu, fenyloalaniny [22].

Roztwory albumin są związkami bezbarwnymi i nie wykazują naturalnej absorpcji w zakresie światła widzialnego. Dodatek substancji barwnych reagujących z cząsteczkami bądź elementami struktury powoduje generacje pasma z maksimum w świetle widzialnym. Opracowano wiele metod kolorymetrycznych ilościowego oznaczania białek w świetle widzialnym. Najstarszą z nich jest metoda biuretowa (nazwa pochodzi od najprostszego związku, który ulega tej reakcji biuretu $\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2$). Polega ona na dodaniu do roztworów protein jonów miedzi (II) (najczęściej siarczanu lub fosforanu) oraz NaOH lub KOH. W wyniku reakcji powstaje fioletowy związek kompleksowy, w którym jony miedzi chelatowane są przez grupy peptydowe białek [23]. Maksimum absorpcji zmienia się w zakresie 540-560 nm, a pomiary dokonywane są przy długości fali 550 nm. W przypadku występowania tylko pojedynczego wiązania peptydowego roztwory zabarwiają się różowo. Metodę tą wykorzystuje się do oznaczeń ilościowych (1-6 mg białka /ml) oraz jakościowych białek. Jej wadą jest niska czułość a zaletą niezależność od składu aminokwasów.

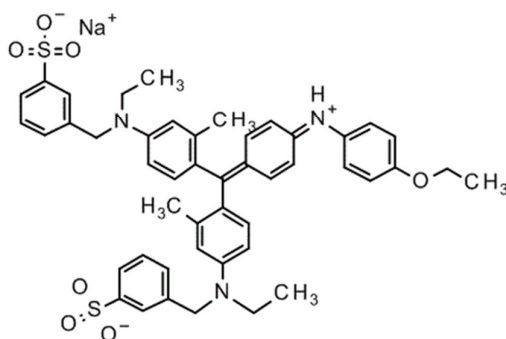
Bardziej czułymi metodami opartymi na kompleksotwórczych właściwościach jonów miedzi są metody: Lowrego [24] oraz BCA. Pierwsza z nich jest zmodyfikowaną metodą biuretową. Najpierw w środowisku alkalicznym jony miedzi (II) reagują z wiązaniami amidowymi, w wyniku czego tworzą się jony Cu(I) . W drugim etapie następuje redukcja czynnika Folin-Ciocalteu (kwasu fosfomolibdeno-fosfowolframianowego) przez reszty tyrozyny i tryptofanu do niebieskiego heteropolimolibdenianu z maksimum absorpcji w $\lambda_{\max}=750$ nm. Metoda ta stosowana jest do oznaczania białek w zakresie stężeń 0,1 – 1,5 mg/ml. Ze względu na wąski zakres stosowanego pH (pH=10-10,5) oraz zakłócenia ze strony m. in.: niektórych detergentów, cukrów oraz składników buforów, metodę używa się w formie zmodyfikowanej.

Innym rozwiązaniem, będącym modyfikacją metody biuretowej, jest metoda z zastosowaniem kwasu bis-cynchoninowego (BCA) [25]. W wyniku powstania kompleksu następuje zmiana zabarwienia z zielonego na intensywnie fioletowy z maksimum absorpcji w 560 nm (schemat 3). Zaletą tej metody jest stabilność w zakresie stężenia 0,1 – 2 mg/ml oraz możliwość pomiarów w obecności detergentów, cukrów oraz lipidów.



Schemat 1. Podstawowe reakcje przebiegające w metodzie oznaczania białek z użyciem kwasu bis-cynchoninowego (BCA).

Do dnia dzisiejszego powstało wiele metod z wykorzystaniem barwników organicznych. Najbardziej popularna jest metoda Bradforda [26]. Stosuje się w niej barwnik Coomassie Brilliant Blue G-250 (rys. 4), który w środowisku kwasu fosforowego tworzy niebieski kompleks z białkami, wykazujący maksimum absorpcji przy 595 nm. Podobnie jak przy innych wcześniejszych oznaczeniach w metodzie tej nie można oznaczać detergentów oraz należy zwracać baczną uwagę na substancje interferujące.



Rys. 4. Błękit brylantowy G 250.

Metoda pomiarów absorpcji UV-VIS znalazła szerokie zastosowanie w praktyce do określania stężenia w roztworze oraz określenia ilości przereagowanej albuminy. Zastosowano ją m. in. do wyznaczenia izoterm adsorpcji-desorpcji białek. Stężenie powierzchniowe Γ zaadsorbowanego białka oblicza się z zależności:

$$\Gamma_1 = \frac{V_0 \cdot (C_0 - C_1)}{m} \quad (6)$$

dla procesu adsorpcji, oraz równania dla desorpcji:

$$\Gamma_2 = \Gamma_1 - \frac{(V_0 - V_1 + V_2) \cdot C_2 - (V_0 - V_1) \cdot C_1}{m} \quad (7)$$

gdzie: C_0 i V_0 – stężenie i objętość roztworu wyjściowego albuminy, C_1 – stężenie roztworu po adsorpcji, C_2 – stężenie roztworu po desorpcji, V_1 – objętość roztworu po adsorpcji pobrana do określenia stężenia, V_2 – objętość roztworu buforowego użytego do desorpcji, m – masa adsorbentu, Γ_1 – stopień pokrycia powierzchni białkiem po adsorpcji, Γ_2 – stopień pokrycia powierzchni białkiem po desorpcji. Metodę tę wykorzystano również do określania mechanizmów oraz parametrów reakcji kompleksowania (oddziaływania) białek z jonami metali wielowartościowych.

IV. Część doświadczalna

A. Aparatura i odczynniki

1. Aparatura:
 - pipety miarowe o pojemności 10 cm³ – 2 szt.
 - pipety miarowe: 2 i 5 cm³
 - kolbki miarowe 10 cm³ – 6 szt.; 100 cm³ – 1 szt.
 - probówki wirnikowe 10 cm³ – 20 szt.
 - probówki szklane 10 cm³ – 6 szt.
 - spektrofotometr UV-Vis
 - kuwety plastikowe – 2 szt.
 - wirówka MPW -251
2. Odczynniki:
 - 5 g/dm³ roztwór kazeiny w 0,1 M CH₃COONa;
 - 1 M i 0,1 M CH₃COONa;
 - 1 M CH₃COOH
 - odczynnik biuretowy

B. Wykonanie pomiarów

– Do suchych probówek odmierzyć podane w tabeli 3 odpowiednie ilości 1 M CH₃COONa oraz 1 M CH₃COOH. Do każdej z probówek dodać po 4 cm³ roztworu kazeiny, wymieszać i pozostawić na 5 minut.

Tabela 3. Składniki poszczególnych roztworów do pomiaru punktu izoelektrycznego kazeiny.

Nr	CH ₃ COOH (1M) cm ³	CH ₃ COONa(1M) cm ³	kazeina cm ³
1	4	0	4
2	3,6	0,4	4
3	3,2	0,8	4
4	2,8	1,2	4
5	2,4	1,6	4
6	2	2	4
7	1,6	2,4	4
8	1,2	2,8	4
9	0,8	3,2	4
10	0,4	3,6	4

- Roztwory przenieść do probówek wirówkowych i odwirować wytrącony osad białka przez 20 minut przy prędkości obrotów 10 tys. (ułożenie probówek w wirówce musi być symetryczne, nie wolno otwierać pokrywy w czasie wirowania).
- Po odwirowaniu z każdej probówki pobrać 2 cm³ przenieść do czystych probówek i dodać po 4 cm³ odczynnika biuretowego. Wymieszać i pozostawić na 30 min.
- Zmierzyć absorbancję poszczególnych roztworów przy długości fali 530 nm. Spektrofotometr zerujemy na odnośnik sporządzony przez zmieszanie 2 cm³ wody destylowanej i 4 cm³ odczynnika biuretowego. Wyniki zamieścić w tabeli 4.

Tabela 4. Pomiary spektrofotometryczne roztworów kazeiny.

Nr	Absorbancja A	Stężenie białka g/dm ³	pH roztworu
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

C. Sporządzenie krzywej kalibracyjnej

- W tym celu należy przygotować serię roztworów białka w kolbkach miarowych o objętości 10 cm³ i stężeniach podanych w tabeli 5, przez rozcieńczanie roztworu podstawowego (5 g/dm³ kazeiny w 0,1 M CH₃COONa).

Tabela 5. Krzywa kalibracyjna.

Nr	Stężenie kazeiny g/dm ³	Absorbancja
1	0,5	
2	1	
3	2	
4	3	
5	4	
6	5	

- Z każdej kolbki pobrać 2 cm³ roztworu, przenieść do czystych probówek i dodać po 4 cm³ odczynnika biuretowego. Wymieszać i pozostawić na 30 min.
- Zmierzyć absorbancję dla poszczególnych roztworów przy długości fali 530 nm stosując ten sam odnośnik do zerowania spektrofotometru. Wyniki zamieścić w tabeli 6.

D. Opracowanie wyników

- Sporządzić wykres krzywej kalibracyjnej. Wyznaczyć parametry równania prostej metodą najmniejszych kwadratów. Na podstawie krzywej kalibracyjnej określić stężenia białka w roztworze po wytrąceniu.
- Obliczyć pH roztworów buforowych w poszczególnych probówkach wykorzystując równanie (8):

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left[\frac{\text{CH}_3\text{COO}^-}{\text{CH}_3\text{COOH}} \right] \quad (8)$$

Stała dysocjacji kwasu octowego w temp. 25 °C wynosi $K_a=0,00001753$. W obliczeniach należy uwzględnić stężenie octanu sodu dodawanego z kazeiną.

- Sporządzić wykres zależności $C_{\text{białka}} = f(\text{pH}_{\text{roztworu}})$ i określić wartość pH odpowiadającą punktowi izoelektrycznemu kazeiny.

Tabela 6.

Nr	Absorbancja	stężenie
1		
2		
3		
4		
5		
6		

Literatura:

- [1] D. Sternik, *Badanie właściwości fizykochemicznych adsorbentów modyfikowanych albuminami*, Praca doktorska, UMCS (2007).
- [2] B. Kasemo, *Surf. Sci.*, 500 (2002) 656.
- [3] K. William, E.Lee, *Drugs*, 30 (1985) 333.
- [4] C.A. Haynes, W. Norde, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 2 (1994) 517.
- [5] G. Kupryszewski, *Wstęp do chemii organicznej*, PWN, Warszawa (1988).
- [6] Z.-Y. Peng, L.C. Wu, B.A. Schulman, P.L. Kim, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 348 (1995) 43.
- [7] www-rpi-edu.
- [8] G.N. Ramachandran, V. Sasisekharan, *Adv. Protein Chem.*, 23 (1968) 283.
- [9] B.D. Hames, N.M. Hooper, *Biochemia*, PWN, Warszawa (2002).

- [10] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa (2005).
- [11] Ch. Scharnagl, M. Reif, J. Friedrich, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1749 (2005) 187.
- [12] K. Heremans, L. Smeller, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1386 (1998) 353.
- [13] B. Bagchi, *Chem. Rev.*, 105 (2005) 3197.
- [14] J. Haginaka, *J. Chromatogr. A*, 875 (2000) 235.
- [15] Y. Zhang, P.S. Cremer, *Current Opinion in Structural Biology*, 10 (2006) 658.
- [16] W. Norde, *Adv. Colloids Interface Sci.*, 25 (1986) 267.
- [17] P.M. Wiggins, *Physica A*, 238 (1997) 113.
- [18] R. Jaenicke, *J. Biotechnology*, 79 (2000) 193.
- [19] N. Matsudomi, Y. Yamamura, K. Kobayashi, *Agricultural Biol. Chem.*, 50 (1986) 1389.
- [20] P.L. Privalov, *Biochem. Mol. Biol.*, 25 (1990) 281.
- [21] J.T. Pelton, L.R. McLean, *Anal. Biochem.*, 277 (2000) 167.
- [22] T.E. Creighton, *Protein Structure*, Oxford University Press, (1997) 261
- [23] H.C. Freeman, J.E.W.L. Smith, J.C. Taylor, *Acta Cryst.*, 14 (1961) 407.
- [24] O.H. Lowry, N.J. Rosbrough, A.L. Farr R.J. Randall. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.
- [25] C.M. Stoscheck, *Methods in Enzymology*, 182(1990) 50.
- [26] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248.