

Laboratorium z biochemii

DLA STUDENTÓW BIOLOGII, BIOTECHNOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA

Praca zbiorowa pod redakcją *Antoniego Polanowskiego*
Poprawki do wydania III wprowadzone pod redakcją
Justyny Ciuraskiewicz i Elżbiety Gocek

3. BIAŁKA

Autorzy: Jolanta Kowalska, Irena Lorenc-Kubis, Dorota Nowak, Antoni Polanowski, Agata Szalewicz, Anna Wilimowska-Pelc, Zdzisław Wróblewski, Małgorzata Zakrzewska, Justyna Ciuraskiewicz, Elżbieta Gocek (ed. Elżbieta Gocek)

3.1	Podział i funkcje białek	3
3.2	Wiązanie peptydowe	5
3.3	Budowa i nazewnictwo peptydów	6
3.4	Modyfikacje potranslacyjne białek	7
3.5	Struktura białek	9
3.6	Denaturacja białek	10
3.7	Analiza sekwencji aminokwasowej białek	11
3.8	Proteomika	12
3.9	Właściwości fizykochemiczne białek	12
3.9.1	Widmo białka w zakresie światła ultrafioletowego	12
3.9.2	Właściwości koloidowe roztworów białka	13
3.9.3	Ładunek elektryczny i wytrącanie białek z roztworu	13
3.9.4	Punkt izoelektryczny kazeiny	15
3.9.5	Wytrącanie białek kwasem chlorowym (VII), sulfosalicylowym i trichlorowym	16
3.9.6	Wysalanie albumin i globulin z surowicy krwi	16
3.9.7	Dializa	17
3.9.8	Filtracja żelowa związków różniących się masą cząsteczkową	18
3.10	Metody oznaczania stężenia białka	19
3.10.1	Metody spektrofotometryczne	20
3.10.1.1	Molowy i właściwy współczynnik absorpcji albuminy surowicy bydlęcej	20
3.10.1.2	Wyznaczanie stężenia albuminy surowicy bydlęcej metodą spektrofotometryczną	21
3.10.2	Odczyn barwny wiązania peptydowego – reakcja biuretowa	21
3.10.3	Metoda biuretowa oznaczania ilości białka	22
3.10.3.1	Mikrobiuretowa metoda oznaczania ilości białka	23
3.10.4	Kolorymetryczne oznaczanie białka metodą Lowry’ego	23
3.10.5	Kolorymetryczne oznaczanie białka metodą Bradforda	24
3.10.6	Metoda Smitha z wykorzystaniem kwasu bicinechinowego (BCA)	25

3.10.7	Mikrometoda taninowa	26
3.11	Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym	27
3.11.1	Elektroforeza natywna	28
3.11.1.1	Rozdział białek surowicy krwi w elektroforezie według Davisa	28
3.11.1.2	Rozdział białek w elektroforezie natywnej w układzie ciągłym	30
3.11.2	Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	31
3.11.2.1	Elektroforeza SDS-PAGE według Laemmli'go	31
3.11.2.2	Elektroforeza SDS-PAGE według von Jagowa	33
3.11.3	Metody barwienia białek po rozdziale elektroforetycznym	34
3.11.3.1	Barwienie na białko (proteinogram)	34
3.11.3.2	Barwienie na obecność glikoprotein (glikoproteinogram) – technika PAS	34
3.11.3.3	Lokalizacja izoenzymów fosfatazy zasadowej (zymogram)	35
3.11.3.4	Barwienie z użyciem Coomassie Brilliant Blue w środowisku kwaśnym	36
3.11.3.5	Barwienie z użyciem Coomassie Brilliant Blue w środowisku wodnym	36
3.11.4	Wyznaczanie względnej masy cząsteczkowej białka	36
3.12	Wykazywanie obecności glikoprotein za pomocą wiązania z wolnymi lektynami	37
3.13	Wybrane metody otrzymywania białek	39
3.13.1	Podstawy teoretyczne chromatografii jonowymiennej	39
3.13.2	Preparacja kwaśnej α_1 -glikoproteiny (orozomukoidu) z surowicy wieprzowej	41
3.13.3	Preparacja trypsyny z trzustki bydlęcej	42
3.13.4	Zastosowanie chromatografii powinowactwa w preparatyce białek	43
3.13.4.1	Immobilizacja konkanawaliny A na Sepharose 4B po aktywacji bromocyjanem	45
3.13.4.2	Immobilizacja trypsyny na Sepharose 4B po aktywacji diwinylosulfonem	46
3.13.5	Wysokosprawną chromatografią cieczową odwróconej fazy (RP-HPLC)	48
3.13.6	Preparacja zasadowego inhibitora trypsyny z płuc bydlęcych (BPTI)	50
3.13.7	Otrzymywanie rekombinowanego białka w bakteryjnym systemie ekspresyjnym	53
3.14	Analiza składu aminokwasowego białek	54
3.14.1	Hydroliza wiązań peptydowych	55
3.14.2	Derywatyzacja aminokwasów	55
3.14.2.1	Metoda ninhydrynowa	56
3.14.2.2	Modyfikacja chemiczna z wykorzystaniem aldehydu o-ftalowego	56
3.14.2.3	Metoda AccQ•Taq	56
3.14.2.4	Przedkolumnowa deprywatyzacja z wykorzystaniem fenyloizotiocyjanu	57
3.14.2.5	Metoda dinitrofenylowa	58
3.14.2.6	Metoda dansylowania	58
3.14.3	Identyfikacja i ilościowe oznaczanie aminokwasów w hydrolizacie	58
3.14.4	Analiza składu aminokwasowego BPTI metodą AccQ•Taq	61

3.1. PODZIAŁ I FUNKCJE BIAŁEK

Białka to naturalnie występujące nierozgałęzione polimery o masie cząsteczkowej od 10 000 do ponad 1 000 000 Da, zbudowane z aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi. Poza 20 rodzajami L-aminokwasów mogą zawierać aminokwasy zmodyfikowane w czasie obróbki potranslacyjnej oraz dwa znacznie rzadziej występujące aminokwasy kodowane genetycznie: selenocysteinę i pirolizynę (rozdział 2.2)

Białka stanowią ogromną grupę związków o różnym źródle pochodzenia, budowie, funkcjach i właściwościach. Z tego powodu w zależności od potrzeb stosuje się różne kryteria ich podziału. Poniżej przedstawiono jedynie kilka z nich, bazujących przede wszystkim na budowie i właściwościach białek.

Ze względu na skład chemiczny, białka możemy podzielić na **białka proste** (proteiny, homoproteiny), czyli białka składające się wyłącznie z aminokwasów oraz **białka złożone** (proteidy, heteroproteiny), które dodatkowo zawierają różnego typu cząsteczki o charakterze niebiałkowym lub jony.

Białka proste oraz białkowe części białek złożonych, charakteryzujące się podobną budową i właściwościami fizykochemicznymi łańcucha polipeptydowego, można podzielić na kilka podgrup. Pokróćce scharakteryzowano je poniżej.

Albuminy są białkami o masie cząsteczkowej ok. 70 000 Da, pI 4,5–6,0, dobrze rozpuszczają się w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli; można je wysolić przy całkowitym nasyceniu roztworu siarczanem (VI) amonu. Występują powszechnie zarówno w organizmach zwierzęcych jak i roślinnych. Do albumin zalicza się np. albuminy jaja, osocza krwi, mleka, leguminę z grochu.

Globuliny stanowią liczną grupę białek o masie cząsteczkowej 41 000–10 000 000 Da, ich pI mieści się w granicach 5,0–7,3, rozpuszczają się w roztworach soli obojętnych, niektóre w rozcieńczonych kwasach i zasadach, są nierozpuszczalne w wodzie; można je wysolić przy połowicznym nasyceniu roztworu siarczanem (VI) amonu. Ulegają denaturacji w łagodnych warunkach. W globulinach często występują jony metali (miedź, żelazo, cynk), reszty cukrowe, lipidy (głównie fosfolipidy) i sterole. Pełnią w organizmie różnorakie funkcje, w tym funkcje katalityczne (enzymy), obronne (immunoglobuliny), regulatorowe (hormony).

Histony występują w jądrze komórkowym w połączeniu z kwasami nukleinowymi oraz w erytrocytach. Ze względu na duży udział reszt lizyny i argininy w ich składzie aminokwasowym są białkami zasadowymi; charakteryzują się małą zawartością aminokwasów siarkowych. Dobrze rozpuszczają się w wodzie i rozcieńczonych roztworach kwasów.

Protaminy są białkami, a właściwie peptydami, o masie cząsteczkowej nie przekraczającej 5 000 Da. Posiadają silnie zasadowy charakter z uwagi na dużą zawartość argininy (np. ponad 50% wszystkich reszt aminokwasów w protaminach spermy ryb), nie zawierają aminokwasów siarkowych. Charakteryzują się ubogim składem aminokwasowym. Posiadają właściwości zbliżone do histonów. Dobrze rozpuszczają się w wodzie i w rozcieńczonych roztworach kwasów. W połączeniu z kwasami nukleinowymi tworzą nukleoprotaminy. Występują w spermie ssaków, ptaków i ryb np. salmina z mlecza łososia.

Gluteliny to białka roślinne charakteryzujące się dużą zawartością kwasu glutaminowego, glutaminy i proliny, nierozpuszczalne w wodzie, roztworach soli i etanolu, rozpuszczają się w rozcieńczonych roztworach kwasów i zasad. Występują w dużej ilości w ziarnach zbóż np. glutelina pszenicy wchodząca w skład glutenu.

Prolaminy są białkami roślinnymi występującymi w nasionach traw, rozpuszczalnymi w 70% etanolu. Charakteryzują się dużą zawartością kwasu glutaminowego i proliny oraz małą ilością lizyny. Przykładem prolamin jest gliadyna z ziarna pszenicy występująca w glutenie.

Skleroproteiny to zwierzęce białka fibrylarne nierozpuszczalne w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli, kwasów i zasad. Charakteryzują się dużą zawartością cysteiny, proliny i hydroksyproliny. W skład tej grupy białek wchodzi białko tkanki łącznej: kolagen i elastyna, keratyna występująca we włosach i wytworach naskórka: paznokciach, kopytach, rogach i piórach, a także fibroina jedwabiu.

Podobnie jak białka proste, białka złożone cechuje różnorodność właściwości i funkcji. Poniżej przedstawiono podział tej grupy białek ze względu na rodzaj grupy niebiałkowej wchodzącej w skład cząsteczki (Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Rodzaje białek złożonych

składnik niebiałkowy	nazwa grupy białek	przykłady
cukry	glikoproteiny	owoalbumina α_1 -glikoproteina osocza krwi przeciwciała receptory komórkowe mucyna
lipidy	lipoproteiny	HDL – lipoproteiny o dużej gęstości IDL – lipoproteiny o pośredniej gęstości LDL – lipoproteiny o małej gęstości VLDL – lipoproteiny o bardzo małej gęstości chylomikrony
kwasy nukleinowe	nukleoproteiny	nukleoprotaminy nukleohistony proste wirusy roślinne
reszty kwasu fosforowego	fosfoproteiny	kazeina
jony metali	metaloproteiny	hemoglobina oksygenazy ferrytyna ceruloplazmina
barwniki	chromoproteiny	hemoglobina rodopsyna

Powyższy podział białek złożonych w wielu przypadkach nie jest jednoznaczny, gdyż niektóre białka mogą należeć jednocześnie do kilku grup np. hemoglobina będąca zarówno metaloproteiną i chromoproteiną, czy β_1 -lipoproteina zawierająca poza resztami cholesterolu i fosfolipidów także reszty cukrowe.

Przyjmując jako kryterium podziału białek ich kształt i rozpuszczalność można je podzielić na białka fibrylarne i globularne.

Białka fibrylarne (włóknkowe) posiadają wydłużony kształt, często tworzą włókna i zwykle są nierozpuszczalne w wodzie. W skład tej grupy białek wchodzi kolageny, elastyna (składniki tkanek łącznych), keratyny (główny składnik skóry, włosów, piór), fibryna (tworzy skrzepy we krwi).

Białka globularne mają kształt zbliżony do kulistego, są na ogół dobrze rozpuszczalne w wodzie, zwykle są bardziej wrażliwe na wysoką temperaturę i zmiany pH niż białka włóknkowe. W tej grupie białek znajdują się m.in. białka pełniące funkcje regulatorowe: hormony, przeciwciała, enzymy.

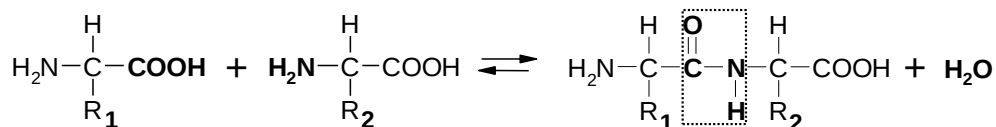
Różnorodność białek znajduje także odzwierciedlenie w pełnionych przez nie funkcjach i w udziale we wszystkich procesach życiowych organizmów żywych oraz wirusów (Tab. 3.2).

Tab. 3.2 Funkcje białek

funkcja	opis	przykłady
mechaniczno-strukturalna	materiał budulcowy komórek i tkanek	kolagen elastyna keratyna
ruch uporządkowany	• praca mięśni • przemieszczanie się chromosomów w czasie mitozy • poruszanie się plemników	aktyna miozyna
transport	transport tlenu oraz innych cząsteczek i jonów	hemoglobina mioglobina lipoproteiny transferyna
magazynowanie	magazynowanie związków różnego typu	ferrytyna
kataliza enzymatyczna	enzymy różnych klas: oksydoreduktazy transferazy hydrolazy liazy izomerazy ligazy	katalaza glukokinaza trypsyna cyklaza adenylanowa izomeraza glukozofosforanowa syntetaza glutationowa
regulatorowa	• regulacja ciśnienia wewnątrzustrojowego i kontrola pH • czynniki wzrostu organizmów wyższych • kontrola procesów biochemicznych przez hormony, inhibitory i inne typy białek • kontrola wzrostu i różnicowania przez białka represorowe w bakteriach	albumina surowicy krwi hemoglobina NGF – czynnik wzrostu nerwu insulina, serpiny, kinazy białkowe represor operonu laktozowego (represor lac)
ochronna	• elementy powłok ciała – skóra i wytwory naskórka • ochrona immunologiczna • zapobieganie wykrwawieniu	kolagen, elastyna, keratyna przeciwciała fibrynogen
komunikacja	wytwarzanie i przenoszenie impulsów nerwowych	rodopsyna receptor acetylocholinowy

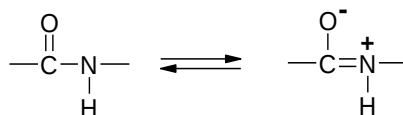
3.2. WIĄZANIE PEPTYDOWE

Cząsteczki białek zbudowane są z aminokwasów połączonych wiązaniami amidowymi nazywanymi wiązaniami peptydowymi. Wiązanie peptydowe powstaje w wyniku reakcji grupy karboksylowej jednego aminokwasu i grupy aminowej kolejnego aminokwasu z wydzieleniem cząsteczki wody (Rys. 3.1).



Rys. 3.1 Reakcja powstawania wiązania peptydowego

Wiązanie peptydowe ma w 40% charakter wiązania podwójnego (Rys. 3.2), o czym świadczy m.in. jego długość – 0,132 nm. Wartość ta stanowi wartość pośrednią między długością wiązania pojedynczego (0,149 nm) a podwójnego (0,127 nm) pomiędzy atomami węgla i azotu.



Rys. 3.2 Częściowo podwójny charakter wiązania peptydowego

Kolejną cechą wiązania peptydowego jest jego planarność, bowiem wszystkie atomy wchodzące w skład ugrupowania peptydowego (grupa karbonylowa, atom azotu i atom wodoru) leżą w jednej płaszczyźnie. Wiązanie peptydowe niemal zawsze przyjmuje konfigurację trans, tzn. atom tlenu grupy karbonylowej i atom wodoru grupy –NH znajdują się po przeciwnych stronach wiązania. Taka konfiguracja jest korzystna energetycznie z uwagi na brak przeszkód sterycznych między łańcuchami bocznymi aminokwasów tworzących wiązanie peptydowe. Wyjątkiem od tej reguły są wiązania X–Pro (X – dowolna reszta aminokwasowa), gdzie możliwa jest zarówno konfiguracja trans jak i cis (atom wodoru znajduje się po tej samej stronie wiązania peptydowego co atom tlenu).

Częściowo podwójny charakter wiązania peptydowego powoduje, że jest ono sztywne i nie ma możliwości rotacji wokół niego. W przeciwieństwie do tego wiązania, wiązania między węglem α i karbonylowym atomem węgla oraz węglem α i atomem azotu są pojedyncze i istnieje możliwość swobodnej rotacji wokół nich (Rys. 3.5). Obydwa fakty mają fundamentalne znaczenie dla budowy białek, co omówiono w dalszych częściach rozdziału.

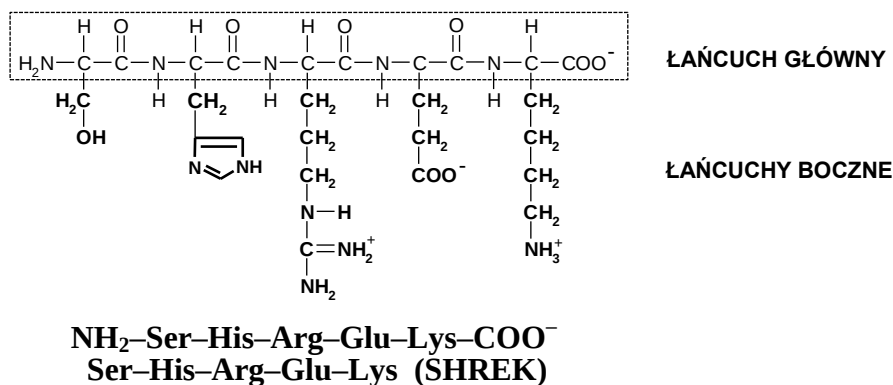
W białkach, poza wiązaniami peptydowymi utworzonymi pomiędzy grupami aminowymi i karboksylowymi połączonymi z węglami α kolejnych aminokwasów (ten typ wiązania nazywany jest czasami wiązaniem eupeptydowym), spotyka się również wiązania izopeptydowe, czyli wiązania amidowe, w których utworzenie zaangażowane są grupy aminowe lub karboksylowe znajdujące się w łańcuchach bocznych aminokwasów.

3.3. BUDOWA I NAZEWNICTWO PEPTYDÓW

Aminokwasy, łącząc się ze sobą poprzez wiązania peptydowe, mogą tworzyć cząsteczki różnej wielkości. W przypadku cząsteczek zawierających kilka aminokwasów mówimy odpowiednio o dipeptydach, tripeptydach, tetrapeptydach itd. Cząsteczki zawierające 10–20 reszt aminokwasowych to oligopeptydy, natomiast cząsteczki zbudowane z ponad 50–100 reszt aminokwasowych to polipeptydy. W przypadku polipeptydów o masie cząsteczkowej powyżej 10 000 Da mówimy o białkach. Ponieważ przeciętna masa aminokwasu wynosi ok. 110 Da, przyjmuje się, że białka to cząsteczki posiadające ponad 100 aminokwasów.

Charakterystyczną cechą budowy łańcuchów polipeptydowych jest występowanie połączonych ze sobą, powtarzających się grup peptydowych i węgli α, tworzących łańcuch główny (szkielet cząsteczki) oraz obecność łańcuchów bocznych o różnej budowie, należących do aminokwasów tworzących cząsteczkę (Rys. 3.3).

Przyjęto, że sekwencje aminokwasowe peptydów i białek będą zapisywane w kierunku od N-końca do C-końca, czyli w taki sposób, że aminokwas z wolną grupą aminową znajduje się z lewej strony, a z wolną grupą karboksylową z prawej strony. Poniżej przedstawiono cztery możliwe sposoby zapisu sekwencji przykładowego peptydu przy użyciu wzorów strukturalnych oraz trzyliterowych i jednoliterowych skrótów nazw aminokwasów (Rys. 3.3).



Rys. 3.3 Budowa przykładowego peptydu

Stan uprotonowania grup funkcyjnych odpowiada warunkom $\text{pH} = 7,0$; dodatkowo zaznaczono łańcuch główny peptydu, utworzony przez jednostki peptydowe i węgle α poszczególnych aminokwasów.

Systematyczna nazwa powyższego peptydu to L-serylo-L-histydylo-L-arginylo-L-glutamylo-L-lizyna. Pomijając konfigurację aminokwasów budujących ten peptyd, jego nazwa będzie wyglądała następująco: serylohistydyloarginyloglutamylolizyna.

W odniesieniu do mieszaniny polimerów tego samego aminokwasu, np. alaniny, o różnej długości możemy użyć nazwy: oligoalanina, polialanina lub poli-L-alanina. Ze względu na dość skomplikowane nazwy, zwłaszcza dłuższych peptydów, często stosuje się nazwy zwyczajowe, szczególnie w odniesieniu do peptydów występujących naturalnie.

W tym miejscu warto wspomnieć o peptydach posiadających znaczenie fizjologiczne. Wśród nich znajdują się m.in. występujący w mięśniach neuropeptyd karnozyna (dipeptyd), biorący udział w procesach oksydacyjno-redukcyjnych glutation ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$), zwiększający ciśnienie krwi oktapeptyd angiotensyna, oligopeptydy występujące w mózgu, odpowiedzialne za kontrolę odczuwania bólu – enkefaliny czy hormon zwiększający stężenie glukozy we krwi – glukagon zbudowany z 29 reszt aminokwasowych.

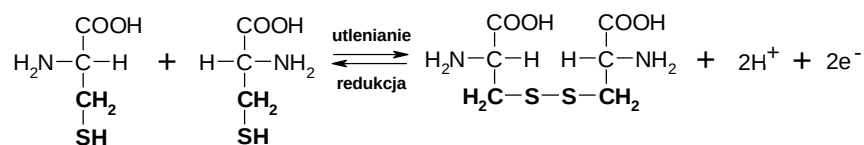
Interesującą grupę peptydów stanowią peptydy cykliczne, powstające wskutek utworzenia wiązania peptydowego przez N-kończową grupę aminową i C-kończową grupę karboksylową. Tego typu peptydy są często syntetyzowane przez mikroorganizmy, np. antybiotyk gramicydyna S – oktapeptyd produkowany przez szczep *Bacillus brevis*, zawierający aminokwasy nietypowe (L-Orn) oraz aminokwasy szeregu D (D-Phe, D-Orn).

3.4. MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE BIAŁEK

Po zakończeniu procesu translacji, białka mogą ulegać licznym modyfikacjom, w rezultacie czego w ich cząsteczkach poza aminokwasami kodowanymi genetycznie (rozdział 2.2.) występują także aminokwasy innego typu. Potranslacyjna obróbka białek ma na celu uzyskanie cząsteczek posiadających odpowiednią strukturę, zapewniającą właściwą funkcję fizjologiczną. Modyfikacje dotyczą łańcuchów bocznych aminokwasów i możemy wśród nich wymienić:

- fosforylację grup hydroksylowych seryny, treoniny, tyrozyny, hydroksyproliny;
- glikozylację, polegającą na przyłączeniu fragmentu węglowodanowego, zawierającego od dwóch do piętnastu cząsteczek monocukrów (np. N-acetyloglukozoamina, mannoza, galaktoza) poprzez grupę hydroksylową seryny lub treoniny (wiązanie O-glikozydowe), poprzez grupę amidową asparaginy (wiązanie N-glikozydowe) albo przez wolną grupę karboksylową kwasu asparaginowego lub glutaminowego (wiązanie estrowe);
- palmitynację, polegającą na wiązaniu 16-węglowej grupy palmitynowej do grupy tiolowej cysteiny, najczęściej wiązaniem tioestrowym;
- prenylację, polegającą na tioeterowym wiązaniu grup prenylowych (np. grup izoprenoidowych, 15-węglowego farnezyli i 20-węglowego geranylogeranyli) do grupy tiolowej cysteiny, występującej blisko C-końca peptydu.

Poniżej podano niektóre modyfikacje potranslacyjne wraz z przykładami aminokwasów zmodyfikowanych (Rys. 3.4, Tab. 3.3).



Rys. 3.4 Reakcja powstawania cząsteczki cystyny

Tab. 3.3 Modyfikacje potranslacyjne aminokwasów

aminokwas zmodyfikowany	wzór	rodzaj modyfikacji potranslacyjnej	przykładowa funkcja
cystyna	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \quad \text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \quad \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2 \end{array} $	utlenianie grup hydrosulfidowych dwóch reszt cysteiny, co prowadzi do powstania wiązania disiarczkowego	udział w tworzeniu struktury przestrzennej białek
acetyloseryna	$ \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \quad \text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array} $	acetylacja grupy aminowej	wzrost odporności na trawienie
kwas piroglutaminowy	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{COOH} \\ \quad \\ \text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \\ \text{O}=\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{C} \quad \quad \text{H}_2 \end{array} $	cyklizacja kwasu glutaminowego przez utworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania amidowego między grupą α-aminową i γ-karboksylową	wzrost odporności na trawienie zwiększenie okresu półtrwania
kwas γ-karboksyglutaminowy	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{HOOC} \quad \text{COOH} \end{array} $	karboksylacja	wpływ na krzepnięcie krwi poprzez zapewnienie właściwej struktury protrombiny
4-hydroksyprolina	$ \begin{array}{c} \text{H}_2 \quad \text{COOH} \\ \quad \\ \text{C} \quad \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{HO} \quad \text{C}-\text{NH} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \quad \text{H}_2 \end{array} $	hydroksylacja	stabilizacja włókien kolagenu
5-hydroksylizyna	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2 \end{array} $		
fosfoseryna	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{PO}_3^{2-} \end{array} $	fosforylacja grupy hydroksylowej	modyfikacja aktywności enzymów/białek uczestniczących w regulacji procesów komórkowych
fosfotreonina	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{PO}_3^{2-} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $		
fosfotyrozyna	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{PO}_3^{2-} \end{array} $		

3.5. STRUKTURA BIAŁEK

Białka posiadają budowę przestrzenną, w której możemy wyróżnić kilka poziomów organizacji, omówionych poniżej.

Struktura I-rzędowa to najniższy i zarazem podstawowy poziom organizacji białek, tożsamy z sekwencją, czyli kolejnością aminokwasów, w jakiej występują one w łańcuchu polipeptydowym. Sekwencja aminokwasowa jest kodowana genetycznie i determinuje struktury wyższego rzędu.

Struktura II-rzędowa określa sposób sfałdowania łańcucha polipeptydowego, definiowany jako wzajemne ułożenie sąsiednich reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym. Podstawowe znaczenie w tworzeniu struktur drugorzędowych ma sztywność wiązania peptydowego, możliwość swobodnej rotacji wokół sąsiadujących z nim wiązań oraz tworzenie wiązań wodorowych między grupami $-NH$ i $-CO$ łańcucha głównego. Wyróżniamy kilka typów struktur II-rzędowych:

Struktury helikalne powszechnie występują w białkach fibrylarnych i globularnych. Najczęściej spotykaną jest α -helisa (helisa $3,6_{13}$) – prawoskrętna struktura cylindryczna, w której na jeden skręt przypada 3,6 reszt aminokwasowych, a ilość atomów (włączając wodór) zamkniętych w pierścien dzięki utworzeniu wiązania wodorowego wynosi 13.

Kilka helis α oplatając się wokół siebie może tworzyć helisy wyższego rzędu, jak np. w miozynie, fibrynie czy keratynie. Inne typy helis występujących w białkach to **helisy typu $2,2_7$, 3_{10} i $4,4_{16}$ (helisa π)**.

Struktury β (harmonijki β , β -kartki) charakteryzują się tym, że tworzą je znajdujące się w jednej płaszczyźnie łańcuchy polipeptydowe, połączone siatką wiązań wodorowych pomiędzy grupami $-CO$ i $-NH$ sąsiednich łańcuchów, które mogą być ułożone w jednym kierunku (**równoległa β -struktura**) lub w kierunkach przeciwnych (**antyrównoległa β -struktura**). Przykładem białka zbudowanego niemal wyłącznie z antyrównoległych β -struktur jest fibroina jedwabiu.

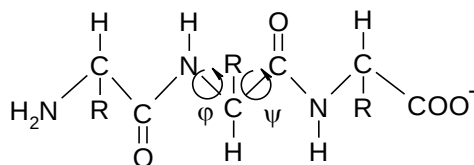
Skręty (zwroty β , zagięcia spinki do włosów) to struktury powodujące zmianę kierunku przebiegu łańcucha polipeptydowego, powstające dzięki utworzeniu wiązania wodorowego między grupą $-CO$ reszty n i grupą $-NH$ reszty $n+3$; często łączą antyrównoległe struktury β .

Struktura III-rzędowa określa wzajemne przestrzenne położenie struktur drugorzędowych oraz lokalizację mostków disiarczkowych.

Struktura IV-rzędowa dotyczy organizacji budowy białek podjednostkowych, składających się z więcej niż jednego łańcucha peptydowego, określając ich wzajemne położenie i rodzaj oddziaływań.

W białkach często spotyka się dodatkowy poziom organizacji budowy przestrzennej, cechujący się charakterystycznym układem struktur drugorzędowych, tworzących wyodrębnione jednostki globularne, nazywane domenami, będące przykładem struktury naddrugorzędowej.

Uzyskanie odpowiedniej struktury przestrzennej białka jest możliwe dzięki możliwości rotacji w łańcuchu głównym wokół wiązań pojedynczych sąsiadujących ze sztywnym, planarnym wiązaniem peptydowym. Wielkość rotacji jest definiowana przez kąty torsyjne ϕ (ϕ) i ψ (ψ). Kąt torsyjny ϕ odpowiada rotacji wokół pojedynczego wiązania między atomem azotu i węglem α , natomiast kąt ψ wokół wiązania między węglem α i węglem karbonylowym (Rys. 3.5).



Rys. 3.5 Kąty torsyjne ϕ i ψ

W utrzymaniu konformacji natywnej, zapewniającej białku właściwą aktywność biologiczną, bierze udział szereg oddziaływań, wśród których podstawowe znaczenie mają wiązania wodorowe między grupami $-CO$ i $-NH$ łańcuchów głównych. W tworzeniu wiązań wodorowych uczestniczą także łańcuchy boczne aminokwasów, które mogą być tylko donorami w tym typie wiązań (tryptofan i arginina), mogą pełnić zarówno funkcje donorów i akceptorów (asparagina, seryna, treonina) oraz będące w zależności od pH donorami albo

akceptorami (ale nigdy równocześnie) np.: lizyna, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, tyrozyna i histydyna. Wśród innych niekowalencyjnych oddziaływań między łańcuchami bocznymi aminokwasów należy wymienić: oddziaływania elektrostatyczne (przyciąganie lub odpychanie między aminokwasami posiadającymi ładunek elektryczny w fizjologicznym pH), w tym mostki solne – bardzo stabilne oddziaływania elektrostatyczne, oddziaływania van der Waalsa oraz oddziaływania hydrofobowe.

Jak już wspomniano powyżej, odpowiednie sfałdowanie łańcucha polipeptydowego i uzyskanie konformacji natywnej jest warunkiem niezbędnym, aby białko mogło właściwie pełnić przypisaną mu funkcję. W przypadku białek o budowie podjednostkowej, struktura przestrzenna może ulegać odwracalnym zmianom, połączonym ze zmianą aktywności biologicznej. Zjawisko to nazywamy **allosterią** i zachodzi ono wskutek przyłączenia tzw. efektorów allosterycznych do centrów allosterycznych, położonych w miejscach odległych przestrzennie od miejsca, w którym zachodzą zmiany konformacji białka. Do białek allosterycznych należy wiele enzymów, których konformacja może zmieniać się pod wpływem substratów, inhibitorów lub aktywatorów, a także hemoglobina, której efektorami allosterycznymi są tlen, CO₂ i H⁺.

Poznanie struktury przestrzennej białek daje w wielu przypadkach możliwość zrozumienia ich funkcji i sposobu działania, co ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale także praktyczne np. w projektowaniu nowych cząsteczek o pożądanych właściwościach. W określaniu budowy przestrzennej białek wykorzystuje się techniki rentgenograficzne i NMR oraz w pewnym stopniu dichroizm kołowy.

3.6. DENATURACJA BIAŁEK

W zależności od swej budowy białka w różnym stopniu mogą być wrażliwe na działanie czynników fizycznych i chemicznych powodujących zniszczenie struktury przestrzennej i tym samym utratę funkcji biologicznych. Proces ten nosi nazwę **denaturacji** i polega na zniszczeniu wszystkich poziomów organizacji cząsteczki białka, poza strukturą pierwszorzędową. Do denaturacji białka dochodzi wskutek zerwania wiązań wodorowych, oddziaływań van der Waalsa, oddziaływań elektrostatycznych i (nie zawsze) wiązań disiarczkowych. Powoduje to rozfałdowanie łańcucha polipeptydowego i przyjęcie przez białko konformacji kłęбка statystycznego.

Wskutek denaturacji białka zmieniają się jego właściwości fizykochemiczne. Traci ono cechy koloidu hydrofilowego, gdyż zostaje pozbawione otoczki wodnej i zmniejsza się jego rozpuszczalność w punkcie izoelektrycznym. Poza tym białka zdenaturowane są bardziej podatne na hydrolizę enzymatyczną.

Denaturacji białek nie należy utożsamiać z wytrącaniem (rozdział 3.9.3), ponieważ wiele białek można wytrącić z roztworu nie denaturując ich. Poza tym białka można denaturować nie wytrącając ich z roztworu.

Niektóre białka, w szczególności te o prostej budowie, po usunięciu czynnika denaturującego mogą odzyskać natywną konformację i pełną aktywność biologiczną. Proces ten nosi nazwę **renaturacji**. W przypadku ekspozycji białka na ekstremalne warunki np. silne ogrzewanie, denaturacja jest procesem nieodwracalnym.

Fizyczne i chemiczne czynniki denaturujące białka przedstawiono i krótko scharakteryzowano poniżej (Tab. 3.4).

Tab. 3.4 Czynniki powodujące denaturację białek

czynnik	obserwowany efekt
ciepło (wysoka temperatura)	rozerwanie wiązań wodorowych
promieniowanie UV	rozerwanie wiązań wodorowych
promieniowanie jonizujące	rozerwanie oddziaływań niekowalencyjnych i wiązań disiarczkowych
ultradźwięki	rozerwanie wiązań wodorowych
gwałtowne mieszanie, ubijanie	rozerwanie wiązań wodorowych
znaczne zmiany pH	zmiana układu wiązań jonowych
stężone kwasy i zasady	tworzenie soli, niszczenie wiązań wodorowych, precypitacja białek
metale ciężkie np. rtęć, srebro, ołów	zniszczenie oddziaływań elektrostatycznych i w pewnym stopniu wiązań disiarczkowych

detergenty, np. SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłu)	rozerwanie wiązań hydrofobowych, oddziaływanie z białkiem przez tworzenie wiązań wodorowych
mocznik	tworzenie konkurencyjnych wiązań wodorowych z białkiem
guanidyna	tworzenie konkurencyjnych wiązań wodorowych z białkiem
garbniki	tworzenie konkurencyjnych wiązań wodorowych z białkiem
β -merkaptoetanol	przy niskim stężeniu tworzy mieszane mostki disiarczkowe z łańcuchami bocznymi cysteiny, przy nadmiarze β -merkaptoetanolu następuje dalsza redukcja
rozpuszczalniki organiczne np. etanol, aceton (w długim okresie czasu i w temp. pokojowej)	zmiana stałej dielektrycznej i hydratacji grup jonowych, precypitacja

3.7. ANALIZA SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ BIAŁEK

Poznanie struktury białka jest pomocne w zrozumieniu jego właściwości oraz funkcji i poza celami poznawczymi, ma również znaczenie praktyczne np. w projektowaniu cząsteczek o określonych właściwościach. Znajomość struktury pierwszorzędowej białka jest bardzo pomocna w określeniu jego struktury przestrzennej (metodami krystalograficznymi lub jądrowego rezonansu magnetycznego – NMR), natomiast w określaniu sekwencji białka bywa użyteczna znajomość składu aminokwasowego (rozdział 3.14).

Najczęściej wykorzystywaną metodą oznaczania sekwencji aminokwasowej peptydów i białek jest **degradacja Edmana**. W metodzie tej fenyloizotiocyanian (PITC) w środowisku zasadowym reaguje z grupami α -aminowymi aminokwasu N-końcowego, w wyniku czego tworzy się fenylotiokarbamoilowa pochodna białka (PTC-białko). Następnie w środowisku kwaśnym dochodzi do odcięcia pierwszego aminokwasu, dzięki czemu uzyskujemy nowy N-końiec cząsteczki i cykliczną, fenylotiohydantoinową pochodną aminokwasu N-końcowego (PTH-aminokwas), identyfikowaną chromatograficznie. Powyższe reakcje są powtarzane dla kolejnych aminokwasów, w rezultacie czego uzyskuje się sekwencję aminokwasową białka. Analizy sekwencji aminokwasowej wykonuje się rutynowo, dzięki wykorzystaniu urządzeń zwanych sekwenatorami. W czasie jednej analizy można oznaczyć sekwencję 30–40 reszt aminokwasowych, dlatego w przypadku większych cząsteczek białka konieczne jest pocięcie ich przed analizą na mniejsze fragmenty. W tym celu powszechnie wykorzystuje się bromocyjan oraz proteinazy specyficznie hydrolizujące określone wiązania peptydowe (Tab. 3.5).

Tab. 3.5 Czynniki wykorzystywane do selektywnego cięcia białek na fragmenty

czynnik	miejsce cięcia
CNBr	–Met↓X–
trypsyna	–Arg↓X–, –Lys↓X–
chymotrypsyna	–Tyr↓X–, –Trp↓X–, –Phe↓X–
proteinaza V8	–Glu↓X–, –Asp↓X–

X – dowolny aminokwas

Jeżeli zachodzi konieczność analizy sekwencji łańcucha peptydowego w kierunku od C-końca do N-końca, można wykorzystać np. karboksypeptydazę A i karboksypeptydazę B. W identyfikacji aminokwasu C-końcowego użyteczna jest także reakcja z hydrazyną, w wyniku której wiązania peptydowe zostają rozerwane i powstają kwaśne hydrazydy wszystkich aminokwasów z wyjątkiem aminokwasu C-końcowego.

3.8. PROTEOMIKA

Proteomika to nauka z dziedziny biologii molekularnej, mająca na celu analizę proteomu, czyli wszystkich białek kodowanych przez genom danego organizmu. W badaniu proteomu wykorzystuje się liczne techniki laboratoryjne, w szczególności elektroforezę dwukierunkową (początkowo rozdział białek prowadzi się ze względu na ich ładunek elektryczny, a następnie wielkość cząsteczek), techniki chromatograficzne i spektrometrię masową.

Możliwość wykorzystania tych badań w analizie proteomu człowieka i organizmów chorobotwórczych może mieć znaczenie kliniczne w opracowywaniu nowych metod diagnostyki i terapii różnych jednostek chorobowych, w tym chorób zakaźnych i nowotworów. Niestety, zbadanie proteomu człowieka jest o wiele trudniejsze od badania genomu. Główną przeszkodą nie jest ilość białek syntetyzowanych przez organizm (znacznie większa niż ilość genów), lecz ich duża zmienność, zależna od tkanki, wieku, płci, fizjologicznego stanu organizmu, warunków bytowania itp.

3.9. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE BIAŁEK

3.9.1. Widmo białka w zakresie światła ultrafioletowego

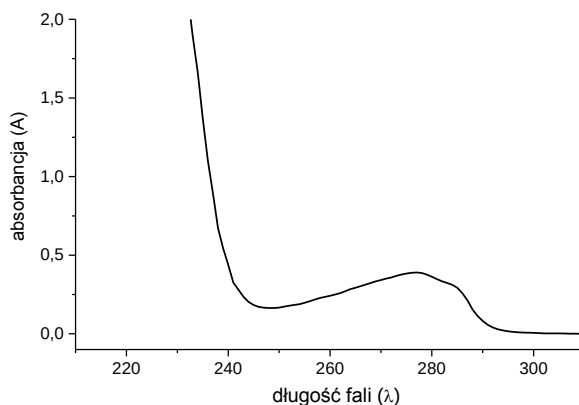
Zasada metody

Obecność w białkach wiązań peptydowych oraz aminokwasów aromatycznych powoduje, że związki te absorbują światło ultrafioletowe w zakresie 210-230 nm (wiązanie peptydowe) i 260-280 nm (aminokwasy aromatyczne) – Rys. 3.6. Obecność maksimum absorpcji w zakresie bliskiego ultrafioletu (około 280 nm) wynika z właściwości spektralnych przede wszystkim reszt tryptofanu oraz tyrozyny i w mniejszym stopniu fenyloalaniny (Tab. 2.3) oraz obecności wiązań disiarczkowych. Maksimum absorpcji w zakresie dalekiego ultrafioletu (poniżej 230 nm) to efekt występowania w białkach wiązań peptydowych (posiadających częściowo podwójny charakter) oraz w pewnym zakresie reszt Trp, Tyr, Phe, Cys-Cys, His, Met i Arg.

Intensywność absorbowania światła w ultrafiolecie zależy zarówno od składu aminokwasowego jak i struktury białka, bowiem jego fałdowanie istotnie wpływa na aktywność optyczną reszt aminokwasowych, dlatego każde białko posiada indywidualne widmo charakterystyczne dla danego pH i siły jonowej.

Poza charakterystycznymi maksimami absorpcji w ultrafiolecie białka złożone posiadające grupy chromoforowe (np. hemoglobina, cytochrom) posiadają dodatkowe maksima absorpcji w zakresie światła widzialnego.

Pomiar absorbancji przy 280 nm jest jedną z podstawowych metod ilościowego oznaczania białek (rozdział 3.10).



Rys. 3.6 Widmo absorpcyjne białka w ultrafiolecie

Postępowanie

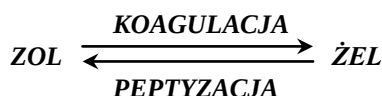
1. Oznaczyć absorbancję 0,1% roztworu albuminy surowicy bydlęcej w UV w zakresie 220–300 nm (co 10 nm) wobec 0,9% NaCl.
2. Wykreślić krzywą zależności absorbancji od długości fali.

Materiały i odczynniki

- 0,1% roztwór albuminy surowicy bydlęcej (BSA) w 0,9% NaCl
- 0,9% roztwór NaCl

3.9.2. Właściwości koloidowe roztworów białka

Białka będące wielkocząsteczkowymi biopolimerami tworzą roztwory koloidalne (koloidy hydrofilowe) – **zole**, które mogą przekształcać się w większe, sztywne i nieregularne skupiska cząsteczek – **żele**. Wzajemne przechodzenie układu koloidalnego z postaci zolu w żel i odwrotnie: z żelu w zol, opisują pojęcia koagulacji i peptyzacji:



Koagulacja to łączenie się rozproszonych cząstek koloidu w nieregularne agregaty, które w odpowiednich warunkach można uzyskać w postaci osadu – koagulatu. Koagulacja może być procesem odwracalnym albo nieodwracalnym. Zjawiskiem odwrotnym do koagulacji jest **peptyzacja**, czyli przejście żelu (lub koagulatu) w zol.

Układ koloidowy może występować także w postaci suchego koloidu, który po dodaniu wody pęcznieje tworząc żel. Podnosząc temperaturę i dodając większe ilości wody uzyskuje się zol.

Do koagulacji lub peptyzacji białek dochodzi w specyficznych warunkach, odmiennych dla różnych białek. Podstawowe znaczenie dla stanu, w jakim znajduje się układ koloidalny mają: ładunek elektryczny białka, stopień uwodnienia, temperatura, obecność jonów. Obecność aminokwasów naładowanych występujących na powierzchni cząsteczki i nadających jej odpowiedni ładunek elektryczny powoduje, że białko posiada otoczkę hydratacyjną, która zapobiega łączeniu się cząsteczek w większe skupiska.

Pojęciem pokrewnym do koagulacji jest **flokulacja**, czyli zjawisko łączenia się cząsteczek koloidalnych w większe agregaty pod wpływem flokulantu. Dzięki temu procesowi można uzyskać zawiesinę białka w postaci kłaczków, np. wskutek dodania do roztworu elektrolitu zubożającego ładunek białka. Białko skłaczowane, w przeciwieństwie do skoagulowanego, można rozpuścić dodając kwasu lub zasady.

Koloidy hydrofilowe obniżają napięcie powierzchniowe, podwyższają lepkość roztworu, wykazują słabą opalescencję i dają słaby efekt Tyndalla. Biologiczną rolę koloidów jest utrzymanie w stanie delikatnej zawiesiny związków źle lub zupełnie nierozpuszczalnych w wodzie, obecnych w płynach ustrojowych.

Ze względu na duże rozmiary cząsteczki białka nie dyfundują przez błony półprzepuszczalne o małych porach. Można je więc oddzielić od związków drobnocząsteczkowych w procesie dializy (rozdział 3.9.7).

3.9.3. Ładunek elektryczny i wytrącanie białek z roztworu

Białka są zbudowane z aminokwasów o różnych właściwościach hydrofilowych, wynikających przede wszystkim z obecności łańcuchów bocznych zdolnych (bądź nie) do jonizacji. Większość białek rozpuszcza się w wodzie, rozcieńczonych kwasach i zasadach, a niektóre w rozpuszczalnikach organicznych. Na rozpuszczalność białka wpływa także stężenie soli nieorganicznych.

Niebagatelne znaczenie dla rozpuszczalności białek ma występowanie aminokwasów hydrofilowych na powierzchni białka. Aminokwasy te, jak również inne grupy jonizujące obecne w białku zmodyfikowanym potranslacyjnie (np. grupy fosforanowe, siarczanowe), mogą posiadać różny ładunek w zależności od pH roztworu, w którym występują. Obecność w cząsteczce białka ładunków dodatnich oraz ujemnych powoduje, że są one **amfolitami** i mogą reagować jak kwasy lub zasady. Podobnie jak w przypadku aminokwasów, możemy

mówić o **punkcie izoelektrycznym białka** (pI), czyli takim pH, w którym ilość ładunków dodatnich jest równa ilości ładunków ujemnych i wypadkowy ładunek cząsteczki wynosi 0.

Zdolność białka do posiadania różnego ładunku w zależności od pH znalazła szerokie zastosowanie w różnych technikach preparacji (wytrącanie białek z roztworu) lub analizy tej grupy związków; przede wszystkim w technikach elektroforetycznych (rozdział 3.11) i w chromatografii jonowymiennej (rozdział 3.13.1).

Obecne w białkach grupy zdolne do jonizacji oraz atomy N i O wiązań peptydowych wiążą się wiązaniami wodorowymi z dipolami wody, wskutek czego na powierzchni cząsteczki białka powstaje charakterystyczna **otoczka wodna** (hydratacyjna). Ponadto cząsteczki wody są obecne również we wnętrzu cząsteczek białka, dlatego woda ma nie tylko znaczenie strukturalne, ale również funkcjonalne.

Rozpuszczalność białka zależy od ilościowego stosunku reszt hydrofilowych do hydrofobowych w cząsteczce oraz ich rozkładu na jej powierzchni. Grupy polarne obecne w białkach mają różną zdolność do wiązania cząsteczek wody (w kolejności od najwyższej do najniższej: $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$, $-\text{SH}$). Przyjmuje się, że 1 g białka może wiązać od 0,3–0,4 g wody. Obecność cząsteczek wody na powierzchni białka zapobiega ich przyciąganiu się, agregacji i wypadaniu z roztworu, zatem powoduje większą rozpuszczalność białka. Stopień hydratacji białka zależy od jego ładunku, a ten z kolei od pH roztworu białka, w którym występuje. Białka posiadają najmniejszą otoczkę hydratacyjną w pI, co wiąże się z faktem, że cząsteczka w tym pH posiada wypadkowy ładunek 0 i najmniejszą zdolność oddziaływania z dipolami wody. Z tego powodu białka w punkcie izoelektrycznym najbardziej przyciągają się, tworzą agregaty i dlatego najłatwiej wytracają się i krystalizują. Odwadnianie białek w pH innym od pI, powoduje, że cząsteczki białka dzięki posiadaniu ładunku mogą utrzymywać się w roztworze.

O rozpuszczalności białka w wodzie decyduje fakt, że siły działające pomiędzy grupami polarnymi cząsteczek białka a dipolami wody są większe od tych, które działają między cząsteczkami białka. Jednak w niektórych białkach (np. euglobuliny) oddziaływania międzycząsteczkowe białek są tak duże, że dopiero obecność nieznacznej ilości soli powoduje ich rozerwanie. Ten proces, nazywany **wsalaniem**, zachodzi dzięki temu, że ładunki białka zostają zubożone przez aniony i kationy soli, wskutek czego cząsteczki białka nie przyciągają się i nie tworzą agregatów. Wsalanie wpływa korzystnie na rozpuszczalność białka, bowiem wykazano, że w roztworach o małym stężeniu soli logarytm rozpuszczalności białka wzrasta proporcjonalnie do siły jonowej roztworu soli. W miarę jednak zwiększania stężenia soli rozpuszczalność białka maleje, ponieważ sól eliminuje warstwę hydratacyjną otaczającą białko, odciągając dipole wody, z którymi tworzy tzw. hydraty. Na skutek utraty płaszcza wodnego białko wytrąca się z roztworu. Ten proces nazywany jest **wysalaniem**. Proces wysalania jest procesem odwracalnym. Usunięcie soli przez dializę lub obniżenie jej stężenia przez dodanie wody powoduje ponowne rozpuszczenie wysolonego białka z zachowaniem pełnej aktywności biologicznej. Poszczególne sole różnią się zdolnością wysalania białek. Przy dużych stężeniach soli rozpuszczalność białka maleje wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu soli zgodnie ze wzorem zamieszczonym poniżej.

$$\log S = \beta - K_s \cdot I$$

S – rozpuszczalność białka (liczba gramów substancji rozpuszczonej, przypadająca w roztworze nasyconym na 100 lub 1 000 g rozpuszczalnika, β – stała charakterystyczna dla danego białka zależna od pH i temperatury, K_s – stała wysalania zależna od rodzaju białka i soli, I – siła jonowa roztworu

Do wysalania białek stosuje się najczęściej następujące sole: siarczan (VI) amonu, siarczan (VI) sodu lub magnezu i chlorek sodu. Bardziej skuteczne w wysalaniu białek są sole wielowartościowe, czyli np. siarczan (VI) amonu, niż sole jednowartościowe, np. NaCl.

Niektóre czynniki tj. wysoka temperatura, niektóre kwasy organiczne, sole metali ciężkich i niektóre roztwory organiczne mogą także powodować wypadanie białek z roztworu, ale z ich równoczesną denaturacją. W przypadku niektórych z tych czynników duże znaczenie w wytrącaniu białka mają ładunek i utrata otoczki hydratacyjnej.

Kationy metali ciężkich (ołów, rtęć) mogą oddziaływać z białkami, gdy te są anionami, czyli w pH powyżej pI, tworząc trudno rozpuszczalne sole.

Zakwaszenie roztworu białka powoduje, że białka występują w postaci kationów. Umożliwia to im oddziaływanie z anionami kwasu. Niektóre kwasy organiczne (np. kwas trichlorooctowy) tworzą z białkami nierozpuszczalne sole i denaturują je, dzięki czemu znalazły zastosowanie jako czynniki odbiałczające (rozdział

3.9.5). Kwasy mineralne w niewielkich stężeniach powodują wytrącanie białka, natomiast w wyższych stężeniach ponownie je rozpuszczają i niekiedy hydrolizują.

Zasady nie wytrącają białek, ale powodują ich hydrolizę (rozdział 3.14.1) i tlenowy rozkład.

Wytrącające działanie rozpuszczalników organicznych, np. etanolu lub acetonu, polega na odwadnianiu przez nie białek, zmniejszeniu stałej dielektrycznej i osłabieniu oddziaływań hydrofobowych. Długotrwałe działanie tych rozpuszczalników, zwłaszcza w temp. pokojowej, prowadzi do denaturacji białek i trwałej utraty przez nie rozpuszczalności.

Wytrącanie białek różnymi stężeniami soli, alkoholu lub acetonu (w niskich temperaturach) jest jedną z podstawowych i najprostszych metod wydzielania i frakcjonowania tych związków (rozdział 3.9.6, 3.13.6).

3.9.4. Punkt izoelektryczny kazeiny

Zasada metody

Wartość pH roztworu, w którym następuje zrównoważenie ładunków dodatnich i ujemnych na powierzchni białka, określa się jako punkt izoelektryczny – pI białka. W roztworze o pH = pI białka posiadają najmniejszą rozpuszczalność i wytrącają się z roztworu. Obserwacja stopnia wytrącenia się białka w roztworach o różnych wartościach pH pozwala dość precyzyjnie ustalić wartość pI białka.

W doświadczeniu tym wykorzystuje się brak rozpuszczalności kazeiny w punkcie izoelektrycznym. Odpowiednie pH uzyskuje się, zmieniając stężenie kwasu octowego przy stałym stężeniu octanu sodu. Wartość pH poszczególnych roztworów oblicza się z równania Hendersona–Hasselbalcha:

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{kw}} + \log \frac{[\text{sól}]}{[\text{kwas}]},$$

gdzie: pK_{kw} – ujemny logarytm stałej dysocjacji kwasu; dla kwasu octowego $\text{pK}_{\text{kw}} = 4,73$; w nawiasach kwadratowych stężenia molowe.

Postępowanie

1. Do 9 probówek odmierzyć podane w tabeli objętości roztworów kwasu octowego i wody.
2. Dodać kroplami po 1 ml 0,5% roztworu kazeiny w 0,1 M octanie sodu. Po każdej dodanej kropli wstrząsnąć probówką.
3. Po 30 minutach odczytać wyniki oznaczając brak zmętnienia (–) lub różne stopnie zmętnienia (+, ++, +++).
4. Obliczyć pH każdej próby i podać wartość punktu izoelektrycznego kazeiny.

roztwór	nr probówki								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,01 M CH ₃ COOH (ml)	0,6	1,3	–	–	–	–	–	–	–
0,1 M CH ₃ COOH (ml)	–	–	0,3	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	–
1,0 M CH ₃ COOH (ml)	–	–	–	–	–	–	–	–	1,6
woda (ml)	8,4	7,7	8,7	8,5	8,0	7,0	5,0	1,0	7,4
zmętnienie									
pH									

Materiały i odczynniki

- kwas octowy o stężeniu: 0,01 M, 0,1 M i 1 M
- 0,5% roztwór kazeiny w 0,1 M octanie sodu

3.9.5. Wytrącanie białek kwasem chlorowym (VII), sulfosalicylowym i trichlorooctowym

Zasada metody

Aniony kwasu chlorowego (VII) (nadchlorowego), sulfosalicylowego oraz trichlorooctowego mogą tworzyć z kationami białka nierozpuszczalne sole i powodować denaturację większości białek. Z tego powodu kwasy te są powszechnie wykorzystywanymi czynnikami odbiałczającymi, używanymi do usuwania białek balastowych.

Postępowanie

1. Do 1 ml 1% roztworu białka jaja dodać równą objętość kwasu nadchlorowego.
2. Powtórzyć doświadczenie stosując kwas sulfosalicylowy i trichlorooctowy.
3. Zbadać rozpuszczalność osadów w wodzie i NaOH.

Materiały i odczynniki

- 1% roztwór białka jaja kurzego
- 1,2 M kwas chlorowy (VII) (nadchlorowy)
- 0,3 M kwas sulfosalicylowy
- 10% kwas trichlorooctowy
- 2 M NaOH

3.9.6. Wysalanie albumin i globulin surowicy krwi

Zasada metody

W surowicy krwi występują dwie grupy białek: albuminy i globuliny. Albuminy są białkami dobrze rozpuszczalnymi w wodzie i mającymi większe powinowactwo do wody. Globuliny są nierozpuszczalne w wodzie i tracą wodę hydratacyjną już przy połowicznym nasyceniu roztworu siarczanu (VI) amonu, natomiast albuminy wysalają się dopiero przy całkowitym nasyceniu roztworu tą solą.

Proces wysalania białek szczegółowo omówiono w rozdziale 3.9.3.

Postępowanie

1. Do 5 ml surowicy czterokrotnie rozcieńczonej 0,9% NaCl dodać równą objętość nasyconego roztworu siarczanu (VI) amonu. Po zmieszaniu pozostawić na okres 15 minut. Wytrącający się osad globulin należy odsączyć lub odwirować.
 2. Do przesączu dodawać małymi porcjami rozdrobiony siarczan (VI) amonu w substancji, przy stałym mieszaniu (najlepiej na mieszadle magnetycznym), tak długo aż na dnie zlewki pozostaną nierozpuszczalne kryształki soli. Roztwór stopniowo mętnieje, co świadczy o wytrącaniu się albumin. Wytrącone albuminy odsączyć lub odwirować.
 3. Przesącz skontrolować na obecności białka 0,3 M kwasem sulfosalicylowym (rozdział 3.9.5).
 4. Wytrącony osad albumin rozpuścić w około 2 ml wody. Siarczan (VI) amonu obecny w preparacie uzyskanym tą metodą można usunąć przez dializę lub sączenie molekularne.
- 4A. Odsalanie przez dializę:** Połowę roztworu albuminy umieścić w woreczku dializacyjnym, zamknąć kocherem i zanurzyć w zlewce z wodą, umieszczonej na mieszadle magnetycznym. W czasie dializy wymienić kilkakrotnie wodę w zlewce i prowadzić proces do zaniku reakcji strąceniowej na obecność jonów SO_4^{2-} z $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Proces dializy omówiono w rozdziale 3.9.7.
- 4B. Odsalanie przez sączenie molekularne.** Zasadę metody omówiono w rozdziale 3.9.8.
- a. Na kolumnę o wymiarach 300×15 mm, wypełnioną złożem Sephadex G-15 lub G-25, nanieść ostrożnie (nie naruszając jej powierzchni) 1 ml roztworu wysolonej albuminy. W momencie nanoszenia zamknąć wypływ z kolumny.
 - b. Po naniesieniu otworzyć wypływ i po wnikięciu roztworu białka do złoża delikatnie opłukać ścianki kolumny wodą. Pozostawić nad powierzchnią złoża 1–2 cm wody i podłączyć zbiornik z eluentem. Elucję prowadzić z szybkością około 1 ml/min; zebrać 15 frakcji o objętości 3 ml.
 - c. W zebranych frakcjach oznaczyć absorbancję przy 280 nm oraz wykonać reakcję strąceniową na obecność anionów siarczanowych przy pomocy $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

- d. Frakcje albuminy wolne od soli połączyć, oznaczyć ich absorbancję przy 280 nm, a następnie wyliczyć stężenie białka przyjmując, że właściwy współczynnik absorpcji dla albuminy surowicy – a_{280} wynosi 0,667.
- e. Preparat pozostawić do sprawdzenia stopnia czystości w elektroforezie w żelu poliakryloamidowym.

Materiały i odczynniki

- surowica krwi bydlęcej
- 0,9% roztwór NaCl
- siarczan (VI) amonu w substancji
- nasycony roztwór siarczanu (VI) amonu
- 0,1 M Ba(OH)₂
- 0,3 M kwas sulfosalicylowy
- Sephadex G-25 lub G-15
- kolumna szklana o wymiarach 300 × 15 mm

3.9.7. Dializa

Zasada metody

Dializa to dyfuzja niektórych cząsteczek i jonów przez błonę półprzepuszczalną, rozdzielającą dwa roztwory. W laboratoriach biochemicznych jest wykorzystywana do odsalania roztworów białek, do wymiany w roztworze białka jednego buforu na inny oraz do oddzielenia związków drobnocząsteczkowych od makrocząsteczek w płynach ustrojowych. W dializie rolę sita pełni cienka porowata błona półprzepuszczalna oddzielająca badany roztwór od czystego rozpuszczalnika. Jeżeli badany roztwór zawiera dwa składniki, z których jeden ma bardzo dużą masę, a drugi małą (np. roztwór albuminy i siarczanu (VI) amonu) to przez pory w błonie przechodzić będzie tylko substancja drobnocząsteczkowa, a więc na drodze dializy będzie można te dwa związki oddzielić. Szybkość procesu dializy zależy od szeregu czynników. Jest ona wprost proporcjonalna do różnicy stężeń, powierzchni błony i współczynnika przepuszczalności, zależnego przede wszystkim od rodzaju użytej błony, charakteru rozdzielanych związków i temperatury.

Postępowanie

1. Do 5 ml surowicy dodać po 1 ml roztworu glukozy i NaCl. Wymieszać i umieścić w worku dializacyjnym.
2. Worek szczelnie zamknąć i zanurzyć w wodzie, w zlewce o objętości 100 ml. Zlewkę umieścić na mieszadle magnetycznym.
3. Oznaczyć czas pojawienia się soli i cukru w płynie na zewnątrz worka, pobierając co 15 minut próbki ze zlewki i wykonując próby na obecność białka, cukry redukujące i jony Cl⁻.
 - a. Wykrywanie białek: odczyn biuretowy (rozdział 0) lub jedna z prób doświadczenia 3.9.5.
 - b. Wykrywanie cukrów redukujących: próba Trommera (rozdział 5.1.6.1.)
 - c. Wykrywanie jonów Cl⁻: do 1 ml badanego roztworu dodać kroplami 0,01 M AgNO₃; powstanie osadu świadczy o obecności jonów chlorkowych.

Materiały i odczynniki

- surowica krwi bydlęcej lub wieprzowej
- 20% NaCl
- 20% glukoza
- 0,01 M AgNO₃
- odczynniki jak do doświadczeń: 3.9.5; 3.10.2; 5.1.6.1

3.9.8. Filtracja żelowa związków różniących się masą cząsteczkową

Zasada metody

Filtracja żelowa (sączenie molekularne) jest metodą rozdzielania substancji na podstawie różnic w wielkości cząsteczek. Rozdział następuje podczas przepływu mieszaniny białek lub soli przez kolumny wypełnione porowatymi ziarnami napęczniałego wielocukru o nazwie Sephadex. Sephadex jest chemicznie zmodyfikowanym dekstranem. Dzięki zawartości polarnych grup –OH Sephadex łatwo wiąże wodę, tworząc żele, i tak np. określenie Sephadex G-25 oznacza, że 1 g złoża wiąże 2,5 g wody, a Sephadex G-200 – 20 g wody. Im większą ilość wody wchłania złoże, tym większe są pory w siatce przestrzennej żelu, a więc większe cząsteczki mogą penetrować jego wnętrze. Oprócz złożów dekstranowych (Sephadex) w filtracji żelowej stosuje się m.in. złoża poliakryloamidowe (Bio-Gel), złoża agarozowe (Sephacrose) oraz agarozowo-poliakryloamidowe (Sephacryl).

Na objętość całkowitą kolumny wypełnionej nośnikiem – V_t składają się tzw. objętość pusta – V_0 , czyli objętość rozpuszczalnika wypełniającego przestrzenie między ziarnami żelu, objętość rozpuszczalnika związanego z żelem – V_i oraz objętość samego żelu – V_g .

$$V_t = V_0 + V_i + V_g$$

Podobnie jak w chromatografii podziałowej, również w metodzie sączenia molekularnego mamy do czynienia z dwoma fazami: fazą ruchomą, którą stanowi rozpuszczalnik znajdujący się pomiędzy ziarnami żelu oraz fazą stacjonarną, którą jest rozpuszczalnik związany z matrycą żelu. Jeżeli współczynnik podziału pomiędzy te dwie fazy oznaczmy K_D , to objętość rozpuszczalnika konieczną do wyluowania danej substancji z kolumny, czyli objętość elucyjną – V_e , (ściślej objętość, przy której dana substancja pojawi się w eluacie w największym stężeniu), można wyliczyć ze wzoru:

$$V_e = V_0 + K_D \times V_i$$

Dla substancji nie dyfundujących do wnętrza żelu, a więc nieobecnych w fazie stacjonarnej wartość współczynnika podziału $K_D = 0$, a objętość elucyjna $V_e = V_0$.

Dla substancji drobnocząsteczkowych, które swobodnie dyfundują do wnętrza żelu, wartość współczynnika $K_D = 1$, a objętość elucyjna $V_e = V_0 + V_i$.

Oprócz przypadków, kiedy dany związek jest całkowicie rozpuszczony w fazie stacjonarnej lub w fazie ruchomej, mogą występować związki o masach pośrednich, a ich współczynniki podziału będą przybierały wartości w przedziale 0–1.

Do odsalania białek stosuje się najczęściej złoża bardzo usieciowane np. Sephadex G-15 lub G-25. W czasie chromatografii białko wędruje w przestrzeniach pomiędzy ziarnami i wypływa z kolumny wcześniej od soli, która wnika w pory żelu. W przypadku rozdzielania mieszaniny hemoglobiny i drobnocząsteczkowej czerni amidowej, hemoglobina pojawi się w wycieku z kolumny wcześniej niż czern amidowa.

WERSJA A – Rozdział hemoglobiny i czerni amidowej

Przygotowanie złoża

1. 15 g suchego żelu Sephadex G-25 zalać 200 ml wody i pozostawić do napęcznienia na kilkanaście godzin. Proces pęcznienia można przyspieszyć ogrzewając zawiesinę we wrzącej łaźni wodnej przez 3 godz.
2. Napęczniały Sephadex dokładnie zdekantować, a następnie zmieszać z równą objętością wody.
3. Zawiesinę wlać jednym ruchem do kolumny napełnionej do 1/5 objętości wodą. W czasie upakowywania kolumny zacisk powinien być otwarty. Żel po osadzeniu się powinien być jednorodny, a nad jego powierzchnią stale powinna być warstwa płynu.
4. Kolumnę przemyć kilkoma objętościami buforu, w którym prowadzi się chromatografię.

Postępowanie

1. Kolumnę o wymiarach 300 × 10 mm, wypełnioną żelem Sephadex G-25, zrównoważyć 0,025 M buforem Tris-HCl o pH 8,5.
2. Obniżyć poziom płynu nad powierzchnią żelu do 1–2 mm i nanieść 0,1–0,2 ml mieszaniny hemoglobiny i czerni amidowej. W buforze o pH 8,5 obie cząsteczki naładowane są ujemnie i nie oddziałują ze sobą.

- Po wnikięciu próbki do żelu nanieść kilka małych porcji buforu w celu spłukania resztek próbki i podłączyć bufor ze zbiornika.
- Eluować z szybkością 0,5 ml/min, zbierając frakcje o objętości 4 ml.
- Zmierzyć absorbancje frakcji zawierających hemoglobinę przy 540 nm, a czerni amidowej przy 620 nm.
- Sporządzić wykres zależności absorbancji od objętości elucyjnej.
- Obliczyć współczynnik podziału K_D dla czerni amidowej.
- Po usunięciu żelu z kolumny zmierzyć objętość całkowitą V_t za pomocą wody, zaznaczając uprzednio poziom powierzchni żelu.

WERSJA B – Rozdział dekstranu blue i dichromianu potasu

Postępowanie

- Kolumnę o wymiarach 300 × 10 mm, wypełnioną żelem Sephadex G-25, zrównoważyć wodą.
- Obniżyć poziom wody nad powierzchnią żelu do 1–2 mm i nanieść 0,1–0,3 ml mieszaniny dichromianu potasu i dekstranu blue.
- Po wnikięciu próbki do żelu nanieść kilka małych porcji wody w celu spłukania resztek próbki i podłączyć wodę ze zbiornika.
- Prowadzić elucję z szybkością 0,5 ml/min.
- Zaobserwować rozdział i kolejność wypływu z kolumny związków obecnych w mieszaninie.

Materiały i odczynniki

- Sephadex G-25 medium
- 0,025 M bufor Tris-HCl, pH 8,5
- mieszanina hemoglobiny i czerni amidowej (1 mg hemoglobiny i 0,5 mg czerni amidowej rozpuścić w 1 ml 0,025 M Tris-HCl, pH 8,5)
- mieszanina dichromianu potasu i dekstranu blue (2 mg dichromianu potasu i 2 mg dekstranu blue rozpuścić w 1 ml wody)

3.10. METODY OZNACZANIA STĘŻENIA BIAŁKA

Znanych jest bardzo wiele metod ilościowego oznaczania białek, różniących się czułością i wykorzystujących takie właściwości tej grupy związków jak: zawartość azotu, zdolność do absorpcji światła w zakresie UV, tworzenie chemicznych pochodnych oraz wiązanie barwników. Spektrofotometryczne i kolorymetryczne oznaczanie stężenia białek opiera się na prawie Lamberta-Beera, zgodnie z którym absorbancja światła monochromatycznego przez roztwór danego związku jest wprost proporcjonalna do jego stężenia i grubości warstwy roztworu:

$$A = k \cdot c \cdot l,$$

gdzie: A – absorbancja, k – współczynnik absorpcji, c – stężenie, l – grubość warstwy.

Współczynnik absorpcji ma charakterystyczną stałą wartość dla każdej substancji przy stałej długości fali światła. Miano oraz wartość tego współczynnika zależą od jednostek, w jakich wyrażone jest stężenie. Najczęściej posługujemy się współczynnikiem molowym (ϵ) i właściwym (a) absorpcji.

Molowy współczynnik absorpcji (ϵ) jest liczbowo równy absorbancji roztworu o stężeniu 1 mol/l i grubości warstwy 1 cm. Natomiast **współczynnik właściwy (a)** liczbowo równa się absorbancji roztworu o stężeniu 1g/l i grubości warstwy 1 cm.

Znając molowy współczynnik absorpcji (ϵ) i masę molową związku (M), możemy obliczyć współczynnik właściwy absorpcji (a):

$$a = \frac{\epsilon}{M}$$

3.10.1 Metody spektrofotometryczne

Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. (1995) *Protein Sci.* **4**, 2411–2423.

Whitaker J.R., Granum P.E. (1980) *Anal. Biochem.* **109**, 156–159.

Wolf P. (1983) *Anal. Biochem.* **129**, 145–155.

Pomiar absorbancji w ultrafiolecie jest prostą, szybką i nieniszczącą białek metodą określania ich stężenia. Obecność w białkach aminokwasów aromatycznych (głównie tryptofanu i tyrozyny, w znacznie mniejszym stopniu fenyloalaniny) oraz cystyny (wiązanie disiarczkowe) jest przyczyną absorbowania przez nie światła w tzw. bliskim zakresie ultrafioletu (280 nm).

Dla każdego czystego białka można eksperymentalnie wyznaczyć indywidualny współczynnik absorpcji, który może służyć do określenia stężenia danego białka w roztworze. W praktyce laboratoryjnej często stosuje się **wagowy współczynnik absorpcji**, będący odwrotnością właściwego współczynnika absorpcji (a_{280}). Absorbancja roztworu danego białka w 280 nm pomnożona przez współczynnik wagowy daje stężenie białka w mg/ml, np. dla albuminy bydlęcej wartość a_{280} wynosi 0,667 l/g·cm, zatem wagowy współczynnik wynosi 1,5.

Molowy współczynnik absorpcji (ϵ), można również obliczyć (z dużym przybliżeniem do wyznaczonego eksperymentalnie) ze składu aminokwasowego danego białka wg wzoru zamieszczonego poniżej.

$$\epsilon_{280} [M^{-1}cm^{-1}] = n(Trp) \cdot 5500 + n(Tyr) \cdot 1490 + n(Cys-Cys) \cdot 125,$$

gdzie: n – ilość reszt odpowiednich aminokwasów

We wzorze nie uwzględniono ilości reszt fenyloalaniny, ponieważ jej wpływ na wartość tego współczynnika jest znikomy (Tab. 2.3).

Wartość współczynnika właściwego można wyliczyć dzieląc prawą stronę równania przez masę molową:

$$a_{280} = \frac{n(Trp) \cdot 5500 + n(Tyr) \cdot 1490 + n(Cys-Cys) \cdot 125}{M}$$

W mieszaninie różnych białek ich przybliżone stężenie c może być wyliczone na podstawie pomiaru absorbancji roztworów przy wskazanych długościach fali ze wzorów podanych poniżej.

$$c \text{ białka [mg/ml]} = (A_{235} - A_{280}) / 2,51$$

$$c \text{ białka [\mu g/ml]} = (A_{215} - A_{225}) \times 144$$

Powyższe wzory nie mają zastosowania do białek barwnych, bowiem występujące w nich chromofory zwykle intensywnie absorbują światło w szerokim zakresie UV, uniemożliwiając pomiar pochłaniania przez składowe łańcucha polipeptydowego.

3.10.1.1 Molowy i właściwy współczynnik absorpcji albuminy surowicy bydlęcej

Albumina z surowicy krwi bydlęcej (BSA, ang. *Bovine Serum Albumin*) jest białkiem o masie molowej 66 400 Da, zawierającym 20 reszt tyrozyny, 2 reszty tryptofanu i 35 reszt cysteiny (17 wiązań disiarczkowych). Wyznaczony eksperymentalnie właściwy współczynnik absorpcji (a_{280}) tego białka wynosi 0,667 l/g·cm.

Postępowanie

1. W oparciu o podane powyżej informacje na temat składu aminokwasowego i masy molowej BSA, obliczyć teoretyczne wartości:
 - a) molowego współczynnika absorpcji (ϵ_{280}),
 - b) właściwego współczynnika absorpcji (a_{280}).
2. Znając wartość wyznaczonego eksperymentalnie właściwego współczynnika absorpcji dla BSA, obliczyć molowy współczynnik absorpcji (ϵ_{280}) dla tego białka.
3. Wyjaśnić ewentualne rozbieżności pomiędzy wartościami odpowiednich współczynników wyznaczonych eksperymentalnie i na podstawie obliczeń teoretycznych.

3.10.1.2 Wyznaczanie stężenia albuminy surowicy bydlęcej metodą spektrofotometryczną

Zasada metody

Znajomość współczynników absorpcji umożliwia łatwe obliczenie stężenia roztworu czystego białka na podstawie pomiaru jego absorbancji przy 280 nm. Właściwy współczynnik absorpcji (a_{280}) dla BSA wynosi 0,667 l/g·cm.

Postępowanie

1. Zmierzyć absorbancję roztworu BSA o nieznanym stężeniu względem 0,9% NaCl. Jeśli absorbancja roztworu jest zbyt wysoka ($A_{280} > 1$), roztwór rozcieńczyć 0,9% roztworem NaCl.
2. Podać stężenie roztworu BSA wyrażone w mg/ml, w postaci stężenia procentowego oraz molowego.

Materiały i odczynniki

- roztwór albuminy bydlęcej w 0,9% roztworze NaCl
- 0,9% roztwór NaCl

3.10.2 Odczyn barwny wiązania peptydowego – reakcja biuretowa

Zasada metody

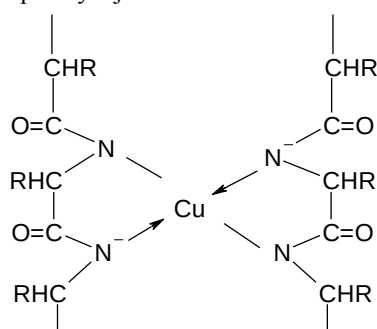
Atomy azotu wiązań peptydowych ($-\text{NH}-\text{CO}-$) w środowisku zasadowym oddziałują z jonami Cu^{2+} , tworząc barwny, niebiesko-fioletowy kompleks (Rys. 3.7). Warunkiem pozytywnego odczynu jest obecność co najmniej dwóch grup $-\text{NH}-\text{CO}-$.

W czasie reakcji biuretowej dodatkowo zachodzi redukcja jonów Cu^{2+} do Cu^+ przez wiązania peptydowe, reszty tyrozyny, tryptofanu, cystyny i cysteiny w stopniu proporcjonalnym do stężenia białka. Zjawisko to znalazło zastosowanie w opracowaniu bardziej czułych metod oznaczania białka (metoda Lowry'ego (rozdział 3.10.4) i metoda Smitha (0)).

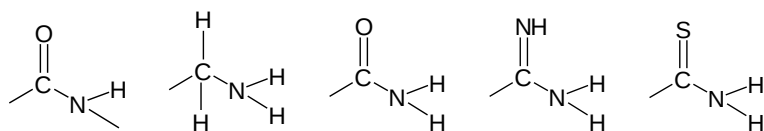
Poza wiązaniami peptydowymi dodatni odczyn biuretowy mogą dawać związki zawierające inne grupy chemiczne (Rys. 3.8). Najprostszymi związkami dającymi dodatni odczyn biuretowy są: oksamid, biuret (dwumocznik) i trójpeptyd (Rys. 3.9).

Reakcja biuretowa jest podstawą ilościowego oznaczania białek w metodzie biuretowej i mikrobiuretowej.

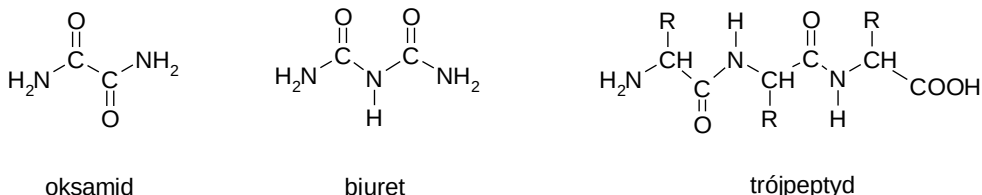
Oznaczanie białka tą metodą może utrudniać siarczan (VI) magnezu, ponieważ w środowisku zasadowym powstaje nierozpuszczalny wodorotlenek magnezu, maskujący zabarwienie prób, jak również sole amonowe, gdyż tworzą one barwne kompleksy z jonami miedzi.



Rys. 3.7 Kompleks miedzi z wiązaniami peptydowymi w białkach



Rys. 3.8 Grupy chemiczne reagujące z odczynnikiem biuretowym



Rys. 3.9 Najprostsze związki kompleksujące jony Cu^{2+} w odczynie biuretowym

Postępowanie

1. W probówce umieścić nieco mocznika, stopić go nad małym płomieniem i pozostawić do skrzepnięcia.
2. Otrzymany dimocznik rozpuścić w 1 ml 2 M NaOH i dodać kroplami 0,1% roztwór CuSO_4 . Powstaje barwa różowa.
3. Wykonać test na roztworach albuminy, kazeiny i żelatyny, dodając do 1 ml roztworu białka 1 ml 2 M NaOH i kroplami 0,1% roztwór CuSO_4 – w ciągu kilku minut w temp. pokojowej nastąpi zmiana barwy roztworu.

Materiały i odczynniki

- mocznik w substancji
- 0,5% roztwory albuminy jaja, kazeiny i żelatyny
- 2 M NaOH
- 0,1% CuSO_4

3.10.3 Metoda biuretowa oznaczania ilości białka

Gornal A.G., Bardawill C.S., Dawid M.M. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751–766.

Zasada metody została przedstawiona w rozdziale 0.

Zakres metody: 1–10 mg białka

Wykonanie krzywej kalibracyjnej

1. Z roztworu standardowego przygotować próby o objętości 1 ml (roztwór rozcieńczać 0,9% NaCl), zawierające 1–10 mg białka. Jako próbę odczynnikową przygotować 1 ml 0,9% NaCl.
2. Dodać 4 ml odczynnika miedziowego. Wymieszać i pozostawić na 30 minut w temp. pokojowej.
3. Odczytać absorbancję przy 540 lub 650 nm wobec próby odczynnikowej.
4. Wykreślić zależność absorbancji od ilości białka w próbce.

Postępowanie

1. Do próby zawierającej 1–10 mg białka w objętości 1 ml dodać 4 ml odczynnika miedziowego.
2. Wymieszać i pozostawić na 30 minut w temp. pokojowej.
3. Odczytać absorbancję przy 540 lub 650 nm wobec próby odczynnikowej, zawierającej 1 ml 0,9% NaCl zamiast roztworu białka.
4. Posługując się krzywą standardową wyliczyć stężenie białka w próbce.

Materiały i odczynniki

- odczynnik miedziowy: w 500 ml wody rozpuścić 1,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ i 6 g winianu sodowo-potasowego – $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$; wolno, ciągle mieszając, dodać 300 ml 10% NaOH wolnego od węglanów i 2 g KJ; uzupełnić do litra wodą destylowaną (jodek potasowy chroni jony miedzi przed autoredukacją)
- standardowy roztwór białek: 1% roztwór białek surowicy w 30% moczniku lub 1% roztwór BSA w 0,9% NaCl
- 0,9% NaCl

3.10.3.1 Mikrobiuretowa metoda oznaczania ilości białka

Goa J. (1953) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5, 218–222.

Zasada metody została przedstawiona w rozdziale 0.

Zakres metody: 0,1–1 mg białka

Wykonanie krzywej kalibracyjnej

1. Do probówek odmierzyć kolejno 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i 1,0 ml standardu. Każdą próbę uzupełnić do 2 ml 3% NaOH, a następnie dodać 0,1 ml odczynnika Benedicta.
2. Próby dokładnie wymieszać i po 15 minutach odczytać absorbancję przy $\lambda = 330 \text{ nm}$ wobec próby ślepej zawierającej 2 ml 3% NaOH i 0,1 ml odczynnika Benedicta.
3. Wykreślić zależność A_{330} od ilości białka w próbce.

Postępowanie

1. Próbę zawierającą 0,1–1 mg białka uzupełnić do 2 ml 3% NaOH i dodać 0,1 ml odczynnika Benedicta.
2. Zmieszać i po 15 minutach odczytać absorbancję przy długości fali 330 nm. Z krzywej kalibracyjnej odczytać ilość białka w próbce.

Materiały i odczynniki

- odczynnik Benedicta: 100 g bezwodnego węglanu sodu rozpuścić w 600 ml gorącej wody; dodać 200 g cytrynianu sodu ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) i 125 g tiocyjanianu potasu (rodanku potasu); ogrzewać do rozpuszczenia; przesączyć, jeżeli potrzeba, oziębic i wlać do litrowej kolby miarowej; dodać stopniowo, małymi porcjami ciągle mieszając, roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) (dokładnie 18,0 g w 100 ml), następnie 5 ml 5% heksacyjanożelazian (II) potasu; dopełnić wodą do litra
- 3% NaOH bez węglanów: sporządzić z oleju NaOH (olej wodorotlenku sodu wykonuje się następująco: w parownicy porcelanowej rozpuścić w 100 ml wody 110 g NaOH;
Uwaga! Mieszanina silnie nagrzewa się; po rozpuszczeniu wlać do butelki i szczelnie zamknąć korkiem gumowym; po paru dniach osadzają się na dnie węglany nierozpuszczalne w stężonym ługu; płyn nad osadu jest ok. 50% roztworem NaOH (ok. 12,5 N) wolnym od węglanów; 3% roztwór NaOH należy przygotowywać na świeżo, gdyż dłuższe przechowywanie powoduje gromadzenie się węglanów
- 0,1% roztwór albuminy surowicy bydlęcej w 3% NaOH jako standard: stężenie albuminy można oznaczyć spektrofotometrycznie, wykorzystując właściwy współczynnik absorbancji – $a_{280} = 0,667$;
Uwaga! Albuminę do pomiaru spektrofotometrycznego należy rozpuścić w 0,9% NaCl lub wodzie, a następnie do właściwego stężenia rozcieńczyć roztworem NaOH.

3.10.4 Kolorymetryczne oznaczanie białka metodą Lowry'ego

Lowry J.O., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J (1951) J. Biol. Chem. 193, 265–275.

Zasada metody

W metodzie tej wykorzystuje się czułą reakcję, jaką wykazują wiązania peptydowe oraz aminokwasy aromatyczne z odczynnikiem Folina-Ciocalteu. Reakcja przebiega w dwóch etapach:

1. jony miedzi przyłączają się do wiązań peptydowych, co w konsekwencji prowadzi do reakcji biuretowej,
2. kwas fosfowolframowy i fosfomolibdenowy ulegają redukcji do odpowiednich tlenków przez skompleksowaną miedź oraz reszty tyrozyny i tryptofanu.

Fenole a także puryny, pirymidyny oraz kwas moczowy reagują z odczynnikami Folina-Ciocalteu, zwiększając natężenie barwy. Siarczan (VI) cynku oraz siarczan (VI) amonu, kwas trichlorooctowy (TCA), HClO_4 , $\text{Ba}(\text{OH})_2$, aceton, etanol i eter obniżają intensywność barwy.

Redukcja kwasu fosfomolibdenowego do tlenków zachodzi szybko w pH około 10. Przy tej wartości pH kwas fosfomolibdenowy jest nietrwały. Aby zapobiec jego rozkładowi po dodaniu odczynnika Folina badaną próbę należy natychmiast zmieszać.

Zakres metody: 10–100 μg białka

Postępowanie

1. Do próbki odmierzyć 200 μl roztworu zawierającego 10–100 μg białka i dodać 2 ml odczynnika **D**. Zmieszać, pozostawić na 30 minut w temp. pokojowej.
2. Następnie szybko dodać 200 μl 1 N odczynnika Folina-Ciocalteu i zamieszać.
3. Po 30 minutach odczytać absorbancję przy długości fali 750 nm wobec próby ślepej odczynnikowej.

Materiały i odczynniki

- odczynnik **A**: 2% Na_2CO_3 w 0,1 M NaOH
- odczynnik **B**: 0,5% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
- odczynnik **C**: 1% winian sodu
- odczynnik **D**: przed użyciem mieszać ze sobą 0,5 ml odczynnika **B** z 0,5 ml odczynnika **C**, do tej mieszaniny dodać 49 ml odczynnika **A** (należy to zrobić około 30 minut przed oznaczeniem)
- odczynnik Folina-Ciocalteu: w okrągłodennej kolbie ze szlifem umieścić 25 g wolframianu sodowego ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), 6,25 g molibdenianu sodowego ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), 12,5 ml 85% kwasu fosforowego, 25 ml stężonego kwasu solnego i 175 ml H_2O ; kolbę umieścić pod chłodnicę zwrotną i gotować 10 godz.; następnie dodać 37,5 g siarczanu (VI) litu, 15 ml wody i kroplę bromu; oziębić i uzupełnić wodą do 250 ml i przesączyć; odczynnik nie powinien mieć barwy zielonej; przechowywać w ciemnej butelce i chronić przed zanieczyszczeniem związkami organicznymi; odczynnik zanieczyszczony po rozcieńczeniu i zalkalizowaniu staje się niebieski; do użytku rozcieńczyć wodą dwukrotnie, tak aby w odniesieniu do kwasu był roztworem 1 N (sprawdzić przez miareczkowanie 1 M NaOH wobec fenoloftaleiny)
- standardowy roztwór białka: 1% roztwór białek surowicy lub słabo zasadowy roztwór krystalicznej albuminy bydlęcej; roztwór standardowy rozcieńczyć 0,9% roztworem NaCl tak, aby zawierał wymaganą ilość białka w próbie

3.10.5 Kolorymetryczne oznaczanie białka metodą Bradforda

Bradford M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248–250.

Zasada metody

Błękit brylantynowy (Coomassie Brilliant Blue G-250) wiąże się z białkami za pomocą wiązań jonowych i hydrofobowych, reagując głównie z resztami Arg oraz w mniejszym stopniu z resztami His, Lys, Tyr, Trp i Phe. Barwnik ten w środowisku kwasowym ma zabarwienie brunatne, natomiast jego kompleks z białkiem – niebieskie (następuje przesunięcie maksimum absorpcji z 465 nm do 595 nm). Natężenie barwy jest proporcjonalne do stężenia białka w roztworze.

Zakres metody: 1–10 μg

Wykonanie krzywej kalibracyjnej

1. Przygotować roztwór standardowy BSA o stężeniu 0,05 mg/ml: oznaczyć spektrofotometrycznie stężenie otrzymanego wyjściowego roztworu BSA (właściwy współczynnik absorpcji dla BSA wynosi $a_{280} = 0,667$). Wyjściowy roztwór BSA rozcieńczyć 0,9% NaCl do uzyskaniażądanego stężenia.
2. Do wyznaczenia krzywej standardowej przygotować próby zawierające: 1, 2, 4, 6, 8 i 10 μg BSA w objętości 0,5 ml. Standardowy roztwór białka rozcieńczać 0,9% NaCl.

Postępowanie

1. Do prób zawierających 1–10 μg białka w objętości 0,5 ml dodać 0,5 ml odczynnika Bradforda.
2. Próby wymieszać i inkubować 5 minut w temp. pokojowej.
3. Odczytać absorbancję prób badanych i próby ślepej wobec wody przy $\lambda = 595 \text{ nm}$.
4. Od wartości absorbancji prób badanych odjąć wartość absorbancji próby ślepej.

Materiały i odczynniki

- odczynnik Bradforda: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 rozpuścić w 50 ml 95% etanolu, dodać 100 ml 85% kwasu fosforowego i następnego dnia, po całkowitym rozpuszczeniu barwnika, uzupełnić do 1 litra zimną wodą
- standardowy roztwór białka: BSA o stężeniu 0,05 mg/ml

3.10.6 Metoda Smitha z wykorzystaniem kwasu bicinchoninowego (BCA)

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985) Anal. Biochem. 150, 76–85.

Zasada metody

Metoda ta jest analogiczna do metody Lowry'ego. Zasadniczą różnicą jest zastąpienie odczynnika Folina-Ciocalteu przez kwas bicinchoninowy (BCA). W warunkach zasadowych białka redukują Cu^{2+} do Cu^+ w stopniu proporcjonalnym do stężenia. BCA jest wysoko specyficznym chromogennym reagentem w stosunku do jonów Cu^+ , tworząc z nimi fioletowy kompleks o maksimum absorbancji przy 562 nm. Wartość tej absorbancji jest wprost proporcjonalna do stężenia białka.

Zakres metody

Czułość metody zależna jest od temperatury i czasu inkubacji i wynosi 2–20 μg lub 10–50 μg .

Postępowanie

Zakres metody: 2–20 μg

1. Do sporządzenia krzywej standardowej przygotować próby zawierające 2–20 μg białka w objętości 50 μl . W takiej samej objętości przygotować próby badane.
2. Do probówek dodać 1 ml odczynnika **A + B** i zamieszać.
3. Próby inkubować 30 minut w temp. 60°C.
4. Schłodzić próby do temp. pokojowej i odczytać ich absorbancję przy 562 nm.
5. Wykreślić krzywą standardową i odczytać z niej stężenie białka w badanych próbach.

Zakres metody 10–50 μg

1. Do sporządzenia krzywej standardowej przygotować próby zawierające 10–50 μg białka w objętości 50 μl . W takiej samej objętości przygotować próby badane.
2. Do probówek dodać 1 ml odczynnika **A + B** i zamieszać.
3. Próby inkubować 30 minut w temp. 37°C.
4. Schłodzić próby do temp. pokojowej i odczytać ich absorbancję przy 562 nm.
5. Wykreślić krzywą standardową i odczytać z niej stężenia białka w badanych próbach.

Uwagi

Metoda BCA jest bardziej dogodna od metody Lowry'ego, gdyż BCA jest stosunkowo stabilny w warunkach zasadowych, co pozwala na połączenie go z odczynnikiem miedziowym i w konsekwencji uzyskanie prostej jednostopniowej procedury.

Temperatura i czas inkubacji mogą być zmieniane w zależności od potrzeb. Inkubacja w temp. 60°C daje wyższą czułość metody. Prawdopodobnie jest to efekt większej reaktywności wiązań peptydowych z odczynnikiem miedziowym w wyższych temperaturach.

Oznaczenia metodą BCA można przeprowadzić w obecności 1% detergentów używanych do solubilizacji białek (Triton X-100, SDS, Brij 35, Lubrol, CHAPS, CHAPSO, oktyloglukozyd), jak i czynników denaturujących (4 M chlorowodorek guanidyny, 3 M mocznik). W oznaczeniu przeszkadza obecność cukrów redukujących, czynników chelatujących (np. EDTA), buforów zmieniających pH odczynników.

Materiały i odczynniki

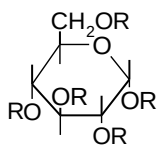
- odczynnik **A** (roztwór BCA): 1 g soli sodowej BCA, 2 g Na_2CO_3 , 0,16 g winianu sodu, 0,4 g NaOH i 0,95 g NaHCO_3 rozpuścić i uzupełnić wodą bidestylowaną do 100 ml; doprowadzić do pH 11,25 za pomocą 10 M NaOH; odczynnik **A** jest stabilny w temp. pokojowej
- odczynnik **B**: 4% (w/v) roztwór $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$: naważkę 2 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w wodzie bidestylowanej i doprowadzić do objętości 50 ml; odczynnik **B** jest stabilny w temp. pokojowej
- odczynnik **A + B**: przed użyciem należy je zmieszać w proporcji objętościowej **A** : **B** = 50:1 (np. 10 ml **A** + 0,20 ml **B**); roztwór **A + B** jest stabilny przez ok. tydzień (powinien mieć zielony kolor)
- standardowy roztwór białka (BSA) o stężeniu 1 mg/ml i 0,2 mg/ml

3.10.7 Mikrometoda taninowa

Mejbaum-Katzenellenbogen W. (1955) Acta Biochim. Polon. 2, 279–294.

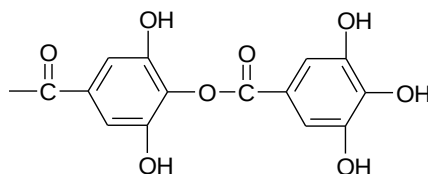
Zasada metody

Kwas taninowy (pentadigalloiloglukoza, tanina chińska) (Rys. 3.10) reaguje z białkami i polipeptydami, tworząc wiązania wodorowe pomiędzy grupami karbonyłowymi $-\text{CO}$ wiązań peptydowych a grupami hydroksylowymi reszt kwasu gallusowego w wyniku czego powstają nierozpuszczalne w wodzie kompleksy. Białka w zakresie stężeń 10–100 $\mu\text{g/ml}$ dają delikatną zawiesinę, której zmętnienie w środowisku silnie kwaśnym w obecności fenolu po 10 minutach inkubacji w 30°C jest proporcjonalne do stężenia białka. Mała swoistość taniny wobec białek sprawia, że równoprocetowe roztwory różnych białek dają jednakowe zmętnienie.



tanina chińska

α -D-pentadigalloiloglukoza



R - reszta kwasu gallusowego

Rys. 3.10 Wzór taniny

Postępowanie

Zakres metody 10–100 µg

1. Do probówki odmierzyć 1 ml roztworu zawierającego 10–100 µg białka i wstawić do łaźni wodnej o temp. 30°C.
2. Po wyrównaniu temperatur do roztworu dodać, mieszając, 1 ml klarownego i ogrzanego do tej samej temperatury odczynnika taninowego.
3. Dokładnie po 10 minutach dodać 2 ml 0,1% roztworu gumy arabskiej, zmieszać, ochłodzić do temp. pokojowej i odczytać absorbancję względem próby odczynnikowej przy 630–670 nm.
4. Stężenie białka w próbce odczytać z krzywej wzorcowej wykonanej dla żelatyny lub innego białka.

Materiały i odczynniki

- odczynnik taninowy: do kolby stożkowej o pojemności 500 ml odmierzyć 98 ml 1 M HCl, ogrzać do 80°C i dodać 2 ml również ogrzanego fenolu (**trucizna, nie pipetować ustami!**); kolbę stożkową umieścić we wrzącej łaźni wodnej i po rozpuszczeniu się fenolu dodać 10 g taniny, zamieszać; po 15 minutach wyjąć z łaźni i pozostawić do wystygnięcia; uzupełnić wodą do 100 ml; przed użyciem przesączyć; odczynnik trwały kilka tygodni
- roztwór 0,1% gumy arabskiej: do zlewki o pojemności 200 ml wsypać 1 g sproszkowanej gumy arabskiej, dodać ok. 10 ml wody i pozostawić do napęcznienia; dolewając małymi porcjami wodę mieszać do całkowitego rozpuszczenia i uzupełnić do 100 ml; otrzymany 1% roztwór zabezpieczyć kryształkiem tymolu, a do użytku sporządzać 0,1% roztwór
- standardowy roztwór żelatyny: do 100 mg wysuszonej w eksykatorze próżniowym nad P₂O₅ żelatyny dodać ok. 5 ml wody; po napęcznieniu dodać 50 ml wody i ogrzać na łaźni wodnej do całkowitego rozpuszczenia; ostudzić i uzupełnić w kolbie miarowej do 100 ml; do sporządzenia krzywej standardowej roztwór białka standardowego rozcieńczyć tak, by w 1 ml znajdowało się 20, 40, 60, 80 i 100 µg białka.

3.11. ELEKTROFOREZA W ŻELU POLIAKRYLOAMIDOWYM

Elektroforeza jest powszechnie stosowaną metodą rozdzielania i analizy związków koloidalnych. Jej istotą jest ruch cząsteczek obdarzonych ładunkiem elektrycznym w kierunku elektrody o ładunku przeciwnym niż jej własny. Podstawą rozdzielania jest różnica w ruchliwości, z jaką jony poruszają się w polu elektrycznym.

Szybkość wędrówki (*v*) białka lub innej makrocząsteczki w polu elektrycznym zależy od natężenia pola elektrycznego (*E*), od wypadkowego ładunku cząsteczki białka (*z*) i współczynnika tarcia (*f*):

$$v = \frac{E \cdot z}{f}$$

Współczynnik tarcia (*f*) zależy od wielkości i kształtu cząsteczki migrującej oraz lepkości środowiska (*η*). Dla cząsteczki kulistej o promieniu *r*:

$$f = 6\pi\eta r$$

Ponadto szybkość wędrówki zależy od **siły jonowej elektrolitu, pH i temperatury**.

Metody elektroforetyczne okazały się szczególnie przydatne w biochemii do rozdzielania związków makrocząsteczkowych, a w szczególności białek. Ładunek elektryczny cząsteczki białkowej zależy od pH roztworu i jest związany z obecnością w łańcuchach bocznych niektórych reszt aminokwasowych grup zdolnych do jonizacji. W pH = pI wypadkowy ładunek elektryczny białka równy jest zero (białko nie wędruje w polu elektrycznym), w pH < pI wypadkowy ładunek jest dodatni (cząsteczki wędrują w kierunku katody), a w pH > pI – ujemny (cząsteczki wędrują w kierunku anody). Zatem znajomość punktu izoelektrycznego białek pozwala przewidzieć kierunek ich migracji podczas elektroforezy w danym pH.

Jako nośniki w elektroforezie stosuje się substancje o strukturze kapilarnej, porowatej lub żele. Może to być odpowiednio przygotowana bibuła (obecnie rzadko stosowana ze względu na małą zdolność rozdzielczą), folia acetylocelulozowa, żel skrobiowy, agarozowy lub żel poliakryloamidowy.

Nośnik powinien być przede wszystkim elektrycznie obojętny, niereaktywny chemicznie i porowaty, co zapewnia odpowiednio szybki przepływ elektrolitu i rozdzielanej substancji. Zastosowanie żelu w elektroforezie poprawia jakość rozdzału, ponieważ ten rodzaj nośnika pełni dodatkowo funkcję sita molekularnego, zwiększając rozdzielczość, oraz tłumi prądy konwekcyjne wytwarzane przez małe gradienty temperatury.

Najpowszechniej stosowana elektroforeza w żelu poliakryloamidowym jest techniką odznaczającą się doskonałą rozdzielczością, dzięki bardzo małej adsorpcji, niskiej elektroosmozie oraz dodatkowo efektowi „przesiewania molekularnego”. Rolę sita pełni sieć spolimeryzowanego akryloamidu, w której wielkość oczek zależy od rodzaju i sposobu przygotowania żelu.

Żel poliakryloamidowy uzyskuje się drogą polimeryzacji monomeru akryloamidu $\text{NH}_2\text{--CO--CH=CH}_2$ z sieciującym ko-monomerem – N,N,-metylenobisakryloamidem $\text{CH}_2(\text{NH--CO--CH=CH}_2)_2$. Reakcja polimeryzacji zapoczątkowana jest przez układ inicjator – katalizator, którymi najczęściej są: diamonu nadtlendiosiarczan (nadiarczan amon) i trzeciorzędowa amina – TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina). Usieciowanie żelu można regulować zmieniając stężenie bisakryloamidu (czynnik sieciujący) i akryloamidu, np. 7,5% żel poliakryloamidowy charakteryzuje się średnią wielkością por około 5 nm, 30% – około 2 nm. Elektroforezę białek można prowadzić w warunkach natywnych (z zachowaniem aktywności biologicznej rozdzielanych związków), gdzie rozdział zachodzi głównie ze względu na ładunek (rozdziel 0.) albo w warunkach denaturujących w obecności SDS i β -merkaptotoetanolu (albo ditiotretolu), gdzie rozdział cząsteczek białka opłaszczonych przez SDS, nadający białku ładunek ujemny, zachodzi ze względu na masę cząsteczkową rozdzielanych związków (rozdziel 0.). Metody elektroforetyczne wykorzystuje się zarówno do celów analitycznych (w tym oceny jednorodności preparatów) jak i preparatywnych.

3.11.1 Elektroforeza natywna

3.11.1.1 Rozdział białek surowicy krwi w elektroforezie według Davisa

Davis B. J. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. U.S.A. 121, 404–427.

Krew jest płynną tkanką zawierającą elementy morfotyczne (krwinki czerwone, krwinki białe i płytki krwi) zawieszone w części płynnej, zwanej osoczem lub plazmą.

W celu uzyskania surowicy pobraną krew pozostawia się w na kilkadziesiąt minut temp. pokojowej lub w 37°C. W wyniku szeregu reakcji enzymatycznych zachodzących przy udziale aktywatorów i jonów wapnia białko krwi – fibrynogen ulega przemianie w fibrynę. Fibryna polimeryzuje, tworząc trójwymiarową sieć, w której zamknięte są elementy morfotyczne i surowica. Po upływie kilkunastu minut żel fibrynowy kurczy się, a surowica jest wyciskana na zewnątrz. Należy ją oddzielić przez wirowanie.

Proces krzepnięcia można zahamować przez dodanie do krwi związków wiążących wapń (np. heparyna, cytrynian sodu). Po odwirowaniu elementów morfotycznych uzyskuje się osocze, które w odróżnieniu od surowicy zawiera fibrynogen.

Surowica krwi zawiera 6–8% białka. Są one mieszaniną kilkunastu białek różniących się budową oraz funkcją. Można wśród nich wyróżnić dwie grupy białek: albuminy i globuliny, które można łatwo oddzielić od siebie poprzez wysalanie, np. siarczanem (VI) amonu (rozdziel 3.9.6).

Albuminy stanowią około 60% białek zawartych w surowicy, posiadają masę 69 kDa i pI 4,8, są dobrze rozpuszczalne w wodzie i jako jedyne białka surowicy są pozbawione części cukrowej. Najważniejsze funkcje albumin to: utrzymanie stałej objętości krążącej krwi, transport niektórych substancji (metale, hormony, bilirubina, kwasy tłuszczowe) i detoksykacja. Albuminy stanowią rezerwę białkową organizmu i w przypadku głodu są jako pierwsze katabolizowane.

Prealbuminy pojawiające się w elektroforezie przed albuminami stanowią zaledwie 0,5% białek obecnych w surowicy, ich funkcją jest np. wiązanie tyroksyny.

Ceruloplazmina występuje w ilości 25 mg%, ma masę 130 kDa, jest zbudowana z 8 podjednostek, z których każda wiąże jon Cu^{2+} . Bierze udział w procesie wchłaniania miedzi. Obniżony poziom tego białka prowadzi do nadmiernego wchłaniania Cu^{2+} w jelicie i objawów zatrucia ze strony wątroby i układu nerwowego.

Transferyna występuje w ilości 100–300 mg%, posiada zdolność kompleksowania żelaza. Jest białkiem o masie 90 kDa zbudowanym z jednego łańcucha białkowego. Wiąże żelazo przez tyrozynę, zapobiega zatruciom wywołanym obecnością nadmiaru zjonizowanego żelaza w organizmie.

Haptoglobiny występujące w surowicy w stężeniu 30–300 mg% to białka zbudowane z dwóch rodzajów łańcuchów α i β , wiążące wolną hemoglobinę powstałą w wyniku wewnątrznaczyniowej hemolizy. Częsteczka haptoglobiny o masie 80 kDa wiąże 2 cząsteczki hemoglobiny. Utworzony kompleks nie jest wydzielany przez nerki, co zapobiega utracie żelaza wraz z moczem i uszkodzeniu kanalików nerkowych. We krwi noworodków nie ma haptoglobiny, pojawia się dopiero powyżej 4 miesiąca życia.

α_2 -makroglobulina występuje w ilości 150–450 mg%, posiada bardzo dużą masę – około 700 kDa i jest niespecyficznym inhibitorem wielu proteaz. Wykazuje specyficzny mechanizm hamowania aktywności proteaz, polegający na „złapaniu” enzymu w rodzaj pułapki utworzonej po uprzednim nacięciu inhibitora przez enzym. Kompleks proteaza–makroglobulina jest bardzo szybko usuwany z krwioobiegu.

Immunoglobuliny to glikoproteiny wytwarzane przez organizm w odpowiedzi na pojawienie się obcego białka – antygeny. Zbudowane są z dwóch rodzajów łańcuchów: lekkiego i ciężkiego o masach odpowiednio: 25 i 50 kDa. Ze względu na różnice w budowie łańcuchów ciężkich oraz zawartość cukrów wyróżnia się 5 rodzajów immunoglobulin: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. We frakcji IgG zawartych jest 80% przeciwciał.

Orozomukoid (α_1 -kwaśna glikoproteina) występuje w ilości 50–100 mg%, charakteryzuje się bardzo niskim pI (pH ok. 2,5), posiada podobną ruchliwość elektroforetyczną jak albuminy, zawiera około 40% cukru w cząsteczce. Jest to białko o masie 44 kDa, którego poziom obniża się lub podwyższa w pewnych jednostkach chorobowych.

α_1 -Antyproteaza jest inhibitorem wielu proteaz.

Surowica krwi jest niezwykle bogata w inhibitory proteaz, stanowią one około 10% obecnych w niej białek. W surowicy krwi występuje również szereg enzymów. Są to m.in. fosfatazy, transaminazy, dehydrogenazy. Enzymy te uwalniane są z różnych tkanek, a ich poziom zmienia się w stanach patologicznych, co ma często znaczenie diagnostyczne. Głównym celem tych badań jest ustalenie pochodzenia danego enzymu, ponieważ każdy narząd czy tkanka posiadają charakterystyczne spektrum enzymów. Niektóre enzymy wykazują znaczną specyficzność narządową np. aminotransferazy są charakterystyczne dla serca i wątroby, fosfatazy dla tkanki kostnej oraz wątroby.

Zasada metody

Głównym kryterium rozdziału białek surowicy w tej metodzie jest ich ładunek elektryczny, gdyż elektroforeza jest prowadzona w warunkach natywnych. Zaletą metody jest możliwość dalszej analizy aktywności biologicznej białek po zakończonym rozdziale elektroforetycznym.

Zasadę rozdziału białek w elektroforezie w żelu poliakryloamidowym szczegółowo omówiono w rozdziale 3.11.

Postępowanie

Uwaga! Wszystkie czynności wykonywać w rękawicach gumowych, ponieważ akryloamid jest rakotwórczy!

1. Przygotować (złożyć) zgodnie z instrukcją aparat do elektroforezy płytkowej.
2. Sporządzić 5% żel, mieszając 1 objętość buforu żelowego z 1 objętością roztworu akryloamidu i 2 objętościami diamonu nadtlendiosiarczanu (nadsiarcezanu amonu).
3. Wypełnić roztworem akryloamidu szczelinę pomiędzy płytkami w aparacie aż do górnej krawędzi płytki, umieścić grzebień i odstawić do chemicznej polimeryzacji na 40–60 minut.
4. Usunąć grzebień, wypełnić studzienki buforem elektrodowym i osadzić płytki w aparacie do elektroforezy.
5. Do studzienek w żelu nanieść próbkę surowicy krwi, uprzednio zmieszanej ze wskaźnikiem (błękitem bromofenolowym) i kroplą glicerolu. Ilość наносzonej surowicy zależy od sposobu barwienia płytki po zakończeniu elektroforezy.
6. Napełnić oba naczynia elektrodowe buforem i podłączyć do prądu w taki sposób, aby dolna część płytki była połączona z elektrodą dodatnią. Natężenie prądu powinno wynosić 20 mA/płytkę. Rozdział prowadzić w lodówce.

7. Elektroforezę należy zakończyć w momencie, kiedy wskaźnik znajdzie się w odległości kilku mm od końca płytki. Po zakończeniu elektroforezy żel przenieść do odpowiedniego roztworu celem wybarwienia (rozdział 3.11.3.).

Materiały i odczynniki

- bufor żelowy: Tris-HCl-TEMED, pH 8,9: 36,6 g Tris rozpuścić w 90 ml wody bidestylowanej, dodać 0,46 ml TEMED i zmiareczkować HCl do pH 8,9, po czym uzupełnić wodą do 100 ml
- bufor elektrodowy: Tris-glicyna, pH 8,4: 6 g Tris, 28,4 g glicyny rozpuścić w wodzie i uzupełnić do 1 000 ml; przed użyciem bufor rozcieńczyć 10 razy wodą schłodzoną w lodówce
- roztwór akryloamidu: 20 g akryloamidu i 0,53 g bisakryloamidu rozpuścić w 100 ml wody bidestylowanej; roztwór można przesączyć
- diamonu nadtlendiosiarczan (nadiarczan amonu): 0,1% roztwór wodny (sporządzać na świeżo – odczynnik nietrwały)
- 0,04% błękit bromofenolowy (indykator): 0,1 g barwnika rozpuścić w 250 ml wody zawierającej 1,49 ml 0,1 M NaOH

3.11.1.2 Rozdział białek w elektroforezie natywnej w układzie ciągłym

Zasada metody

Głównym kryterium rozdziału białek w elektroforezie natywnej jest ich ładunek. Zaletą metody jest możliwość analizy aktywności biologicznej białek po zakończonym rozdziale. W układzie ciągłym stosuje się tylko jeden żel (rozdzielający), a do przygotowania żelu i prób oraz przeprowadzenia elektroforezy* używane są bufony o identycznym pH. Ponieważ próby nanoszone na żel nie ulegają zagęszczeniu, korzystne jest nanoszenie próbek o niewielkiej objętości.

* w opisywanej metodzie pH buforu elektrodowego różni się o 0,5 jednostki od pH buforu żelowego i pH buforu do obciążania próbek. Różnica ta wynika z uzyskiwanego lepszego rozdziału preparatów roślinnych barwionych po zakończeniu elektroforezy w takich warunkach na aktywność fosfataz kwaśnych.

Postępowanie

1. Przygotować roztwór żelu o odpowiednim stężeniu akryloamidu wg poniższej tabeli:

	7,5%	10%	12%	15%
woda destylowana	5ml	4,2ml	3,5ml	2,5ml
bufor żelowy	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
30%akryloamid	2,5ml	3,3ml	4ml	5ml
APS	100μl	100μl	100μl	100μl
TEMED	10μl	10μl	10μl	10μl

2. Wlać żel pomiędzy płytki i umieścić grzebień.
3. Po spolimeryzowaniu żelu, wyjąć grzebień, płytki umieścić w aparacie.
4. Nalać bufor elektrodowy do naczynia dolnego i górnego.
5. Przygotować i nanieść próbki na żel:
Do każdej próby dodać ¼ jej objętości buforu do obciążenia próbek, dokładnie zamieszać i odwirować w wirówce stołowej. Do kolejnych studzienek nanosić po 20μl kolejnych prób.
6. Elektroforezę prowadzić przy stałym natężeniu 20-25mA/płytke. Rozdział zakończyć w momencie, gdy pasmo błękitu bromofenolowego osiągnie odległość ok. 0,5cm od dolnej krawędzi żelu.
7. Wybarwić żel według wybranej metody (rozdział 3.11.3.).

Materiały i odczynniki

- Bufor żelowy: 1,5M Tris-HCl, pH 8,8
- 30% akryloamid (akryloamid:bisakryloamid 29,2:0,8)
- 10% nadsiarczan amonu (APS)
- TEMED
- Bufor elektrodowy 25mM Tris, 192mM Gly (pH 8,3)
- bufor do obciążenia próbek 5×stężony (0,3M Tris-HCl, pH 8,8, 50% o/o glicerol, 0,5mg/ml błękit bromofenolowy)

3.11.2 Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Zasada metody

Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących – w obecności soli sodowej siarczany dodecylu – SDS ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$) jest rutynową metodą określania stopnia czystości białek oraz oznaczania ich masy cząsteczkowej i składu podjednostkowego. Ten anionowy detergent niszczy niemal wszystkie oddziaływania niekowalencyjne w natywnych białkach. Aniony SDS wiążą się z aminokwasami (jeden anion na dwie reszty aminokwasowe), nadając powstałemu kompleksowi SDS-zdenaturowane białko tak duży ładunek ujemny, że ładunek natywnego białka staje się nieistotny dla ruchliwości. Mieszaninę białek rozpuszcza się w roztworze SDS z dodatkiem czynnika redukującego mostki disiarczkowe (β -merkaptoetanol lub DTT) i pozostawia na pewien czas w podwyższonej temperaturze, a następnie poddaje elektroforezie. Szybkość wędrówki białek w polu elektrycznym w takich warunkach zależy tylko od ich masy cząsteczkowej. Zasada ta nie dotyczy białek o strukturze podjednostkowej, które wędrują jako monomery, a także wielu białek o bardzo małej masie cząsteczkowej (poniżej 10 kDa) i niektórych wędrujących nietypowo glikoprotein.

Istnieje szereg znanych techniki SDS-PAGE, z których dwie, glicynowa (rozdział 3.11.2.1.) i trycynowa (rozdział 3.11.2.2.) są najczęściej stosowane podczas rozdzielania białek o masach 1-500 kDa. Obie techniki różnią się systemem stosowanych buforów oraz stężeniem żeli poliakrylamidowych. Elektroforeza glicynowa jest metodą preferowaną w rozdzielaniu białek o masie powyżej 30 kDa, a elektroforeza trycynowa poniżej 30 kDa.

Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym z SDS jest metodą szybką, czułą i o bardzo dużej rozdzielczości. Obecność jednej frakcji białkowej po wybarwieniu żelu, najczęściej Coomassie Brilliant Blue R-250, świadczyć może o homogeniczności analizowanego preparatu białkowego.

3.11.2.1 Elektroforeza SDS-PAGE według Laemmli'go

Laemmli U.K. (1970) *Nature* (London) 227, 680–685.

Postępowanie

Uwaga! Wszystkie czynności wykonywać w rękawicach gumowych, ponieważ akryloamid jest rakotwórczy.

Przygotowanie aparatu i żelu

1. Płytki szklane umyć i następnie odtłuścić alkoholem.
2. Między płytki (z boku) włożyć ograniczniki i całość spiąć klamrami.
3. Dół oraz boki płytek uszczelnić gorącym roztworem 2% agaru w buforze elektrodowym bez SDS (jeżeli tego wymaga aparatura).
4. Po zastygnięciu agaru przygotować roztwór żelu o odpowiednim stężeniu akryloamidu według poniższej tabeli.

	żel rozdzielający			
	7,5%	10%	12%	15%
bufor żelowy dolny	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
akryloamid 30%	2 ml	2,7 ml	3,2 ml	4 ml
woda bidestylowana	4 ml	3,3 ml	2,8 ml	2 ml
nadsiarczan amonu	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

* podane w tabeli objętości roztworów dotyczą płytki o rozmiarach 100 × 80 × 1 mm

- Po zmieszaniu wszystkich składników (nadsiarczan amonu i TEMED dodawać na końcu), wlać żel pomiędzy płytki. Na powierzchnię żelu delikatnie nawarstwić wodę za pomocą pipety.
- Po spolimeryzowaniu żelu dolnego usunąć dokładnie wodę (osuszając brzegi płytek bibułą), umieścić grzebień pomiędzy płytkami, a następnie wlać roztwór żelu zagęszczającego aż do górnej krawędzi płytek. Żel zagęszczający sporządzić mieszając odpowiednie składniki według poniższej tabeli.

4,5% żel zagęszczający	
bufor żelowy górny	1,25 ml
akryloamid 30%	0,75 ml
woda bidestylowana	3,0 ml
nadsiarczan amonu	15 µl
TEMED	8 µl

* podane w tabeli objętości roztworów dotyczą płytki o rozmiarach 100 × 80 × 1 mm

- Po spolimeryzowaniu żelu górnego płytki umieścić w aparacie, wyjąć grzebień, powstałe studzienki wypełnić buforem, nalać bufor elektrodowy do naczynia dolnego i górnego.
- Przygotować próby:
Do każdej z prób dodać 1/3 objętości buforu do denaturacji (np. do 15 µl próby dodać 5 µl buforu). Próby denaturować 3 minuty we wrzącej łaźni wodnej i schłodzić.

9. Naniesienie próby na żel:

Do kolejnych studzienek nanosić standard białkowy o odpowiednich masach cząsteczkowych oraz zdenaturowane uprzednio próby badane w objętości nie przekraczającej 20 µl (20–50 µg białka; w przypadku surowych wyciągów z roślin należy nanieść około 100–150 µg białka) za pomocą pipety automatycznej z długą końcówką kapilarną.

10. Prowadzenie rozdzielania elektroforetycznego:

Aparat podłączyć do źródła prądu w taki sposób, aby dolna część płytki stanowiła biegun dodatni. Ustawić wartość zasilania na 20 mA do momentu wniknięcia materiału w żel, następnie elektroforezę prowadzić przy natężeniu prądu 40 mA. Elektroforezę prowadzić w temp. pokojowej do momentu, kiedy pasmo barwnika (błękitu bromofenolowego) osiągnie odległość około 1 cm od dolnej krawędzi żelu.

11. Po zakończeniu elektroforezy żel przenieść do kuwety i wybarwić jedną z wybranych technik (rozdział 3.11.3.).

12. Wyznaczyć masy cząsteczkowe białek na podstawie standardów mas (rozdział 3.11.4.)

Materiały i odczynniki

- bufor żelowy dolny – 0,4% SDS w 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8: 9,1 g Tris, 0,2 g SDS rozpuścić w niewielkiej ilości wody, a następnie doprowadzić HCl do pH 8,8, całość uzupełnić wodą do 50 ml
- bufor żelowy górny – 0,4% SDS w 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8: 3,0 g Tris, 0,2 g SDS rozpuścić w niewielkiej ilości wody, a następnie doprowadzić za pomocą HCl do pH 6,8, całość uzupełnić wodą do 50 ml
- 30% akryloamid: 29,2 g akryloamidu, 0,8 g bisakryloamidu uzupełnić wodą bidestylowaną do 100 ml, przesączyć przez bibułę Whatman 1

- bufor elektrodowy Tris-glicyna, pH 8,6: 7,2 g glicyny, 1,5 g Tris, 0,5 g SDS rozpuścić początkowo w około 50 ml wody bidestylowanej, doprowadzić pH za pomocą Tris, po czym uzupełnić wodą do 100 ml; **przed użyciem bufor rozcieńczyć 5-krotnie**
- bufor do denaturacji prób (4 × stężony): 2,5 ml buforu 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 1 g SDS, 2,5 ml β-merkaptotolanu, 5 ml glicerolu zmieszać; do całości dodać 4 mg błękitu bromofenolowego
- 10% diamonu nadtlendisarczan (nadsiarazan amonu) - sporządzić na świeżo
- TEMED

3.11.2.2 Elektroforeza SDS-PAGE według von Jagowa

Trycyna/ N-Tris(hydroksymetylo)metylo glicyna.

Schägger H., von Jagow G. (1987) Anal. Biochem. 166; 368-379

Schägger H. (2006) Nat. Protoc. 1(1), 16-22

Postępowanie

Uwaga! Wszystkie czynności wykonywać w rękawicach gumowych, ponieważ akryloamid jest rakotwórczy.

Przygotowanie aparatu i żelu

1. Płytki szklane umyć i następnie odtłuścić alkoholem.
2. Między płytki (z boku) włożyć ograniczniki i całość spiąć klamrami.
3. Przygotować roztwory żeli o odpowiednim stężeniu akryloamidu według poniższej tabeli.

	4% żel zagęszczający	10% żel rozdzielający	16% żel rozdzielający	16% żel rozdzielający/ 6 M mocznik
bufor D	1 ml	6 ml	10 ml	10 ml
bufor C	3 ml	10 ml	10 ml	10 ml
glicerol	-	3 ml	3 ml	-
mocznik	-	-	-	10,8 g
H ₂ O	8 ml	11 ml	7 ml	uzupełnić do 30 ml
10% APS	90 µl	150 µl	100 µl	100 µl
TEMED	9 µl	15 µl	10 µl	10 µl

* podane w tabeli objętości roztworów dotyczą dwóch żeli o rozmiarach 0,07 × 14 × 14 cm

4. Po zmieszaniu wszystkich składników (nadsiarazan amonu i TEMED dodawać na końcu), wlać żel pomiędzy płytki. Na powierzchnię żelu delikatnie nawarstwić wodę za pomocą pipety.
5. Po spolimeryzowaniu żelu dolnego (rozdzielającego) usunąć dokładnie wodę (osuszając brzegi płytek bibułą), umieścić grzebień pomiędzy płytkami, a następnie wlać roztwór żelu zagęszczającego aż do górnej krawędzi płytek.
6. Po spolimeryzowaniu żelu górnego (zagęszczającego) płytki umieścić w aparacie, wyjąć grzebień, powstałe studzienki wypełnić buforem, nalać bufor elektrodowy do naczynia dolnego i górnego.
7. Przygotować próbki:
Do każdej z prób dodać 1/3 objętości buforu do denaturacji (np. do 15 µl próby dodać 5 µl buforu). Próby denaturować 3 minuty we wrzącej łaźni wodnej i schłodzić.
8. Nanieść próby na żel:
Do kolejnych studzienek nanosić standard białkowy o odpowiednich masach cząsteczkowych oraz zdenaturowane uprzednio próby badane w objętości nie przekraczającej 20 µl (20–50 µg białka; w przypadku surowych wyciągów z roślin należy nanieść około 100–150 µg białka) za pomocą pipety automatycznej z długą końcówką kapilarną.

9. Poprowadzić rozdział elektroforetyczny:

Aparat podłączyć do źródła prądu w taki sposób, aby dolna część płytki stanowiła biegun dodatni. Ustawić wartość zasilania na 20 mA do momentu wnikięcia materiału w żel, następnie elektroforezę prowadzić przy natężeniu prądu 40 mA. Elektroforezę prowadzić w temp. pokojowej do momentu, kiedy pasmo barwnika (błękitu bromofenolowego) osiągnie odległość około 1 cm od dolnej krawędzi żelu.

Materiały i odczynniki

- bufor A (anodowy, 10 x stężony) – 1 M Tris-HCl, 0,225 M HCl; pH 8,9
- bufor B (katodowy, 10 x stężony) – 1 M Tris-HCl, 1 M Trycyna, 1% SDS; pH~8,25 (nie doprowadzać pH!)
- bufor C (żelowy, 3x stężony) – 3 M Tris-HCl, 1 M HCl, 0,3% SDS; pH 8,45
- bufor D - akryloamid (49,5%) /akryloamid-bisakryloamid (3%)
- bufor E do denaturacji prób (4 x stężony): 12% SDS, 6% β-merkaptoetanolu, 30% glicerol, 150mM Tris-HCl, 0,05% błękitu bromofenolowego
- 6 M mocznik
- 10% diamonu nadtlenodisiarczany (nadtlen diamonu) - sporządzić na świeżo
- TEMED

3.11.3 Metody barwienia białek po rozdziale elektroforetycznym

3.11.3.1 Barwienie na białko (proteinogram)

Postępowanie

1. Po przeprowadzeniu elektroforezy opisanej w rozdziale 3.11.1.1. żel, na który naniesiono 2–5 µl surowicy krwi umieścić w 0,05% roztworze czerni amidowej w 7% kwasie octowym i pozostawić na około 20 minut, następnie barwnik zlać i pozostawić do ponownego użycia.
2. Żel zalać 7% kwasem octowym i pozostawić w tym roztworze do odbarwienia tła. W celu przyspieszenia odbarwienia tła żelu należy często zmieniać roztwór kwasu.
3. Żel można również wybarwić na białko przy pomocy roztworu Coomassie Brilliant Blue zgodnie z przepisem podanym dla elektroforezy w warunkach denaturujących (rozdział 3.11.3.4., 3.11.3.5.).

Materiały i odczynniki

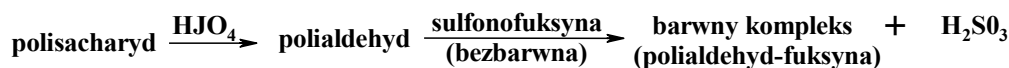
- 0,05% roztwór czerni amidowej w 7% kwasie octowym
- 7% kwas octowy

3.11.3.2 Barwienie na obecność glikoprotein (glikoproteinogram) – technika PAS

Zacharius R.M., Zell T.E., Morrison J.H., Woodlock J.J. (1969) Anal. Biochem. 30, 148–152.

Zasada metody

Barwienie glikoprotein techniką PAS (ang. *periodic acid-Schiff*, tj. kwas nadjodowy-zasada Schiffa) polega na tym, że kwas jodowy (VII) (nadjodowy) rozszczepia w cukrach wiązania C–C sąsiadujące z grupami hydroksylowymi (lub grupą hydroksylową i aminową), wskutek czego powstają grupy aldehydowe reagujące z sulfonofuksyną. W wyniku reakcji powstaje różowoczerwony kompleks i wydzielą się H₂SO₃.



Postępowanie

1. Po przeprowadzeniu elektroforezy opisanej w rozdziale 0.1. żel, na który naniesiono 20 µl surowicy, zanurzyć w 12,5% kwasie trichlorooctowym na 30 minut, przemyć wodą destylowaną, po czym umieścić na czas 50 minut w roztworze 1% kwasu jodowego (VII) (nadjodowy) w 3% kwasie octowym (w ciemności).
2. Żel przemyć wodą destylowaną (zmieniając wodę 6-krotnie co 10 minut). Następnie zalać roztworem fuksyny i ponownie pozostawić na czas 50 minut w ciemności.
3. Po tym czasie fuksynę zlać i zachować, a żel zalać świeżo sporządzonym 0,5% roztworem disiarczynu (IV) potasu (pirosiarczynu potasu); roztwór zmieniać 3-krotnie co 10 minut.
4. Przepłukiwać żel wodą destylowaną, aż do odmycia tła i przechowywać w 3–7,5% kwasie octowym.

Materiały i odczynniki

- 1% kwas jodowy (VII) (nadjodowy) w 3% kwasie octowym (sporządzać na świeżo – odczynnik nietrwały)
- fuksyna zasadowa: 1 g fuksyny rozpuścić w 200 ml wrzącej wody, oziębic do 50°C, dodać 0,5 ml stężonego HCl oraz 1 g disiarczynu (IV) potasu $K_2S_2O_5$ (pirosiarczynu potasu), zakorkować i pozostawić na 24 godz. w temp. pokojowej; zmieszać z 0,5 g węgla aktywnego, wytrząsać i przesączyć; w razie potrzeby powtórzyć tę czynność aż do momentu uzyskania bezbarwnego i klarownego płynu
- 0,5% roztwór disiarczynu (IV) potasu (pirosiarczynu potasu)
- 12,5% kwas trichlorooctowy

3.11.3.3 Lokalizacja izoenzymów fosfatazy zasadowej (zymogram)

Zasada metody

Po elektroforezie białek surowicy ludzkiej w żelu poliakryloamidowym można zlokalizować trzy pasma aktywności fosfatazowej. Najwolniej wędrujący to enzym pochodzenia jelitowego, najszybciej fosfataza pochodzenia wątrobowego. Pomiędzy tymi dwoma pasmami stwierdza się obecność fosfatazy pochodzącej z tkanki kostnej. Surowica dorosłego człowieka zawiera głównie izoenzym wątrobowy, śladowe ilości kostnego i około 20% enzymu pochodzenia jelitowego. Stosunki te ulegają zaburzeniu w stanach patologicznych, dlatego analiza elektroforogramów ma znaczenie diagnostyczne, pozwalając na stwierdzenie ewentualnych zmian proporcji pomiędzy poszczególnymi izoenzymami.

Żel po elektroforezie inkubuje się w roztworze substratu: α -naftylofosforan i sól diazowa Fast Blue B w pH zasadowym. Zwolniony przez enzym α -naftol tworzy barwny kompleks z solą diazową. W miejscach gdzie obecny jest enzym pojawiają się pasma koloru fioletowo-brązowego.

Postępowanie

1. Po przeprowadzeniu elektroforezy opisanej w rozdziale 3.11.1.1 żel, na który naniesiono 100 µl surowicy krwi, przepłukać i inkubować 3 razy po 20 minut w 0,05 M buforze boranowym o pH 9,7 z 1 mM $MgCl_2$ (bufor optymalny dla aktywności katalitycznej fosfatazy zasadowej).
2. Żel inkubować w roztworze substratu w temp. 37°C do momentu pojawienia się czerwono-brunatnych pasm.
3. Przenieść żel do 7% roztworu kwasu octowego.

Materiały i odczynniki

- substrat: 5 mg α -naftylofosforanu sodu i 3 mg Fast Blue B rozpuścić w 5 ml 0,05 M buforu boranowego o pH 9,7; roztwór przygotować na świeżo, przed użyciem przesączyć
- 0,05 M bufor boranowy o pH 9,7 zawierający 1 mM $MgCl_2$: 3,74 g kwasu borowego i 0,2 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$ rozpuścić w około 500 ml wody, doprowadzić do pH 9,7 za pomocą KOH i uzupełnić wodą do 1 litra
- 7% kwas octowy

3.11.3.4 Barwienie z użyciem Coomassie Brilliant Blue w środowisku kwaśnym

Postępowanie

1. Po zakończeniu elektroforezy SDS-PAGE (rozdział 3.11.2.) żel przenieść do kuwety, zalać 0,1% roztworem Coomassie Brilliant Blue R-250 w 40% metanolu z 10% kwasem octowym i wybarwiać przez około 1 godz.
2. Następnie barwnik zlać i żel przemywać roztworem 40% metanolu w 10% kwasie octowym, aż do momentu odbarwienia tła. Celem szybszego odbarwienia tła można stosować kawałki gąbki włożone do kuwety z odbarwiaczem.

Materiały i odczynniki

- odczynnik barwiący: 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 w 40% metanolu i 10% kwasie octowym
- odbarwiacz: roztwór 40% metanolu w 10% kwasie octowym

3.11.3.5 Barwienie z użyciem Coomassie Brilliant Blue w środowisku wodnym

Lawrence A.M., Besir H. (2009) J Vis Exp 14;(30), doi: 10.3791/1350.

Postępowanie

1. Po zakończeniu elektroforezy żel przenieść do kuwety, zalać 100 ml H₂O destylowanej i podgrzewać w mikrofalówce przez ok. 30 sek. (nie dopuścić do wrzenia!).
2. Przepłukać żel dwukrotnie H₂O destylowaną, wytrząsając na kołysce każdorazowo przez 5 min.
3. Usunąć H₂O, a żel zalać 100 ml wodnego roztworu barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250 i podgrzewać w kuchence mikrofalowej przez ok. 10 sek. (nie dopuścić do wrzenia!). Dobarwiać żel przez kolejne 15-30 min. w temperaturze pokojowej, wytrząsając na kołysce.
4. Następnie barwnik zlać, a żel przemywać kilkakrotnie H₂O destylowaną, aż do momentu odbarwienia tła.

Materiały i odczynniki

- odczynnik barwiący: Coomassie Brilliant Blue G-250 w H₂O destylowanej (60-80 mg barwnika na 1 l H₂O, z dodatkiem 35 mM HCl; pH=2,0)
- odbarwiacz: H₂O destylowana

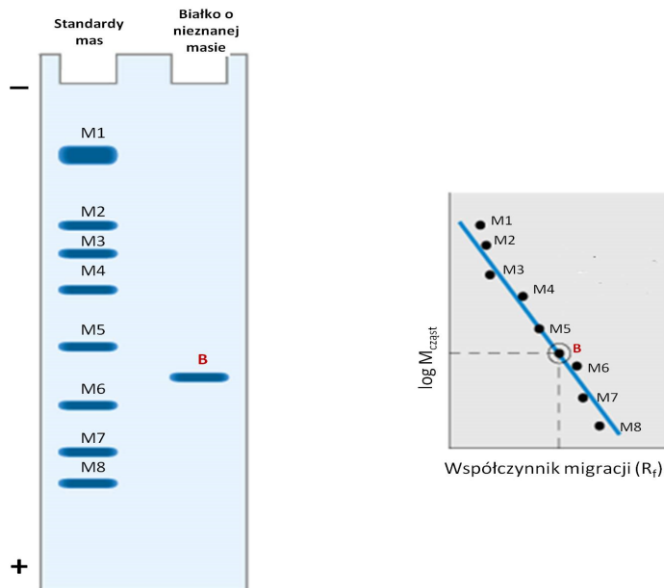
3.11.4. Wyznaczanie względnej masy cząsteczkowej białka

1. Zmierzyć drogę przebytą przez marker.
2. Zmierzyć drogę wszystkich pasm standardów i analizowanych prób.
3. Policzyc względne współczynniki migracji R_f dla standardów i prób badanych.

$$R_f = \frac{l}{d}$$

l – droga pasma białkowego, d – droga markera

4. Policzyc $\log M_{\text{cząst}}$ dla standardów użytych w elektroforezie.
5. Sporządzić wykres zależności $\log M_{\text{cząst}} = f(R_f)$ dla białek standardowych (przykład: Rys. 3.11).
6. Na podstawie wyznaczonych wartości R_f badanych białek odczytać z wykresu odpowiadające im wartości $\log M_{\text{cząst}}$ i obliczyć masę cząsteczkową.



Rys. 3.11 Wyznaczanie M_{czqst} białek na podstawie ich ruchliwości elektroforetycznej.

3.12 WYKAZYWANIE OBECNOŚCI GLIKOPROTEIN ZA POMOCĄ WIĄZANIA Z WOLNYMI LEKTYNAMI

Weir D.M. (red.) *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Sci, Publ., Oxford and Edinburgh 1967, 655.

Bog-Hansen T.C., Bjerrum O.J., Ramlau J. (1975) *Scand. J. Immunol.*, 4, 141-417.

Zasada metody

Lektyny stanowią grupę białek prostych lub glikoprotein nieimmunologicznego pochodzenia wykazujących zdolność swoistego wiązania cukrów wolnych, precypitacji glikokoniuatów lub aglutynacji komórek. Białka te o specyficznej zdolności odwracalnego wiązania cukrów są szeroko rozpowszechnione zarówno w świecie roślin, zwierząt jak i mikroorganizmów. Lektyny zbudowane są z dwóch lub czterech podjednostek, zwykle identycznych, zawierających najczęściej jedno miejsce wiążące. Stąd ilość miejsc wiążących cukry w lektynach uzależniona jest zazwyczaj od ilości występujących podjednostek. Istnieją jednak lektyny, które posiadają więcej niż jedno miejsce wiążące w podjednostce (np. lektyna z zarodków pszenicy – WGA) oraz takie, w których na cztery podjednostki przypadają tylko dwa miejsca wiążące (np. lektyna z soi – SBA oraz z soczewicy – LCA). Występowanie co najmniej dwóch miejsc wiążących w lektynie umożliwia zachodzenie reakcji krzyżowych i jest źródłem właściwości aglutynacyjnych i precypitacyjnych lektyn.

Lektyny charakteryzuje zdolność wiązania pojedynczych cukrów takich jak: mannoza, glukoza, N-acetyloglukozoamina, galaktoza, N-acetylogalaktozoamina lub fukoza. Na ogół jednak wykazują one większe powinowactwo w stosunku do di-, tri-, tetrasacharydów i oligosacharydów. Badania nad specyficznością cukrową lektyn wykazały, że interakcja tych białek z oligosacharydami lub glikopeptydami zależy nie tylko od rodzaju cukru, ale również od jego położenia w łańcuchu cukrowym, struktury łańcucha cukrowego oraz w przypadku glikopeptydów od reszty peptydowej, z którą jest związana część węglowodanowa.

Zdolność lektyn do tworzenia precypitatów z polisacharydami lub glikoproteinami znalazła szerokie zastosowanie do wykrywania i badania tych związków różnymi technikami, np. metodą podwójnej dyfuzji, elektroforezy powinowactwa, a także do ich izolacji metodą chromatografii powinowactwa z zastosowaniem immobilizowanych lektyn.

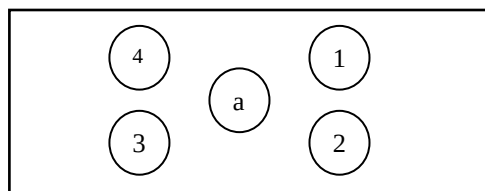
Powszechnie stosowaną lektyną w badaniach glikoprotein jest konkanawalina A (ConA)). Białko to jest najwcześniej poznaną lektyną, po raz pierwszy wyizolowano je z kanawalii (*Canavalia ensiformis*)

w chromatografii powinowactwa. Jest metaloproteiną zbudowaną z 4 nieglikozylowanych łańcuchów polipeptydowych, z których każdy ma masę 26 kDa (237 reszt aminokwasowych). W środowisku o pH około 5,6 konkanawalina A występuje w postaci dimeru, natomiast w pH 7,0 tworzy tetramer. Każda z czterech podjednostek posiada jon Cu^{2+} i Mn^{2+} . Utrata jonów metali powoduje spadek aktywności tego białka.

Konkanawalina A wykazuje zdolność wiązania reszt mannozowych, glukozyowych oraz N-acetyloglukozoaminowych, występujących w oligosacharydach, polisacharydach i glikoproteinach. Z rozgałęzionymi polisacharydami, zawierającymi te podjednostki cukrowe, tworzy precypitaty.

Postępowanie

1. Na płytkę szklaną o wymiarach 75×25 mm (szkiełko podstawowe) ułożoną na dokładnie wypoziomowanej powierzchni wylać 3,4 ml 1% agarozy w buforze Tris-weronał o pH 8,6.
Uwaga! Jeżeli nie przewidujemy suszenia i barwienia żelu, agarozę należy wylać do małej szalki Petriego (około 5 ml).
2. Po zastygnięciu agarozy wyciąć przy pomocy sztancy (najlepiej sztancy Weekego i Thomsona) zbiorniczki na roztwory lektyny i glikoprotein według przedstawionego poniżej schematu. Odległość między zbiorniczkami powinna wynosić około 1 cm.



3. Do otworu centralnego (a) nanieść 10–20 μl 2% lektyny (np. Con A), a do otworów brzeżnych kolejno 10–20 μl następujących preparatów: nierozcieńczona surowica krwi (1), surowica krwi rozcieńczona 2- lub 4-krotnie (2), dowolna glikoproteina np. orozomukoid lub kwaśna fosfataza (3) i surowy wyciąg roślinny (4).
4. Płytkę umieścić w szalce Petriego wyłożonej wilgotną ligniną. Całość pozostawić na 24–48 godz. w temp. pokojowej.
5. Odmyć niezwiązane białka, spryskując szkiełko z agarozą wodą destylowaną. Płytkę osuszyć: przykryć paskiem bibuły Whatman 1 (o dokładnie takich samych wymiarach co powierzchnia płytki), warstwą suchej ligniny i płytą szklaną z obciążeniem 0,5–1 kg, pozostawić na 10 minut. Po sprasowaniu agarozy bardzo ostrożnie zdjąć z płytki bibułę, zanurzyć płytkę w wodzie destylowanej na 5 minut, po czym usunąć nadmiar wody jw.
6. Sprasowaną agarozę na płytce wysuszyć w strumieniu zimnego powietrza (pod wentylatorem), po czym barwić.
- 6A. Barwienie na aktywność enzymatyczną – w przypadku obecności kwaśnej fosfatazy: wysuszoną płytkę zalać 0,1 M buforem octanowym o pH 5,1, zawierającym α -naftylofosforan sodu (1 mg/ml) i Fast Blue B (0,4 mg/ml); inkubować w temp. 37–40°C aż do pojawienia się różowo-czerwonych precypitatów (zasadę metody opisano w rozdziale 4.7.2), po czym wysuszyć. Tak wybarwioną płytkę można dodatkowo barwić na białko.
- 6B. Barwienie na białko: wysuszoną płytkę inkubować 10 minut w 0,5% roztworze Coomassie Brilliant Blue R-250, po czym odbarwiać aż do uzyskania jasnego tła. **Uwaga!** Wywoływanie aktywności fosfatazowej przeprowadzać przed barwieniem na białko.

Materiały i odczynniki

- bufor Tris-weronał, pH 8,6 (roztwór podstawowy): 22,4 g kwasu 5,5-dietylobarbiturowego (weronał), 44,3 g Tris i 0,53 g mleczanu wapniowego, rozpuścić w końcowej objętości 1 litra wody dejonizowanej; do buforu

można dodać 1 g azydku sodu, jako środka konserwującego; przed użyciem bufor rozcieńczyć 5-krotnie wodą dejonizowaną

- 1% roztwór agarozy: 1 g agarozy wsypać do kolby stożkowej, nalać 100 ml rozcieńczonego buforu Tris-weronał o pH 8,6 i rozpuścić na wrzącej łaźni wodnej lub w kuchence mikrofalowej; zabezpieczyć przed parowaniem; klarowny roztwór agarozy umieścić na mieszadle magnetycznym z grzałką, a w trakcie wylewania płytek trzymać w łaźni wodnej o temp. 56°C
- 0,9% NaCl
- roztwór Coomassie Blue R-250 do barwienia białka na płytkach: 5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, rozpuścić w mieszaninie 96% etanol : lodowaty kwas octowy (450 ml alkoholu i 100 ml kwasu) i pozostawić na okres 12–24 godz. w temp. pokojowej, przesączyć przez bibułę, a następnie dodać 450 ml wody dejonizowanej
- roztwór odbarwiający: 30% etanol z 12,5% kwasem octowym; odbarwiacz należy po użyciu regenerować poprzez sączenie przez lejek z węglem aktywnym
- surowica krwi bydlęcej lub wieprzowej: nierozcieńczona i rozcieńczona 2- i 4-krotnie 0,9% NaCl
- 2% roztwór lektyny: konkanawaliny A (ConA) (ewentualnie lektyny z zarodków pszenicy (WGA) lub lektyny z soczewicy (LCA))
- 0,5–1% roztwór orozomukoidu (lub preparat kwaśnej fosfatazy)
- surowe wyciągi z nasion lub z liści siewek roślin z rodziny dyniowatych lub motylkowych: ekstrakcję białek przeprowadzić do 0,1 M buforu octanowego o pH 5,1–5,6, w stosunku 1:4 (w/v); przesączyć i odwirować; stężenie białka w próbce powinno wynosić około 20 mg/ml; wyciąg z nasion zagaęścić 2–4 krotnie.

3.13 WYBRANE METODY OTRZYMYWANIA BIAŁEK

Preparacja białek to zwykle wieloetapowe postępowanie, w którym wykorzystując szereg właściwości fizykochemicznych tych związków, wydziela się je z materiału biologicznego w stanie natywnym i w możliwie najwyższym stopniu oczyszczenia. Aktualny stan wiedzy dotyczącej zarówno tradycyjnych jak i współcześnie stosowanych metod oczyszczania i analizy białek można znaleźć w bardzo licznych opracowaniach podręcznikowych. W tym rozdziale w sposób bardzo skrótowy zostały przedstawione tylko te techniki, których wykorzystanie wynika z programu prowadzonych ćwiczeń. Wcześniej – w rozdziale 0 – omówiono jedną z metod chromatograficznych wykorzystywanych w preparatyce białek – filtrację żelową.

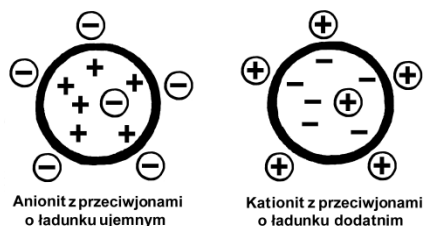
3.13.1 Podstawy teoretyczne chromatografii jonowymiennej

Chromatografia jonowymienna jest jedną najbardziej popularnych metod rozdzielania mieszanin wieloskładnikowych, używanych powszechnie w procesach oczyszczania białek. Metodę tę stosuje się z powodzeniem w stosunku do mieszanin białek różniących się ładunkiem.

W chromatografii jonowymiennej stosuje się nośniki zwane wymieniaczami jonowymi lub jonitami. Jonit jest substancją, która w zetknięciu z roztworem wymienia część swoich jonów na jony z roztworu. W strukturze jonowymieniacza można wyróżnić nierozpuszczalną matrycę połączoną wiązaniami kowalencyjnymi z określonymi grupami funkcyjnymi, które ulegają jonizacji i mogą w sposób odwracalny asocjować z jonami przeciwnego znaku, tzw. **przeciwjonami**. W zależności od ładunku wymienianych jonów wyróżniamy dwa typy jonowymieniaczy – kationity i anionity.

Kationit to polianion, wymieniający z roztworem kationy, podczas gdy **anionit** jest polikationem zdolnym do wymiany anionów (Rys. 3.12). Jony wymiany tzw. **przeciwjony** (kationy i aniony) pochodzą z roztworu buforowego równoważącego złoża. Są one zastępowane przez obdarzone ładunkiem cząsteczki białka rozdzielane podczas chromatografii.

Najczęściej stosowanymi nośnikami w chromatografii jonowymiennej białek są: celuloza, Sepharose i Sephadex. Do tego typu matryc dołączone są grupy funkcyjne. W przypadku kationitów są to najczęściej grupy karboksylowe, fosforanowe i sulfonowe, natomiast grupami funkcyjnymi w cząsteczkach anionitów są zwykle aminy o różnej rzędowości (Tab. 3.6).



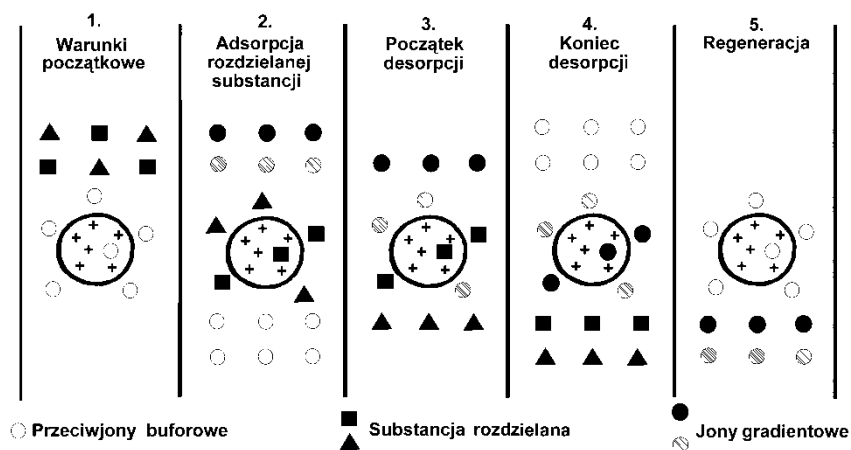
Rys. 3.12 Częsteczki jonowymieniacza z odpowiednimi przeciwnonami
wg Ion exchange chromatography. Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals

Tab. 3.6 Grupy funkcyjne najczęściej stosowanych jonowymieniaczy

rodzaj jonitu	skrót	pełna nazwa	wzór chemiczny
KATIONITY	CM-	karboksymetylo-	$-\text{OCH}_2\text{COO}^-$
	P-	fosfo-	$-\text{OPO}_3\text{H}^-$
	SE-	sulfoetylo-	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
	SP-	sulfopropilo-	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
ANIONITY	DEAE-	dietyloaminoetylo-	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
	TEAE-	trietyloaminoetylo-	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$
	QAE-	dietylo-(2-hydroksypropilo)aminoetylo-	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$

Jedną z istotnych cech charakteryzujących złoża stosowane w opisywanym typie chromatografii jest **pojemność jonowymieniacza**, czyli liczba równoważników wymienianych jonów (podana w miliwalach) przypadająca na 1 g złoża. Ponadto istotną właściwością jonitu jest jego polarność, określająca zakres pH, w którym można złożo stosować. Jeżeli zakres ten jest szeroki, mówi się o silnym jonowymieniaczu, którego grupy funkcyjne mają charakter mocnych kwasów lub zasad. Odpowiednio jonowymieniacze słabe, pracujące w wąskim spektrum pH, posiadają grupy funkcyjne o charakterze słabych kwasów lub zasad.

Rozdział w chromatografii jonowymiennej odbywa się na zasadzie odwracalnej adsorpcji cząsteczek o określonym ładunku. Można w nim wyróżnić dwa etapy. Pierwszy obejmuje naniesienie mieszaniny białek na kolumnę chromatograficzną oraz adsorpcję białek o odpowiednim ładunku. Drugi etap to elucja związanych białek, a po jej zakończeniu regeneracja złoża, czyli powrót do stanu wyjściowego (Rys. 3.13).



Rys. 3.13 Etapy chromatografii jonowymiennej na przykładzie anionitu
wg Ion exchange chromatography. Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals

Elucję białek zaadsorbowanych na jonicie można prowadzić dwoma sposobami. Jednym z nich jest zmiana pH buforu, którym przemywamy złoże. W przypadku anionitów stosuje się w tym celu bufor o niższym pH niż to, w którym nanoszono białka, natomiast w przypadku kationitów używa się buforów o wyższym pH niż pH nanoszonego roztworu białka.

Drugą metodą elucji białek w chromatografii jonowymiennej jest zwiększenie siły jonowej eluentu. Można tego dokonać zwiększając stężenie wcześniej używanego buforu, bądź też dodając do buforu soli obojętnej (najczęściej KCl lub NaCl).

Dobór złożeń oraz warunki chromatografii jonowymiennej są uzależnione od specyfiki rozdzielanych substancji. Należy je dostosować indywidualnie do potrzeb, kierując się przede wszystkim zakresem stabilności białek. W przypadku białek o pI przypadającym w pH kwaśnym najwygodniej posłużyć się anionitem, nanosząc próby w buforze o pH wyższym niż pI rozdzielanych białek. Natomiast oczyszczając białka zasadowe najlepiej zastosować kationit, w buforze o pH niższym niż pI izolowanych cząsteczek białkowych.

3.13.2 Preparacja kwaśnej α_1 -glikoproteiny (orozomukoidu) z surowicy wieprzowej

Kolous V. (1965) Biochim. Biophys. Acta 139, 10.

Zasada metody

Orozomukoid występuje w surowicy krwi człowieka i innych ssaków. Jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 40–44 kDa. Cechuje go wyjątkowo duża zawartość cukru (około 40% masy cząsteczki) i rozpuszczalność w 1,2 M kwasie chlorowym (VII) (nadchlorowy). Orozomukoid jest typowym przykładem białka tzw. ostrej fazy, ponieważ jego poziom wzrasta w odpowiedzi na urazy, przewlekłe stany zapalne czy choroby nowotworowe. Ponieważ syntetyzowany jest w wątrobie, w przypadku ostrej niewydolności tego organu jego poziom ulega obniżeniu.

Orozomukoid wydzielono m.in. z surowicy człowieka, wołu, wieprza, szczura. Orozomukoid wydzielony z surowicy wieprza jest w 70% homologiczny do orozomukoidu człowieka.

W metodach izolacji tej glikoproteiny z surowicy lub osocza wykorzystuje się jej rozpuszczalność w kwasie chlorowym (VII) (nadchlorowy) oraz wyjątkowo niski punkt izoelektryczny (pI ok. 2,5). W przedstawionej poniżej metodzie zastosowano chromatografię jonowymienną na DEAE-celulozie (anionit) w pH 3,7. W tym pH pozostałe białka surowicy są kationami i nie są zatrzymywane na anionicie, natomiast orozomukoid z racji niskiego pI będzie w tym pH anionem i zaadsorbuje się na wymienniaczu. Związaną glikoproteinę zwalnia się z kolumny buforem z dodatkiem NaCl (elucja przez zwiększenie siły jonowej).

Postępowanie

Przygotowanie jonowymienniacza

1. DEAE-celulozę zawiesić w wodzie na około 30 minut, następnie odsączyć na lejku Büchnera, przenieść do zlewki zawierającej 15 objętości (v/w) 0,5 M HCl (na 1 g wymienniacza 15 ml HCl) i mieszać przez okres 30 minut.
2. Złoże odmyć wodą do pH około 4 i umieścić na czas 30 minut w takiej samej objętości 0,5 M NaOH. Ponownie odmyć wodą do pH około 8 i zawiesić w buforze octanowym o pH 3,7.
3. Zawiesinę przemyć kilkakrotnie na lejku Büchnera (pod pompą próżniową) buforem octanowym o pH 3,7 celem zrównoważenia złożeń (pH przesączu powinno być takie samo jak buforu).

Przygotowanie roztworu białka i rozdział chromatograficzny

1. Surowicę krwi dializować 12 godz. do 10 objętości buforu octanowego o pH 3,7. Wytrącony osad odwirować.
2. Do 10 ml wydializowanej surowicy dodać około 5 g zrównoważonej do pH 3,7 oraz odsączonej DEAE-celulozy i mieszać delikatnie na mieszadle magnetycznym przez okres 1–2 godz.
3. Zawiesinę przenieść do kolumny i odmyć buforem octanowym o pH 3,7 do zaniku absorpcji przy 280 nm.

4. Związany z wymiennikiem orozomukoid eluować z kolumny buforem octanowym o pH 3,7 zawierającym 0,9% NaCl. Zbierać frakcje o objętości 2 ml.
5. Frakcje o wartościach absorbancji przy 280 nm powyżej 0,1 połączyć i dializować do wody przez noc.
6. W otrzymanym preparacie na następnych ćwiczeniach wykazać obecność reszt cukrowych testem dyfuzyjnym z lektynami (rozdział 3.12) oraz oznaczyć procentową zawartość cukrów metodą fenolową (rozdział 5.4.2)

Materiały i odczynniki

- DEAE-celuloza
- 0,5 M HCl
- 0,5 M NaOH
- bufor octanowy o pH 3,7: zmieszać równe objętości 0,1 M kwasu octowego i 0,01 M octanu sodu (sprawdzić pH buforu i w przypadku niezgodności dodać jednego ze składników)
- bufor octanowy o pH 3,7 z 0,9%NaCl
- surowica krwi wieprzowej

3.13.3 Preparacja trypsyny z trzustki bydlęcej

Wilimowska-Pelc A., Mejbaum-Katzenellenbogen W. (1978) Anal. Biochem. 90, 816–820.

Zasada metody

Trypsyna jest proteinazą wydzielaną przez trzustkę w postaci nieaktywnego proenzymu – trypsynogenu. Proenzym ulega autoaktywacji lub jest aktywowany przez enterokinazę do trypsyny w dwunastnicy. Większość metod preparacji tego enzymu polega na ekstrakcji białek trzustki do 0,25 M kwasu siarkowego, a następnie ich frakcjonowaniu siarczanem (VI) amonu. Uzyskany enzym dodatkowo oczyszcza się metodą chromatografii powinowactwa na złożach z immobilizowanymi inhibitorami tego enzymu.

W opisaney metodzie wykorzystano do ekstrakcji białek trzustki 5% kwas trichlorooctowy, w którym trypsynogen jest przez pewien okres czasu rozpuszczalny, po czym wytrąca się z ekstraktu w postaci osadu. Trypsynogen rozpuszczony w środowisku zasadowym w obecności CaCl_2 ulega autoaktywacji do trypsyny.

Postępowanie

Uwaga! Preparację przeprowadzić w temp. 0–5°C.

1. Zamrożone trzustki bydlęce częściowo rozmrozić w temp. pokojowej, zmielić w młynku do mięsa i zmieszać z dwoma objętościami 5% kwasu trichlorooctowego (2 l/kg tkanki). Ekstrakcję prowadzić przez 1 godz. przy stałym mechanicznym mieszaniu. Następnie całość wirować przy około 3 000 obr./min.
2. Płyn nad osadu szybko przesączyć przez bibułę filtracyjną lub podwójną warstwę flizeliny (najlepiej na lejku Büchnera pod pompą próżniową) i pozostawić na około 24 godz. Wypadający osad odwirować przy około 3 000 obr./min i zawiesić w 0,05 M HCl (50 ml/kg tkanki).
3. Całość dializować do około 100 objętości 0,05 M HCl przez okres 24–48 godz.
4. Opalizujący roztwór doprowadzić 0,1 M NaOH do pH 5,6. Wypadający osad usunąć przez wirowanie.
5. Płyn doprowadzić do pH 8, dodać CaCl_2 do końcowego stężenia 0,1 M, pozostawić na okres około 10 godz. Po tym czasie trypsynogen aktywuje się do trypsyny.

Uzyskany roztwór enzymu dializować do 100 objętości 1 mM HCl i zliofilizować.

Uwagi

Z kilograma trzustki uzyskuje się około 1 g czystego enzymu.

Materiały i odczynniki

- zamrożone trzustki bydlęce
- 5% kwas trichlorooctowy
- 0,05 M HCl
- CaCl_2
- 0,1 M NaOH

3.13.4 Zastosowanie chromatografii powinowactwa w preparatyce białek

W chromatografii powinowactwa (swoistej sorpcji) wykorzystuje się zdolność izolowanego związku do specyficznego rozpoznania i odwracalnego związania z ligandem immobilizowanym na nieruchomym nośniku (Rys. 3.14). Technika ta znalazła zastosowanie w badaniach podstawowych, preparatyce i analizie licznych związków biologicznych (enzymów, inhibitorów, przeciwciał, kwasów nukleinowych i in.), a nawet komórek czy fagów.

Wyróżnia się kilka technik chromatografii swoistej sorpcji białek, najważniejsze to: chromatografia biopowinowactwa, chromatografia powinowactwa hydrofobowego, chromatografia kowalencyjna oraz chromatografia powinowactwa do jonów metali ciężkich (chelatująca).

W chromatografii biopowinowactwa wykorzystuje się powinowactwo biologiczne oczyszczanego białka do unieruchomionego liganda (np. oddziaływanie enzym-inhibitor, antygen-przeciwciało, lektyna-glikoproteina). Chromatografia powinowactwa hydrofobowego opiera się na oddziaływaniach hydrofobowych pomiędzy hydrofobowymi częściami cząsteczki białkowej a hydrofobowym adsorbentem.

W chromatografii powinowactwa do jonów metali ciężkich wykorzystuje się fakt tworzenia przez histydynę, cysteinę i tryptofan kompleksów z jonami metali ciężkich. Adsorbentem jest zwykle złożo Sepharose związane z ligandem o właściwościach chelatujących.

Chromatografia kowalencyjna (chemisorpcja) polega na tym, że związek izolowany wiąże się kowalencyjnie z nośnikiem poprzez tworzenie mostków disiarczkowych.

Stała dysocjacji kompleksu ligand–izolowany związek powinna się zawierać w granicach od 10^{-4} do 10^{-8} M. Jeżeli jest większa od 10^{-4} M prawdopodobieństwo związania na kolumnie jest małe, natomiast gdy jest mniejsza od 10^{-8} M, to izolowany związek będzie trudno zwalniał się z kompleksu z ligandem.

Immobilizacja liganda

Pierwszym etapem procesu chromatograficznego jest immobilizacja liganda, obejmująca aktywację złoża i związanie z nim liganda. Powszechnie stosuje się immobilizację liganda na złożu poprzez wiązanie kowalencyjne, jonowe albo fizyczną adsorpcję. Poza tym można wykorzystywać sieciowanie odpowiednimi reagentami, bez użycia jakichkolwiek nośników, oraz pułapkowanie w żelu lub mikrokapsułkach, gdzie ligand pozostaje jedynie ograniczony półprzepuszczalną membraną polimerową.

Ligandami mogą być enzymy, inhibitory, antygeny, przeciwciała, lektyny, kwasy nukleinowe, witaminy, hormony a nawet całe komórki.

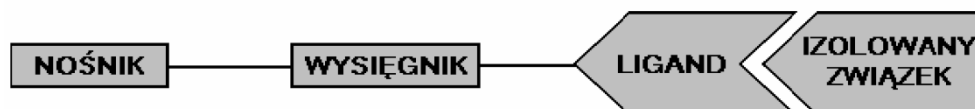
Aktywacja złoża ma na celu przeprowadzenie wybranych grup obecnych na powierzchni nośnika (aminowych, karboksylowych, hydroksylowych lub sulfhydrylowych) w wysoce reaktywne pochodne zdolne do tworzenia wiązań z odpowiednimi grupami funkcyjnymi liganda (aminowymi, karboksylowymi, hydroksylowymi lub sulfhydrylowymi). W zależności od rodzaju aktywowanych grup nośnika (lub wysięgnika) oraz wyboru grup funkcyjnych liganda, przez które będzie związany, stosowanych jest wiele metod aktywacji złoża.

Najpowszechniej wykorzystywaną jest aktywacja grup hydroksylowych agarozy (lub innego nośnika, posiadającego na powierzchni grupy $-\text{OH}$) za pomocą bromocyjanu (Rys. 3.15, rozdział 3.13.4.1). Inną metodą jest aktywacja złoża za pomocą diwinylosulfonu (Rys. 3.16, rozdział 3.13.4.2). W obu przypadkach otrzymujemy pochodne zdolne do reagowania z grupami aminowymi liganda, a w przypadku aktywacji diwinylosulfonem dodatkowo z grupami hydroksylowymi i sulfhydryłowymi.

Wydajność wiązania liganda z nośnikiem zależy od dostępności grup aktywnych nośnika, pH, temperatury, siły jonowej oraz stężenia liganda. Warunki immobilizacji powinny być tak dobrane, aby nie

zdenaturować liganda i nie zasłaniać bądź nie eliminować grup, które mają uczestniczyć w oddziaływaniu z izolowanym związkiem.

Niekiedy, zwłaszcza w przypadku ligandów o niewielkich rozmiarach, aby uniknąć konfliktów sterycznych w oddziaływaniu z izolowanym związkiem, stosuje się kilkuwęglowe **wysięgniki** (grupy dystansowe, odstępniki) alifatyczne lub aromatyczne, na których będzie związany ligand (Rys. 3.14). Zwykle nie stosuje się wysięgników dłuższych niż sześciowęglowe. Wysięgniki przyłącza się do złoża w analogiczny sposób jak ligandy.



Rys. 3.14 Schemat oddziaływań w chromatografii powinowactwa

Nośniki wykorzystywane w chromatografii powinowactwa powinny posiadać:

- budowę chemiczną zapewniającą im odporność i niezmienność właściwości fizykochemicznych w czasie immobilizacji i chromatografii, a więc powinny być niewrażliwe na zmiany pH, siły jonowej, detergenty, rozpuszczalniki organiczne,
- odpowiednie grupy chemiczne niezbędne do związania liganda,
- odpowiednią wielkość i porowatość ziaren, zapewniającą dużą powierzchnię do wiązania liganda, a w trakcie rozdzielania łatwy dostęp izolowanych cząsteczek o dużej masie do immobilizowanego liganda,
- odpowiednie właściwości hydrofobowe i hydrofilowe,
- dobre parametry przepływu, zapewniające szybki przepływ roztworów,

a ponadto powinny nie wykazywać zdolności do adsorpcji niespecyficzej, która może być powodem sterycznego blokowania liganda przez białka balastowe.

Najczęściej wykorzystywane nośniki w chromatografii powinowactwa białek to żele agarozowe: Sepharose 4B, Sepharose 6B, AH-Sepharose 4B – (posiadająca 6-węglowodorowy wysięgnik zakończony grupą aminową), CH-Sepharose 4B (posiadająca 6-węglowy wysięgnik zakończony grupą karboksylową), Thiol-Sepharose (posiadająca glutationowy wysięgnik niezbędny w chromatografii kowalencyjnej). Często stosuje się także inne złoża będące polimerami cukrów (np. celuloza, Sephadex) lub akryloamidu. W chromatografii powinowactwa wykorzystuje się również nośniki nieorganiczne, np. krzemionkę i szkło porowate.

Przebieg procesu chromatograficznego

Klasyczną chromatografią powinowactwa, mającą na celu wyizolowanie pożądanego związku znajdującego się w mieszaninie, przeprowadza się na złożu upakowanym w kolumnie. Faza ruchoma może przepływać przez nią grawitacyjnie lub pod zwiększonym ciśnieniem (dzięki zastosowaniu pomp). W metodach analitycznych częściej wykorzystywana jest chromatografia wysokociśnieniowa (HPLC).

Tradycyjna chromatografia powinowactwa przebiega kilkuetapowo i obejmuje:

- zrównoważenie złoża w warunkach, w których będzie prowadzona sorpcja
- selektywne związanie wydzielanego związku, komórek lub fagów w warunkach zapewniających interakcję z ligandem
- odmycie niewiążących się substancji
- elucja roztworem obniżającym lub niwelującym oddziaływanie wydzielanego związku z ligandem
- regeneracja złoża

Zwolnienie materiału związanego na złożu następuje w wyniku zmiany pH, siły jonowej, temperatury, obniżenia polarności eluatu, jak również zastosowania konkurencyjnego związku silniej wiążącego się z ligandem albo izolowanym związkiem lub powodującym zmianę struktury białka (np. sole chaotropowe, chlorowodorek guanidyny lub mocznik).

Zastosowanie chromatografii powinowactwa

Chromatografia powinowactwa jest stosowana w preparatyce białek i peptydów występujących naturalnie, a także uzyskiwanych na drodze inżynierii genetycznej lub syntezy chemicznej. Stosując tę metodę,

można również oddzielić białka zdenaturowane lub nieprawidłowo sfałdowane od tych, które posiadają właściwą strukturę zapewniającą im aktywność. Ponadto za pomocą chromatografii immunopowinowactwa (z zastosowaniem przeciwciał) można izolować i badać białka genetycznie spokrewnione.

Chromatografia powinowactwa ze względu na użyteczność, wynikającą z selektywności i dużej wydajności procesu izolacji, znalazła szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu (farmaceutyczny, kosmetyczny, spożywczy).

3.13.4.1 Immobilizacja konkanawaliny A na Sepharose 4B po aktywacji bromocyjanem

March S.C., Parikh I., Cuatrecasas P. (1974) Anal. Biochem. 60, 149–152.

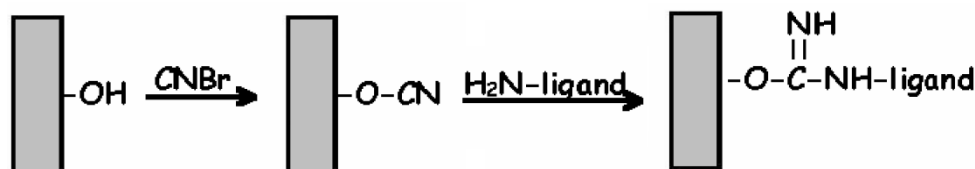
Zasada metody

Aktywacja złoza posiadającego na swojej powierzchni wolne grupy hydroksylowe umożliwia uzyskanie wysoce reaktywnych pochodnych karboiminowych zdolnych do reakcji z grupami aminowymi immobilizowanego liganda lub wysięgnika (Rys. 3.15). Reakcja wiązania liganda z Sepharose 4B jest najbardziej efektywna w granicach pH 8–10, kiedy większość wolnych grup aminowych liganda jest nieuprotanowana. Najczęściej stosuje się 0,2 M bufor węglanowy zawierający 0,5 M NaCl o pH 8,5–9,0. Obecność NaCl minimalizuje elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy cząsteczkami białka.

Stężenie liganda nie może być za wysokie ze względu na powstające niespecyficzne oddziaływania pomiędzy cząsteczkami liganda i pomiędzy ligandem a nośnikiem. Dla białkowych ligandów poleca się stosować stężenie 5–10 mg białka /ml żelu.

Wiązanie zachodzi po około 2 godzinach w temp. pokojowej lub po około 20 godz. w temp. 0–5°C. Korzystniejsze jest wiązanie w niskiej temperaturze przez dłuższy okres czasu.

Ponieważ nie wszystkie zaktywowane grupy nośnika ulegają połączeniu z ligandem należy je zablokować przez dodanie odczynników będących źródłem wolnych grup aminowych. Aby usunąć ligand związany niekowalencyjnie z nośnikiem, stosuje się przemywanie złoza dużymi objętościami buforów na przemian o pH kwaśnym i zasadowym, zawierających 0,5–1 M NaCl.



Rys. 3.15 Aktywacja złoza bromocyjanem i immobilizacja liganda

Postępowanie

1. Do 1 objętości Sepharose 4B (odmytej wodą od czynników antybakteryjnych) dodać 1 objętość wody i 2 objętości 2 M węglanu sodu. Całość ustawić w łaźni lodowej na mieszadle magnetycznym i zawiesinę wolno mieszać **pod dobrze działającym wyciągiem**.
2. Zwiększyć szybkość mieszania i dodać 0,05–0,1 objętości (w stosunku do zawiesiny nośnika) bromocyjanu rozpuszczonego uprzednio w acetonitrylu (2 g CNBr /ml). Mieszać intensywnie przez okres 1–2 minuty w temp. 4°C. Następnie zawiesinę przenieść na lejek Büchnera, odsączyć i przemyć kolejno 5–10 objętościami: 0,1 M Na₂CO₃, wody i 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,0) lub innym buforem o pH 8,0 bez wolnych grup aminowych.
3. Zaktywowany nośnik bezzwłocznie zawiesić w równej objętości buforu do immobilizacji, zawierającego 5–10 mg lektyny na 1 ml złoza i 0,1 M metyloglukozyd lub 0,1 M metylomannozyd. Wiązanie powinno zachodzić przez okres 16–20 godz. w 4°C przy delikatnym mieszaniu.
4. Nieprzereagowane grupy karboiminowe nośnika należy zablokować dodając glicyny do końcowego stężenia 1 M, po uprzednim odsączeniu Con A-Sepharose 4B i przemyciu kilkoma objętościami 0,1 M NaHCO₃.

5. Nośnik z immobilizowaną lektyną przemyć intensywnie 5–10 objętościami 0,1 M NaHCO₃, a następnie buforem, który będzie używany do chromatografii powinowactwa. W przypadku Con A bufory przemywające powinny zawierać jony metalu niezbędne do zachowania odpowiedniej konformacji lektyny (CaCl₂, MnCl₂ i MgCl₂ w stężeniu 1 mM).
6. Con A-Sepharose 4B należy przechowywać w 0,1 M buforze octanowym o pH 6, zawierającym 1 M NaCl i wymienione wyżej jony metalu w stężeniu 1 mM z dodatkiem 0,02% mertiolatu.

Materialy i odczynniki

- konkanawalina A (Con A)
- Sepharose 4B
- 2 M i 0,1 M węglan sodu
- bromocyjan rozpuszczony w acetonitrylu (2 g CNBr /ml) **Uwaga!** Trucizna!
- 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,0)
- 0,1 M metyloglukozyd lub 0,1 M metylomannozyd
- glicyna
- 1 M NaCl
- CaCl₂, MnCl₂ i MgCl₂
- 0,1 M bufor octanowy, pH 6 zawierający 1 M NaCl oraz 1 mM CaCl₂, MnCl₂ i MgCl₂

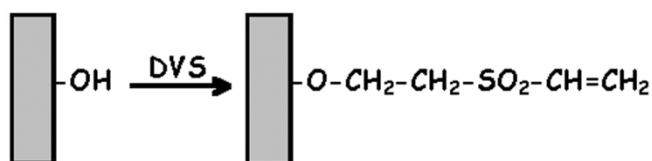
3.13.4.2 Immobilizacja trypsyny na Sepharose 4B po aktywacji diwinylosulfonem

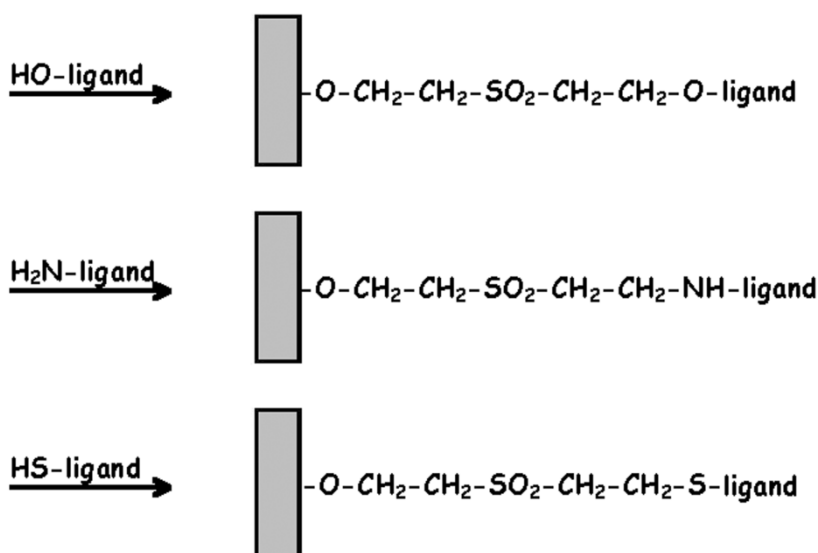
Pepper D.S. *Practical Protein Chromatography*. (Kenney, A., Powell, S. red.), Humana Press, Totowa, New Jersey 1992, 181-183.

Zasada metody

Aktywacja agarozowego złoza Sepharose 4B (lub innego nośnika posiadającego na powierzchni wolne grupy hydroksylowe) za pomocą diwinylosulfonu (DVS) prowadzi do uzyskania wysoce reaktywnych pochodnych, do których mogą przyłączać się ligandy lub wysięgniki poprzez grupy aminowe, hydroksylowe lub sulfhydrylowe (Rys. 3.16). Dużą zaletą tej metody jest znacznie mniejsza toksyczność DVS w porównaniu z bromocyjanem. Niestety, w przypadku niektórych białek obserwuje się niższą wydajność wiązania na złożu niż w przypadku aktywacji bromocyjanem.

Ogólne zasady i warunki aktywacji nośnika diwinylosulfonem oraz immobilizacja białek tą metodą są analogiczne do metody z wykorzystaniem bromocyjanu, opisanej szczegółowo w rozdziale 3.13.4.1.





Rys. 3.16 Aktywacja złoża diwinylosulfonem i immobilizacja liganda

Postępowanie

1. 100 g przemyczonej wodą i odsączonej Sepharose 4B zawiesić w 250 ml 0,1 M węglanu sodu (pH ok. 11,0).
2. Dodać (ciągle mieszając) 10 ml DVS i wytrząsać przez ok. 2 godz. w temp. pokojowej.
3. Aktywowane złoże odsączyć i przemyczać wodą na lejku Büchnera, aż pH przesączu spadnie do ok. 9,0, po czym zawiesić w równej objętości wody i doprowadzić pH do 7,0 za pomocą 1 M HCl (w tym stanie żel może być przechowywany ok. 1 roku).
4. Złoże odsączyć, przemyczać wodą, dodać do trypsyny rozpuszczonej w 0,05 M buforze boranowym o pH 9,0 z 0,02 M CaCl₂ (w ilości 30 mg białka na 1 g żelu) i wytrząsać przez noc w temp. pokojowej.
5. Złoże odsączyć, przemyczać wodą i blokować aktywowane, niezwiązane z ligandem grupy nośnika przez dodanie równej objętości 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 z 0,02 M CaCl₂ delikatnie mieszając przez 3 godziny. Tak przygotowane złoże jest gotowe do użycia.
6. W przypadku dłuższego przechowywania złoża należy przemyczać je kilkoma objętościami wody i 0,001 M HCl z 0,02 M CaCl₂.

Materiały i odczynniki

- Sepharose 4B
- trypsyna bydlęca
- diwinylosulfon (DVS)
- 0,1 M węglan sodu
- 0,05 M bufor boranowy, pH 9,0 z 0,02 M CaCl₂
- 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 z 0,02 M CaCl₂
- 0,001 M HCl z 0,02 M CaCl₂

3.13.5 Wysokosprawna chromatografia cieczowa odwróconej fazy (RP-HPLC)

HPLC oznacza kolumnową wysokosprawną chromatografię cieczową. Nazwa tej metody rozdzielania i analizy związków jest akronimem angielskiego określenia *High Performance Liquid Chromatography* (wysokosprawna chromatografia cieczowa) lub *High Pressure Liquid Chromatography* (wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa).

Zaletą tej metody jest wysoka rozdzielczość, skrócony czas rozdziału chromatograficznego i powtarzalność uzyskiwanych rozdzielów. Jest to związane z zastosowaniem odpowiednich drobnoziarnistych i porowatych złóż (wypełnień kolumny), cechujących się dużą wytrzymałością mechaniczną, będących najczęściej pochodnymi krzemionki oraz prowadzeniem chromatografii pod zwiększonym ciśnieniem, zwykle od 500 do 5 000 psi (psi – *pound per square inch*; $1 \text{ psi} = 6,895 \times 10^3 \text{ Pa} = 7,03 \times 10^{-2} \text{ atm} = 51,74 \text{ mm Hg}$). Ziarna złóż stosowanych w HPLC mają zwykle średnicę 3–10 μm (w klasycznej chromatografii 75–600 μm) i posiadają pory o średnicy 80–300 Å.

Technika HPLC jest powszechnie wykorzystywana do rozdzielania m.in. związków biologicznych w oparciu o chromatografię różnego typu: adsorpcyjną, podziałową, jonowymienną, hydrofobową, powinowactwa czy filtrację żelową. Rodzaj zastosowanej chromatografii jest związany z wyborem wypełnienia kolumny, na której jest prowadzony rozdziel.

W zależności od właściwości polarnych fazy stacjonarnej (złoża, którym jest wypełniona kolumna) i fazy ruchomej (eluent przepływający przez kolumnę), możemy mówić o rozdziale chromatograficznym prowadzonym w normalnym lub odwróconym układzie faz. W pierwszym przypadku stosuje się polarne fazy stacjonarne i fazy ruchome o mniejszej od nich polarności. W odwróconym układzie faz, faza stacjonarna jest słabo polarna lub niepolarna, natomiast faza ruchoma jest od niej bardziej polarna.

W chromatografii w odwróconych fazach – **RP-HPLC** (ang. *reversed phase HPLC*) – wykorzystuje się oddziaływania hydrofobowe rozdzielanych związków, np. peptydów czy białek, z hydrofobowymi ligandami (łańcuchy alkilowe zbudowane zwykle z 4–18 atomów węgla) znajdującymi się na powierzchni nośnika (najczęściej krzemionka).

Rozdziel chromatograficzny można przeprowadzić dwiema metodami, stosując **elucję izokratyczną lub gradientową**. W czasie elucji izokratycznej skład fazy ruchomej nie ulega zmianie, natomiast w elucji gradientowej w czasie trwania chromatografii skład eluentu zmienia się, a rozdziel przebiega kilkietapowo. Chromatografia rozpoczyna się od naniesienia mieszaniny rozdzielanych związków na kolumnę zrównoważoną polarną fazą ruchomą – dejonizowaną wodą z dodatkiem kwasu np. 0,1% roztwór TFA (kwasu trifluorooctowego) w wodzie lub buforem o niskiej sile jonowej i niskim pH, co sprzyja wielopunktowemu i silnemu związaniu rozdzielanych cząsteczek ze złożem. Po odmyciu niezadsorbowanych cząsteczek roztworem startowym, zwiększa się udział rozpuszczalnika niepolarnego (np. acetonitrylu) w fazie ruchomej, co powoduje zwolnienie (elucję) rozdzielanego związku, np. desorpcję białka ze złoża.

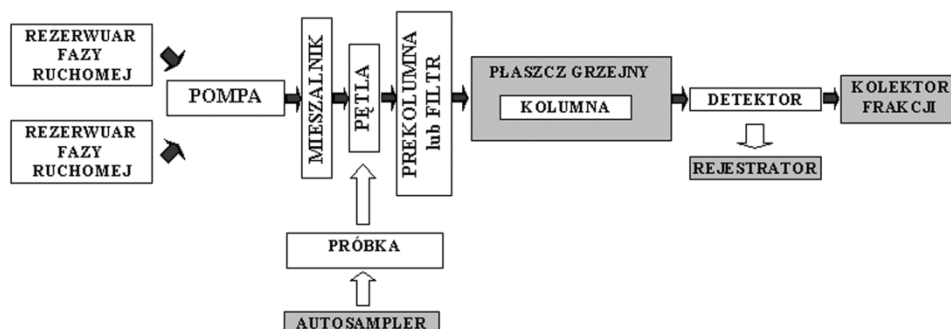
Poza wymienionym układem woda (czy dokładniej 0,1% roztwór TFA w wodzie) – acetonitryl, w RP-HPLC często stosuje się układ woda – metanol. Ponieważ zastosowanie niepolarnych odczynników organicznych może powodować zniszczenie struktur III- i IV-rzędowych białka i tym samym utratę aktywności np. przez enzymy, RP-HPLC najczęściej stosuje się do rozdzielania peptydów, w przypadku których rozpuszczalniki organiczne nie powodują istotnych zmian strukturalnych.

Analizy HPLC prowadzi się za pomocą kilkuskładnikowych systemów zwanych chromatografami cieczowymi (Rys. 3.17). W ich skład wchodzi:

- jednostka sterująca pracą systemu (w niektórych modelach jej funkcję pełni komputer, który steruje układem wykorzystując odpowiednie oprogramowanie)
- kolumna, na której prowadzimy rozdziel, niekiedy umieszczona w termostatowanym płaszczu grzejnym, zapewniającym odpowiednią temperaturę rozdziału, czasami wyższą niż temperatura otoczenia
- pompy wysokociśnieniowe podające na kolumnę roztwory fazy ruchomej o odpowiednim składzie, ilości i pod odpowiednim ciśnieniem
- mieszalnik, w którym następuje dokładne wymieszanie składników fazy ruchomej
- pętla dozownika prób (ang. *injector*) zwykle o objętości od 10 μl do 10 ml, do której za pomocą strzykawki nanosimy odpowiednią objętość próbki
- detektor umożliwiający analizę związków eluujących się z kolumny

Niekiedy w skład systemu HPLC wchodzi także:

- filtr przedkolumnowy lub przedkolumna (prekolumna), zatrzymujące zanieczyszczenia obecne w eluencie lub rozdzielanej próbce, chroniące kolumnę przed zniszczeniem lub szybkim zużyciem
- automatyczny podajnik prób (autosampler), zastępujący ręczne nastrzykiwanie prób na kolumnę
- kolektor frakcji



Rys. 3.17 Schemat systemu HPLC

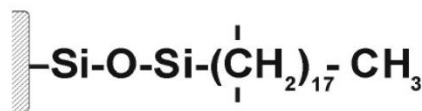
Kolorem szarym zaznaczono elementy systemu, które nie są konieczne do przeprowadzenia rozdzielania w HPLC; strzałki w kolorze czarnym wskazują kierunek przepływu eluentu w systemie HPLC.

Faza ruchoma może składać się z jednego rozpuszczalnika lub mieszaniny kilku rozpuszczalników. Roztwory (eluenty) stosowane w HPLC powinny być bardzo czyste, przeznaczone specjalnie do chromatografii – jakości „HPLC grade”. W przypadku samodzielnego sporządzania eluentów, powinny być przesączone przez filtr o średnicy porów 0,22 μm . Przy wyborze składu fazy ruchomej należy wziąć pod uwagę rodzaj rozdzielanych cząsteczek, rodzaj nośnika, którym została wypełniona kolumna i typ detekcji.

Przed przystąpieniem do rozdzielania chromatograficznego wszystkie roztwory powinny być odgazowane. Odpowietrzenie roztworów jest warunkiem właściwego rozdzielania, ponieważ zapobiega powstawaniu pęcherzyków gazu, które mogą powodować niewłaściwą pracę pomp (pompa tłocząca powietrze nie tłoczy roztworu, co przyczynia się do niewłaściwego składu lub ilości fazy ruchomej), „zatkanie” kapilar, którymi przepływają roztwory lub zapowietrzenie kolumny. Pęcherzyki gazu mogą także zakłócać lub uniemożliwiać detekcję, zwłaszcza w przypadku detektorów z małymi komórkami pomiarowymi. Ponadto tlen może powodować wygaszanie sygnałów w przypadku zastosowania detektora fluorescencyjnego. Roztwory można odpowietrzać przez przedmuchanie obojętnym gazem (najczęściej helem), za pomocą ultradźwięków (sonikacja), przez zastosowanie urządzenia umieszczonego pomiędzy rezerwuarem eluentu i pompą, wykorzystującego dyfuzję gazów przez mikroporowate ścianki przewodów teflonowych, przez ogrzanie eluentu (pod chłodnicą zwrotną) do temperatury zbliżonej do jego temperatury wrzenia, pod próżnią.

W HPLC zwykle są stosowane kolumny wykonane ze stali nierdzewnej, rzadziej ze szkła i polimerów, wypełnione różnymi złożami w zależności od wyboru rodzaju chromatografii. Większość nośników jest zbudowana z krzemionki posiadającej na powierzchni związane łańcuchy alkilowe lub łańcuchy alkilowe zakończone odpowiednimi grupami funkcyjnymi.

Powszechnie wykorzystywanym nośnikiem w RP-HPLC są złoża silikonowe (krzemionkowe) z 18-węglowymi (oktadecylowymi) ligandami związanymi na powierzchni (Rys. 3.18). Przykładem kolumny z takim wypełnieniem jest kolumna Nucleosil-300 C-18 (10 μm , 150 $\times$ 4,6 mm) wykorzystywana do oczyszczania BPTI (rozdział 3.13.6). Jest to kolumna analityczna wypełniona złożem Nucleosil ze związanymi na powierzchni 18-węglowymi łańcuchami, o wielkości ziarna 10 μm , porowatości 300 Å i wymiarach 150 $\times$ 4,6 mm.



Rys. 3.18 Schemat budowy złoża krzemionkowego typu C-18

Innym przykładem kolumny typu C-18 jest kolumna AccQ•Tag C-18 (4 μm, 150 × 3,9 mm) wykorzystywana do analizy składu aminokwasowego (rozdział 0).

Poza silnie niepolarnymi złożami typu C-18, stosuje się złoża z ligandami o krótszych łańcuchach węglowych i wyższej polarności: C-8, C-4 i C-2. Tego typu fazy stacjonarne można wykorzystywać do rozdzielania związków wielkocząsteczkowych.

Próbę zawierającą rozdzielaną mieszaninę наносimy na zrównoważoną kolumnę do pętli za pomocą strzykawki z tępo zakończoną igłą lub za pomocą automatycznego podajnika prób (autosamplera).

Eluat po opuszczeniu kolumny jest kierowany do detektora, gdzie jest analizowany. W zależności od potrzeb i właściwości fizykochemicznych cząsteczek rozdzielanych w HPLC (w chromatografiach różnego typu) możemy stosować różnego rodzaju detektory:

- absorpcji promieniowania UV/VIS mierzące absorpcję eluatu przy jednej długości fali
- absorpcji promieniowania UV/VIS, w których długość fali światła, jakie może być absorbowane przez wykrywaną substancję, jest zmieniana skokowo, umożliwiając detekcję różnych związków
- absorpcji promieniowania UV z płynną regulacją długości fali w całym zakresie ultrafioletu, umożliwiające po zatrzymaniu przepływu analizowanego eluatu rejestrację widma absorpcji badanego związku
- fluorescencyjny, mierzący intensywność światła emitowanego przez związek zdolny do fluorescencji
- refraktometryczny, mierzący różnicę współczynnika załamania światła samego eluentu i eluentu, w którym jest rozpuszczony analizowany związek
- elektrochemiczny wykorzystywany do wykrywania związków organicznych i nieorganicznych podlegającym reakcjom elektrochemicznego utlenienia i redukcji
- konduktometryczny, mierzący przewodnictwo eluatu
- pH-metryczny
- radiometryczny
- spektrometr mas

Zarejestrowana w czasie trwania rozdzielania chromatograficznego zmiana absorpcji eluatu (profil elucji) nazywana jest **chromatogramem**, natomiast czas, po którym dany związek wypływa z kolumny to **czas retencji (R_t)**. Ilościowe oznaczanie rozdzielanych związków oparte jest na pomiarze powierzchni pól poszczególnych szczytów profilu elucyjnego.

Chromatografia w odwróconych fazach HPLC znalazła szerokie zastosowanie m.in. w analizie i oczyszczaniu białek. Jest powszechnie wykorzystywana do następujących celów:

- oczyszczanie białek i peptydów,
- analiza składu aminokwasowego,
- identyfikacja aminokwasów w analizie sekwencyjnej białek z wykorzystaniem np. degradacji Edmana,
- w połączeniu ze spektrometrią masową znajduje zastosowanie w proteomice, pozwalając np. na identyfikację miejsc glikozylacji białka.

3.13.6 Preparacja zasadowego inhibitora trypsyny z płuc bydłęcych (BPTI)

Wilusz T., Łomako J., Mejbaum-Katzenellenbogen W. (1973) Acta Biochim. Polon. 20, 25-31.

BPTI (ang. *bovine pancreatic trypsin inhibitor*), znany także pod nazwą aprotynina, występuje w organach bydłęcych: płucach, trzustce i śliniankach przyusznych oraz innych organach i tkankach, szczególnie tych bogatych w komórki tłuszczne. Ponadto wydzielono inhibitory homologiczne do BPTI m.in. z surowicy, siary,

śledzony i przysadki mózgowej przeżuwaczy. Inhibitor ten jest zaliczany do rodziny inhibitorów proteaz serynowych typu Kunitza.

BPTI jest zbudowany z 58 aminokwasów (masa cząsteczkowa – 6 512 Da), jest silnie zasadowy (pI wynosi 10,5) i bardzo odporny na ekstremalne warunki środowiska np. nie traci aktywności w czasie krótkiego gotowania w rozcieńczonych kwasach lub w czasie inkubacji w 2,5% TCA w temp. 80°C. Jest stabilny w wysokim pH, natomiast do inaktywacji dochodzi jedynie w pH o wartości powyżej pI.

BPTI jest kompetycyjnym inhibitorem licznych proteaz serynowych, wśród których najsilniejsze kompleksy tworzy z bydlęcą β -trypsyną ($K_a = 1,2 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$) i bydlęcą α -chymotrypsyną ($K_a = 1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), a także z ludzkimi enzymami: α -plazminą ($K_a = 5,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) i kalikreiną osoczną ($K_a = 5,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Dzięki swoim właściwościom inhibitorowym BPTI znalazł zastosowanie kliniczne. Pod nazwą handlową TRASKOLAN stosowany jest m.in. w ostrym zapaleniu trzustki, w zapaleniu otrzewnej z zagrożeniem perforacji i wstrząsu septycznego, w krwotokach pooperacyjnych.

Zasada metody

Przedstawiona poniżej metoda preparacji BPTI z płuc bydlęcych obejmuje kilka etapów, wśród których kluczowym jest chromatografia powinowactwa na Sepharose 4B z immobilizowaną trypsyną. Na uwagę zasługuje również etap wytrącenia białek balastowych za pomocą TCA. Z uwagi na niewielkie rozmiary cząsteczki i wyjątkową stabilność, BPTI w tych warunkach pozostaje rozpuszczony w supernatancie, nie tracąc swojej aktywności.

W czasie chromatografii powinowactwa wykorzystuje się fakt, iż BPTI jest silnym inhibitorem kompetycyjnym trypsyny i łączy się z tym enzymem w sposób podobny do substratu. Główną powierzchnię kontaktu inhibitora z enzymem tworzy pętla wiążąca proteinazę, zawierająca resztę Lys15 inhibitora idealnie dopasowaną do kieszeni wiążącej substrat w cząsteczce enzymu.

Postępowanie

1. **Ekstrakcja inhibitora.** 100 g zmielonych płuc bydlęcych ekstrahować 300 ml 0,2 M HCl przez godzinę w temp. pokojowej, używając mieszadła mechanicznego. Pod koniec ekstrakcji dodać 20 g NaCl i ekstrahować około 30 minut, ciągle mieszając. Preparat przesączyć przez gazę, tetrę lub gęste sito, po czym wirować 30 minut przy około 5 000 obr./min. Zmierzyć objętość supernatantu, pozostawić 1–2 ml supernatantu do oznaczania białka i aktywności antytrypsynowej. Próbkę zamrozić (PREPARAT 1).
2. **Wysalanie białek siarczanem (VI) amonu.** Białko wyciągu (supernatantu) wysolić siarczanem (VI) amonu przy nasyceniu 0,9. Sól dodawać porcjami w ilości 65 g na 100 ml wyciągu przy stałym mieszaniu. Preparat pozostawić w temp. 4°C przez 2–12 godz. Wysolone białko odwirować w ciągu 20 minut przy około 8 000 obr./min. Osad zawiesić w 30–40 ml wody i ponownie odwirować. Zebrać supernatant, zmierzyć objętość i pozostawić ok. 1–2 ml preparatu do oznaczania białka oraz aktywności antytrypsynowej (PREPARAT 2).
3. **Wytrącanie białek balastowych za pomocą TCA.** Białka balastowe wytrącić, dodając do supernatantu 20% TCA (w/v) do końcowego stężenia 4%. Pozostawić w lodówce na co najmniej godzinę (preparat może być przechowywany w tej postaci kilka dni). Preparat wirować 15 minut przy około 9 000 obr./min. Osad odrzucić, natomiast supernatant doprowadzić do pH 7,5 za pomocą 1 M NaOH. Zmierzyć objętość, oznaczyć białko i aktywność antytrypsynową (PREPARAT 3).
4. **Chromatografia powinowactwa** (zasadę metody omówiono w rozdziale 3.13.4).
 - a. Preparat BPTI nanieść na kolumnę o wymiarach 70 × 20 mm, upakowaną złożem Sepharose 4B z immobilizowaną trypsyną, zrównoważoną 0,05 M buforem Tris-HCl o pH 7,5 (nanoszenie preparatu i przemywanie kolejnymi eluentami przeprowadzić z szybkością przepływu 1–2 ml/min). Eluat uzyskiwany w czasie nanoszenia preparatu zebrać do zlewki i zachować do obliczenia bilansu.
 - b. Po naniesieniu preparatu odmyć kolumnę od niezaadsorbowanego białka (w tym także od nadmiaru inhibitora), przemywając złożę 0,05 M buforem Tris-HCl o pH 7,5, z 0,5 M NaCl, aż do zaniku absorpcji eluatu przy 280 nm ($A_{280} < 0,02$). Eluat połączyć z zebraną wcześniej frakcją nieadsorbującą się. Zmierzyć objętość, oznaczyć białko i aktywność antytrypsynową.
 - c. Kolumnę bardzo dokładnie odmyć wodą w celu usunięcia buforu Tris-HCl i NaCl, sprawdzając obecność jonów chlorkowych w wypływie w reakcji strąceniowej z 0,01 M AgNO_3 .

- d. Białko z kolumny eluować roztworem 0,01 M HCl zawierającym 0,25 M NaCl, zbierając frakcje o objętości 3 ml, których $A_{280} > 0,05$. Frakcje zawierające białko połączyć, zmierzyć objętość, oznaczyć białko i aktywność antytrypsynową (**PREPARAT 4**). Preparat BPTI zliofilizować.
5. **HPLC w układzie odwróconych faz** (zasadę metody omówiono w rozdziale 3.13.5). Liofilizat preparatu BPTI rozpuścić w 3 ml wody i przesączyć przez filtr 0,22 μm . Nastrzyknąć 1 ml preparatu na kolumnę Nucleosil-300 C-18 (10 μm , 150 $\times$ 4,6 mm) zrównoważoną 0,1% TFA. Po 5 minutach nanoszenia preparatu w warunkach początkowych, prowadzić rozdział zaadsorbowanych białek w liniowym gradiencie acetonitrylu (1%/min) w 0,1% TFA. Zebrane próbki wysuszyć w wyparce próżniowej. Następnie próbki rozpuścić w 0,5–1 ml wody i oznaczyć w nich białko oraz aktywność antytrypsynową (**PREPARAT 5**).
6. W preparatach uzyskiwanych na poszczególnych etapach preparacji oznaczyć aktywność antytrypsynową metodą Erlangera (rozdział 4.5.3.) oraz białko (w PREPARATACH 1–3 metodą mikrobiuretową – rozdział 0, w pozostałych mierząc A_{280} i stosując właściwy współczynnik absorpcji dla BPTI wynoszący 0,83).
7. Sporządzić bilans przeprowadzonej preparacji i wypełnić poniższą tabelę, przyjmując za 1 jednostkę antytrypsynową (J) taką ilość inhibitora, która hamuje 1 μg trypsyny.

etap preparacji	objętość preparatu [ml]	aktywność anty-trypsynowa [J/ml]	stężenie białka [mg/ml]	białko całkowite [mg]	aktywność całkowita [J]	aktywność właściwa [J/mg]	wydajność [%]	stopień oczyszczenia
ekstrakcja								
wysalanie siarczanem amonu								
wytrącanie białek balastowych TCA								
chromatografia powinowactwa								
RP-HPLC								

8. Oznaczyć skład aminokwasowy białka z frakcji uzyskanej w RP-HPLC, charakteryzującej się najwyższą aktywnością właściwą (rozdział 3.14.4).

Materiały i odczynniki

- płuca bydłęce
- trypsyna immobilizowana na Sepharose 4B (rozdział 0)
- kolumna Nucleosil-300 C-18 (10 μm , 150 $\times$ 4,6 mm) firmy Knauer
- NaCl
- siarczan (VI) amonu
- 0,2 M HCl
- 0,01 M HCl z 0,25 M NaCl
- 1 M NaOH
- 20% TCA
- 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5
- 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 z 0,5 M NaCl
- 0,01 M AgNO_3

3.13.7. Otrzymywanie rekombinowanego białka w bakteryjnym systemie ekspresyjnym

Zasada metody:

Jedną z metod wydajnego pozyskiwania białek jest ich nadprodukcja w bakteryjnych systemach ekspresyjnych. Do odpowiedniego szczepu bakterii wprowadza się plazmid, w którym, pod kontrolą właściwego promotora, znajduje się sekwencja nukleotydowa DNA kodująca rekombinowane białko. Produkcja białka jest uruchamiana w fazie wzrostu wykładniczego bakterii, przez dodanie induktora np. izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozydu (IPTG). Rekombinowane białka są akumulowane we wnętrzu komórki lub też wydzielane do przestrzeni peryplazmatycznej, bądź bezpośrednio do pożywki.

Postępowanie:

Transformacja bakterii chemicznie kompetentnych metodą szoku cieplnego

1. Przygotować dwie porcje bakterii kompetentnych. Do jednej z nich dodać ok. 100 ng plazmidu i zamieszać. Druga porcja bakterii kompetentnych stanowi kontrolę.
2. Inkubować 30 min na lodzie.
3. Probówki z bakteriami przenieść na 1 min do bloczka grzejnego/łazni wodnej o temperaturze 42°C, a następnie na 2 min do lodu.
4. Do zawiesin bakteryjnych dodać po 750 μ l płynnej pożywki LB i hodować przez ok. 1 h w temperaturze 37°C z wytrząsaniem.
5. Z probówki zawierającej transformowane komórki bakteryjne wysiać 50 μ l hodowli na jedną płytkę z podłożem selekcyjnym. Resztę zawartości probówki i próbę kontrolną zwirować, a osad bakterii zawiesić w niewielkiej ilości pożywki LB i wysiać na dwie kolejne płytki: na jedną płytkę hodowlę transformowaną, a na drugą hodowlę kontrolną. Płytki inkubować w temperaturze 37°C przez noc.

Przygotowanie prehodowli

1. 100 ml pożywki LB (zawierającej odpowiednie antybiotyki) zaszczyć pojedynczą kolonią bakteryjną z płytki i hodować wraz z niezaszczepioną porcją pożywki (kontrola) przez noc w wytrząsarce (200 rpm, 37°C).

Nadprodukcja rekombinowanego białka

1. Do kolby zawierającej 1 l pożywki LB i odpowiednie antybiotyki dodać 10 ml nocnej hodowli.
2. Hodowlę wytrząsać (180 rpm) w temperaturze 37°C, co godzinę sprawdzając gęstość optyczną dopóki $A_{600} = 0,8$.
3. Pobrać 1 ml hodowli do analizy elektroforetycznej, zwirować. Osad zawiesić w buforze do nanoszenia próbek na żel i zamrozić (1*).
4. Do hodowli dodać roztwór IPTG do końcowego stężenia 0,5 mM i kontynuować inkubację z wytrząsaniem w temperaturze 37°C przez ok. 3 h (lub w niższej temperaturze przez noc).
5. Ponownie pobrać 1 ml hodowli do analizy elektroforetycznej, postępując jak wyżej (2*).
6. Zawiesinę bakterii wirować w probówkach wirówkowych o pojemności 0,5 l (5000 rpm, 8 min, 4°C), osad zawiesić w 35 ml buforu A (bufor do nanoszenia na kolumnę chromatograficzną).

Oczyszczanie białka (chromatografia powinowactwa)

1. Zawieszony osad przenieść do szklanej zlewki umieszczonej na lodzie i dezintegrować ultradźwiękami przez ok. 15 min (z przerwami).
2. Otrzymaną zawiesinę wirować w probówkach wirówkowych o pojemności 40 ml (14000 rpm, 30 min, 4°C).
3. Pobrać 20 μ l supernatantu oraz niewielką ilość osadu do analizy elektroforetycznej, dodać buforu do nanoszenia próbek na żel, zamrozić (3*, 4*).
4. Kolumnę chromatograficzną wypełnić odpowiednim złożem zrównoważyć buforem A.
5. Supernatant rozcieńczyć, dodając ok. 200 ml buforu A i nanieść z prędkością przepływu 1 ml/min na kolumnę.
6. W trakcie nanoszenia z frakcji białek niezwiązanych do złoża pobrać próbkę do analizy elektroforetycznej (5*).
7. Po naniesieniu rozcieńczonego supernatantu kolumnę przemyć ok. 100 ml buforu A, zbierając kilka frakcji.
8. Kolumnę przemyć 100 ml buforu B (bufor płuczący), również zbierając kilka frakcji, aż do spadku absorbancji przy 280 nm poniżej 0,1.
9. Z frakcji zebranych podczas przemywania kolumny wybrać te o najwyższej absorbancji przy 280 nm i przygotować z nich próbki do analizy elektroforetycznej (6*, 7*).

10. Następnie kolumnę przemywać buforem C (bufor elucyjny) zbierając cały czas frakcje o objętości ok. 1,5 ml. Połączyć wszystkie frakcje o absorbancji przy 280 nm wyższej od 0,5. Przygotować próbkę do analizy elektroforetycznej zawierającą ok. 10 µg białka (8*).

Wymiana buforu w otrzymanym preparacie białkowym (filtracja żelowa)

Proces filtracji żelowej został szczegółowo omówiony w rozdziale 3.9.8.

1. Kolumnę PD10 ze złożem Sephadex G-25 przemyć wodą, a następnie zrównoważyć odpowiednim buforem.
2. Na kolumnę nanieść roztwór oczyszczonego białka (ok. 1-2 mg).
3. Kolumnę przemywać buforem, zbierając frakcje o objętości 0,5 ml i mierząc ich absorbancję przy 280 nm (ok. 8 frakcji).
4. Zachować frakcję o najwyższej absorpcji do pomiarów spektralnych i przygotować z niej próbkę do analizy elektroforetycznej (9*).

Analiza elektroforetyczna (SDS-PAGE)

Proces rozdzielania białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących został szczegółowo omówiony w rozdziale 3.11.2.

1. Próbkę zawierającą zawieszone osady (1*), (2*) i (*4) sonikować trzykrotnie po 10 s.
2. Wszystkie próbki (1*-9*) umieścić na około 2-5 min we wrzącej łaźni wodnej i nanieść wraz z białkowym wzorcem masy na żel poliakrylamidowy.
3. Prowadzić rozdzielanie elektroforetyczne do momentu aż barwnik z buforu do nanoszenia próbek na żel znajdzie się przy krawędzi płytki (100 V, ok. 1 h)
4. Żel wybarwić przy użyciu błękitu Coomassiego.

Materiały i odczynniki:

- pożywka LB płynna,
- pożywka LB stała,
- roztwory odpowiednich antybiotyków (w zależności od szczepu bakteryjnego oraz plazmidu ekspresyjnego),
- 0,5 M IPTG,
- bufor A – bufor do nanoszenia na kolumnę chromatograficzną,
- bufor B – bufor płuczący,
- bufor C – bufor elucyjny,
- bufor do filtracji żelowej,
- kolumna ze złożem do chromatografii powinowactwa,
- kolumna PD10 ze złożem Sephadex G-25,
- bufor do nanoszenia próbek na żel SDS-PAGE (rozdział 3.11.2.),
- odczynniki do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE (rozdział 3.11.2.).

3.14. ANALIZA SKŁADU AMINOKWASOWEGO BIAŁEK

Analiza składu aminokwasowego jest powszechnie wykorzystywaną metodą identyfikacji i ilościowego oznaczania wolnych aminokwasów pochodzenia biologicznego lub innego oraz użytecznym narzędziem pomocnym w oznaczaniu struktury pierwszorzędowej białek i peptydów.

W przypadku białek i peptydów pierwszym etapem analizy składu aminokwasowego jest hydroliza wiązań peptydowych, dzięki której uzyskujemy mieszaninę wolnych aminokwasów.

3.14.1. Hydroliza wiązań peptydowych

Ze względu na wysoką czułość metod oznaczania składu aminokwasowego (rzędu co najmniej pikomoli) wszystkie odczynniki oraz próbki, w których prowadzona jest hydroliza, powinny być najwyższej jakości. Zanieczyszczenia pochodzące, np. z niedostatecznej czystości próbek, kurzu, talku z rękawiczek, odcisków palców czy dymu papierosowego mogą fałszować oznaczenia, zawyżając poziom Ser czy Gly w porównaniu z faktyczną ilością tych aminokwasów w próbce, a także może być powodem dużej zawartości

amoniaku w próbie. Zanieczyszczenia obecne w analizowanej próbie mogą pochodzić także z resztek składników buforów, soli itp. obecnych w roztworze białka przeznaczonego do hydrolizy. Szczególnie niekorzystna jest obecność związków zawierających azot, np. posiadających grupy aminowe. Aby wykluczyć wpływ zanieczyszczeń na poziom oznaczanych aminokwasów, poza zastosowaniem najwyższych środków ostrożności przy sporządzaniu prób, używa się probówek wykonanych z wysokiej jakości szkła o niskiej rozszerzalności cieplnej (Pyrex), dodatkowo przemycając je stężonymi roztworami kwasów i następnie susząc lub poddając pirolizie w temp. 500°C w ciągu kilku godzin.

Hydrolizę wiązań peptydowych można wykonać chemicznie, używając stężonych kwasów lub zasad, albo enzymatycznie.

Hydrolizę kwasową przeprowadza się zwykle w stężonym roztworze HCl, H₂SO₄ lub mieszaninie HCl/HCOOH (88–90%) w stosunku 1:1. Standardowo hydrolizę kwasową prowadzi się w 6 M HCl (o stałej temp. wrzenia) z 0,1% fenolem w temp. 110°C w czasie 24 godz. Po zakończeniu hydrolizy próbki odparowuje się.

Stosuje się dwie strategie prowadzenia hydrolizy:

- w roztworze: białko rozpuszcza się w w/w roztworze kwasu solnego, a następnie probówkę odpowietrza się, zatapia i inkubuje w warunkach opisanych powyżej.
- w parach HCl, wykorzystując np. hydrolizator białkowy, gdzie roztwór HCl umieszczany jest w szczelnie zamkniętym naczyniu zawierającym próbki białka w otwartych probówkach, które następnie jest odpowietrzane i podgrzewane, w wyniku czego wysycha się parami HCl.

Zastosowanie drugiego sposobu hydrolizy jest korzystniejsze, ponieważ zmniejsza się udział ewentualnych zanieczyszczeń w próbie. W czasie hydrolizy kwasowej dochodzi do deaminacji Asn i Gln (odpowiednio powstają Asp i Glu), całkowitemu rozkładowi ulega Trp, częściowo Ser i Thr oraz Cys, ponadto hydroliza wiązań peptydowych tworzonych przez Val, Ile czy Leu (np. Val–Leu, Ile–Ile, Ile–Val itp.) może zachodzić z mniejszą wydajnością. Aby zapobiec utlenianiu reszt aminokwasowych (np. Met) w czasie hydrolizy białka, hydrolizę przeprowadza się w próżni. Wymienionym powyżej modyfikacjom można zapobiegać dodając do kwasu solnego odpowiednich odczynników np. dodatek fenolu zapobiega fluorowcowaniu tyrozyny, a rozkładowi tryptofanu można zapobiec prowadząc hydrolizę w obecności kwasu tioglikolowego. Aby zwiększyć wydajność hydrolizy wiązań tworzonych przez Val, Ile i Leu wydłuża się czas hydrolizy do 48 czy 72 godz.

Kolejnym rodzajem hydrolizy, wykorzystywanym w uzupełnieniu do hydrolizy kwasowej jest **hydroliza zasadowa** (alkaliczna). Przeprowadza się ją najczęściej w obecności: NaOH, KOH lub Ba(OH)₂. Ten rodzaj hydrolizy powoduje racemizację oraz całkowitą lub częściową destrukcję wielu aminokwasów m.in. Arg, Cys, Thr, Ser oraz deaminację innych. Zaletą hydrolizy zasadowej jest możliwość oznaczenia tryptofanu. Standardowo hydrolizę alkaliczną prowadzi się w obecności 2–4 M NaOH w temp. 100°C w czasie 4–8 godz.

W **hydrolizie enzymatycznej** wykorzystuje się różnego typu enzymy proteolityczne (np. subtilizyna, pronaza). Jej wadami są trudności w znalezieniu enzymu o szerokiej specyficzności, dzięki której byłaby możliwa całkowita hydroliza analizowanego białka, zanieczyszczenia aminokwasowe, będące wynikiem autodegradacji stosowanego enzymu oraz czas trwania hydrolizy (kilka dni).

3.14.2. Derywatyzacja aminokwasów

Bezpośrednia detekcja i oznaczenie ilościowe aminokwasów są trudne, dlatego też przeprowadza się ich derywatyzację, czyli chemiczną modyfikację (głównie grup aminowych), dzięki której uzyskuje się pochodne charakteryzujące się niskim progiem detekcji, które – w zależności od ich rodzaju – można oznaczać mierząc fluorescencję albo absorbancję światła w zakresie widzialnym (analiza kolorymetryczna) lub UV. Derywatyzacja może być przeprowadzana przed rozdzieleniem chromatograficznym hydrolizatu białka (derywatyzacja przedkolumnowa) lub po rozdzieleniu chromatograficznym (derywatyzacja pokolumnowa). Poniżej przedstawiono najczęściej stosowane sposoby derywatyzacji aminokwasów.

3.14.2.1. Metoda ninhydrynowa

Reakcja aminokwasów z ninhydryną jest często wykorzystywaną modyfikacją pokolumnową, czyli taką, która jest wykonywana po wcześniejszym chromatograficznym rozdziale aminokwasów. Przebieg reakcji szczegółowo przedstawiono w rozdziale 2.6.1.

Produkty reakcji aminokwasów z ninhydryną monitoruje się przy 570 nm (wszystkie aminokwasy z wyjątkiem proliny tworzą pochodne o zabarwieniu fioletowoniebieskim) oraz przy 440 nm (dla pochodnej proliny).

Próg detekcji dla większości aminokwasów wynosi 10 pmoli, dla proliny – 50 pmoli.

3.14.2.2. Modyfikacja chemiczna z wykorzystaniem aldehydu o-ftalowego

Aldehyd o-ftalowy (OPA) reaguje z pierwszorzędowymi grupami aminowymi w obecności związków tiolowych (N-acetylo-L-cysteina, 2-merkaptotetanol), tworząc wysoce fluoryzujące pochodne izoindolowe (rozdział 2.6.3, Rys. 2.11). Prolina (iminokwas) reaguje z OPA po utlenieniu np. podchlorynem sodu. Fluorescencję uzyskanych pochodnych monitoruje się przy 450 nm po wzbudzeniu przy 348 nm.

Próg detekcji dla aminokwasów derywatyzowanych OPA wynosi kilkadziesiąt pikomoli.

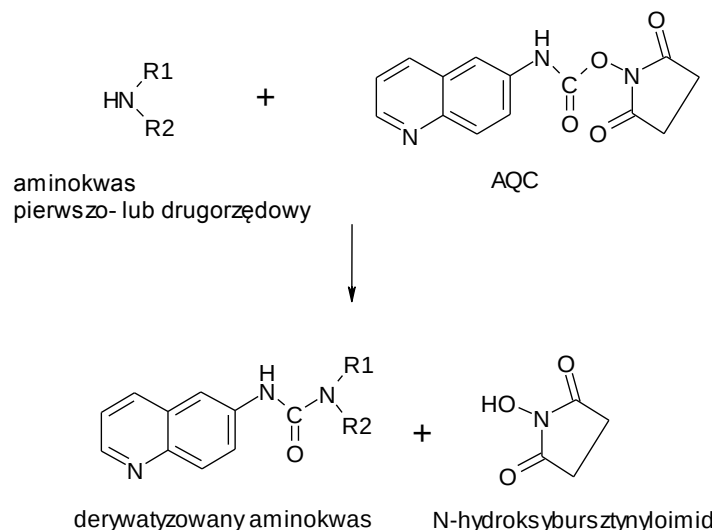
Metoda ta jest najczęściej wykorzystywana do derywatyzacji pokolumnowej; możliwa jest również derywatyzacja przedkolumnowa z wykorzystaniem OPA.

3.14.2.3. Metoda AccQ•Tag

Cohen S.A., Michaud D.P. (1993) Anal. Biochem. 211, 279–287.

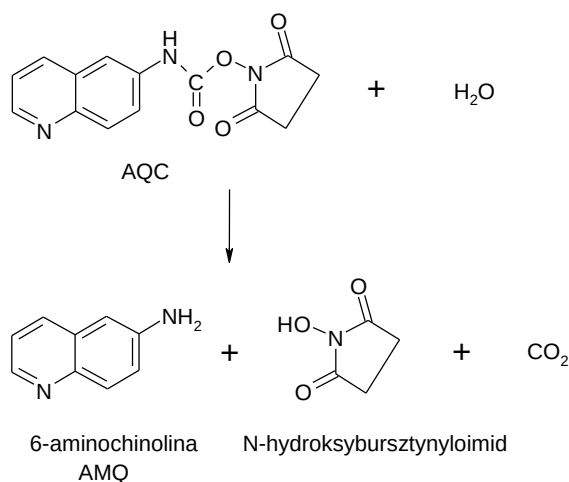
Metoda AccQ•Tag jest wykorzystywana do derywatyzacji przedkolumnowej i opiera się na reakcji w środowisku zasadowym (bufor boranowy) pierwszo- i drugorzędowych grup aminowych i karbaminianu 6-aminochinolino-N-hydroksybursztynioimidu (AQC), w wyniku czego powstają wysoce stabilne (tydzień w temp. pokojowej) pochodne mocznikowe aminokwasów (Rys. 3.19), fluoryzujące przy 395 nm po wzbudzeniu przy 250 nm. Dla wszystkich aminokwasów derywatyzacja przebiega w ciągu minuty w temp. pokojowej; żeby uzyskać odpowiednią pochodną tyrozyny, próbkę dodatkowo inkubuje się w temp. 55°C przez 10 minut.

Próg detekcji dla aminokwasów derywatyzowanych tą metodą wynosi 40–320 femtomoli, z wyjątkiem cysteiny – 800 femtomoli. Pochodne aminokwasów można również monitorować mierząc ich absorbancję przy 254 nm, jednak ten typ detekcji jest 10–100 razy mniej czuły niż fluorescencja.



Rys. 3.19 Modyfikacja aminokwasów metodą AccQ•Tag

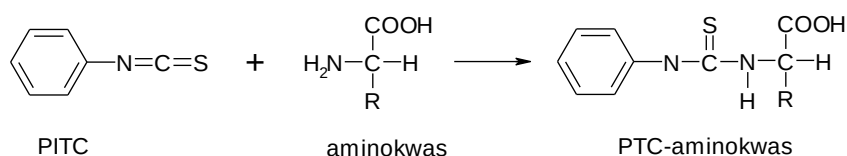
W czasie derywatywacji nadmiar reagentu hydroлізуje do 6-aminochinoliny (AMQ), N-hydroksybursztynyloimid i dwutlenku węgla (Rys. 3.20).



Rys. 3.20 Hydroliza AQC

3.14.2.4. Przedkolumnowa derywatywacja z wykorzystaniem fenyloizotiocyanianu

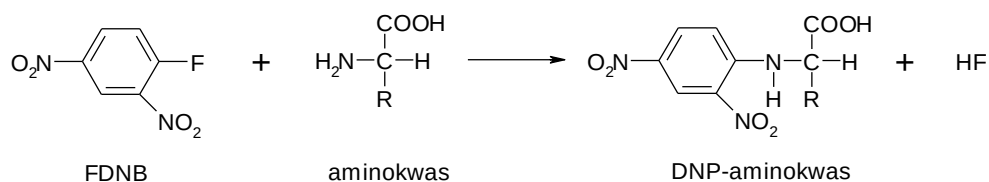
Fenyloizotiocyanian (PITC) reaguje z grupami aminowymi tworząc pochodne fenylotiokarbamoilowe – PTC-aminokwasy (Rys. 3.21), które można monitorować mierząc absorbancję przy 245 nm. Metoda znakowania aminokwasów przy pomocy PITC jest wykorzystywana także w degradacji Edmana. Próg detekcji dla większości aminokwasów zmodyfikowanych tą metodą wynosi 1 pmol.



Rys. 3.21 Modyfikacja aminokwasów z wykorzystaniem fenyloizotiocyanianu (PITC)

3.14.2.5. Metoda dinitrofenylowania

FDNB (1-fluoro-2,4-dinitrobenzen) reaguje w środowisku zasadowym z grupami aminowymi (a także z grupami –SH cysteiny, –OH tyrozyny i pierścieniem imidazolowym histydyny), tworząc dinitrofenylowe pochodne aminokwasów – DNP-aminokwasy (Rys. 3.22) o żółtej barwie, które można monitorować spektrofotometrycznie przy 435 nm. Próg detekcji aminokwasów derywatyzowanych tą metodą wynosi 10–100 nmoli.

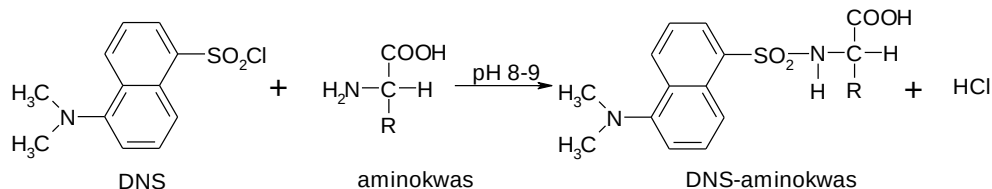


Rys. 3.22 Modyfikacja aminokwasów z wykorzystaniem 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenu (FDNB)

3.14.2.6. Metoda dansylowania

Chlorek dansylu (DNS – chlorek 1-dimetylamino-naftyleno-5-sulfonylu) reaguje z grupami aminowymi tworząc pochodne dansylowe – DNS-aminokwasy (Rys. 3.23), charakteryzujące się silną fluorescencją przy 470 nm po wzbudzeniu przy 330 nm. Pochodne dansylowe aminokwasów można także monitorować mierząc ich absorbancję przy 254 nm.

Próg detekcji aminokwasów derywatyzowanych tą metodą wynosi 0,1–1 nmoli.



Rys. 3.23 Modyfikacja chemiczna z wykorzystaniem chlorku dansylu (DNS)

3.14.3. Identyfikacja i ilościowe oznaczanie aminokwasów w hydrolizacie

Integralną częścią analizy składów aminokwasowych jest rozdział aminokwasów obecnych w hydrolizacie różnymi metodami chromatograficznymi. Najczęściej wykorzystuje się chromatografię jonowymienną (na kolumnie wypełnionej np. sulfonowaną żywicą polistyrenową – Dowex-50) lub HPLC w układzie odwróconych faz (złoża z wysięgnikami C-18).

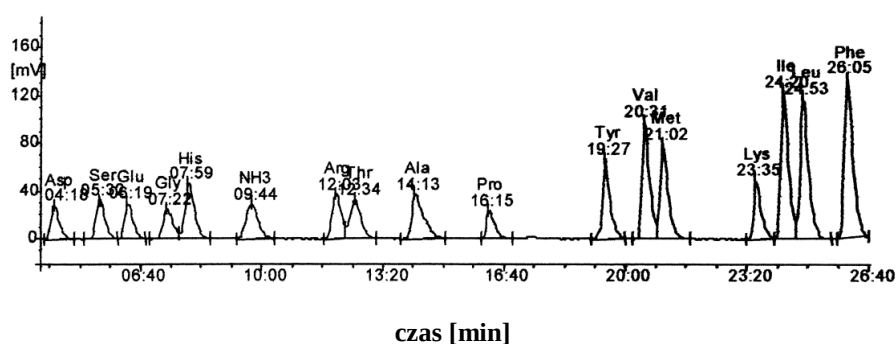
W identyfikacji i ilościowym oznaczeniu aminokwasów w badanej próbce pomocny jest chromatograficzny rozdział standardu aminokwasów (wykonany w takich samych warunkach jak rozdział hydrolizatu), zawierającego mieszaninę aminokwasów o znanym składzie i stężeniu. Po zakończeniu rozdziału chromatograficznego analizowanej próbki przeprowadzamy integrację chromatogramu, dzięki czemu wyznaczamy czasy retencji poszczególnych aminokwasów oraz pola powierzchni pod szczytami chromatograficznymi. Poszczególne aminokwasy identyfikujemy przez porównanie czasów retencji szczytów chromatograficznych badanej próbki z czasami retencji aminokwasów obecnych w standardzie. Chcąc zidentyfikować obecny w próbce aminokwas niestandardowy (np. aminokwas fosforylowany, hydroksyaminokwas) lub chemicznie zmodyfikowany (np. cysteina utleniona do kwasu cysteinowego), musimy dołączyć go do zestawu aminokwasów obecnych w standardzie i tak dobrać warunki rozdziału chromatograficznego, żeby szczyt chromatograficzny, w którym wpływa ten aminokwas, był dobrze oddzielony od pozostałych szczytów.

Ilość poszczególnych aminokwasów w badanej próbce możemy obliczyć z proporcji, znając ilość danego aminokwasu w standardzie i odpowiadające mu pole powierzchni pod szczytem oraz pola powierzchni pod szczytami aminokwasów analizowanych.

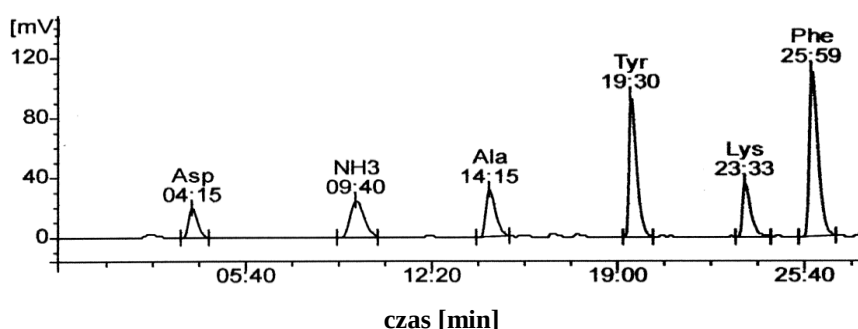
Przykład

Peptyd o nieznannej sekwencji i składzie aminokwasowym poddano hydrolizie kwasowej. Uzyskany hydrolizat, po derywatyzacji metodą AccQ•Tag, poddano rozdzielowi chromatograficznemu. W analogicznych warunkach przeprowadzono rozdział standardu aminokwasowego.

standard aminokwasów



analizowana próbka



Obydwa chromatogramy poddano integracji, dzięki czemu oznaczono czasy retencji, wysokość i pola powierzchni szczytów chromatograficznych, odpowiadających aminokwasom. Porównując czasy retencji szczytów pochodzących od aminokwasów obecnych w standardzie i analizowanym peptydzie, zidentyfikowano poszczególne aminokwasy w hydrolizacie (szczyt o czasie retencji 9 minut i 40 sekund odpowiada amoniakowi; nie uwzględniono go w tabeli).

STANDARD AMINOKWASÓW				
aminokwas	czas retencji [min:s]	wysokość szczytu [mV]	pole szczytu [mVs]	ilość pmoli
Asp/Asn	04:18	29,089	490,914	100
Ser	05:32	33,641	597,226	100
Glu/Gln	06:19	30,727	518,072	100
Gly	07:22	26,335	521,187	100
His	07:59	46,944	888,181	100
Arg	12:03	38,619	706,279	100
Thr	12:34	33,629	715,573	100
Ala	14:13	38,421	883,150	100
Pro	16:15	24,478	423,361	100
Tyr	19:27	68,049	935,609	100
Val	20:31	99,079	1447,704	100
Met	21:02	80,511	1254,334	100

ANALIZOWANA PRÓBKA			
aminokwas	czas retencji [min:s]	wysokość szczytu [mV]	pole szczytu [mVs]
Asp/Asn	0:04:15	20,296	459,550
Ala	0:14:15	31,607	763,443
Tyr	0:19:30	95,313	1727,215

Lys	23:35	50,655	731,009	100
Ile	24:20	123,279	1850,396	100
Leu	24:53	117,695	1903,620	100
Phe	26:05	135,162	2274,319	100

Lys	0:23:33	36,850	723,428
Phe	0:25:59	111,569	2366,478

Następnie z odpowiedniej proporcji, uwzględniającej pola szczytów, wyliczano ilość poszczególnych aminokwasów obecnych w analizowanej próbce:

Obliczenie ilości pmoli Asn/Asp

dla standardu: 490,914 mVs – 100 pmoli

dla oznaczanej próbki: 459,550 mVs – ×

× = 93,61 pmoli

mVs – pole powierzchni pod szczytem

Postępujemy analogicznie dla kolejnych aminokwasów i uzyskujemy ilości poszczególnych aminokwasów w analizowanej próbce.

aminokwas	czas retencji [min:s]	wysokość szczytu [mV]	pole szczytu [mVs]	ilość pmoli	ilość reszt
Asp/Asn	0:04:15	20,296	459,550	93,61	0,99
Ala	0:14:15	31,607	763,443	81,60	0,86
Tyr	0:19:30	95,313	1727,215	184,61	1,95
Lys	0:23:33	36,850	723,428	98,96	1,05
Phe	0:25:59	111,569	2366,478	104,05	1,10

Aby obliczyć minimalną ilość reszt poszczególnych aminokwasów w peptydzie, ilość pmoli każdego z aminokwasów dzielimy przez najmniejszy możliwy dzielnik, tak aby uzyskać całkowitą (lub zbliżoną do całkowitej) ilość reszt aminokwasów. W praktyce jest to ilość pmoli aminokwasu występującego w najmniejszej ilości (w przypadku kilku zbliżonych wartości, dzielimy przez ich średnią arytmetyczną) – w analizowanym przykładzie średnia wartość arytmetyczna dla Asp/Asn, Ala, Lys i Phe wynosi – 94,56 pmoli.

Uzyskane ilości reszt aminokwasów zaokrąglamy do najbliższej wartości całkowitej, wnioskując, że analizowany peptyd składa się z:

- 1 reszty Asp/Asn (ponieważ peptyd przed analizą został poddany hydrolizie kwasowej, reszty Asn, jeśli były obecne w peptydzie, uległy deaminacji i oznaczamy je jako Asp, zatem w skład peptydu wchodzi 1 reszta Asp lub 1 reszta Asn)
- 1 reszty alaniny
- 2 reszt tyrozyny
- 1 reszty lizyny
- 1 reszty fenyloalaniny

Analizowany peptyd może się składać z wymienionej powyżej ilości reszt aminokwasowych lub jej wielokrotności. W rozstrzygnięciu, który wariant odpowiada rzeczywistości, pomocna jest znajomość masy cząsteczkowej peptydu.

3.14.4. Analiza składu aminokwasowego BPTI metodą AccQ•Tag

Cohen, S.A., Michaud, D.P. (1993) Anal. Biochem. 211, 279–287.

Waters AccQ•Tag chemistry package. Instruction manual. Broszura informacyjna firmy Waters, 1993.

Zagadnienie kwasowej hydrolizy białek szczegółowo omówiono w rozdziale 0., derywatyzację aminokwasów obecnych w hydrolizacie w rozdziale 0., natomiast sposób obliczania składu aminokwasowego białka w rozdziale 0.

Postępowanie

1. **Hydroliza kwasowa.** Spośród próbek zebranych w czasie rozdziału w odwróconych fazach HPLC wybrać próbkę o najwyższej aktywności właściwej i odpipetować do probówki do hydrolizy taką ilość roztworu, która zawiera 2–3 µg białka. Odparować w wyparce próżniowej. Próbkę hydrolizować 22 godz. w temp. 110°C w hydrolizatorze białkowym w parach 6 M HCl w obecności 0,1% fenolu.
2. **Derywatyizacja próbek.** Hydrolizat rozpuścić w 20 µl 20 mM HCl, dodać 60 µl buforu boranowego i 20 µl karbaminianu 6-aminochinolino-N-hydroksybursztynilimidu (AQC) w acetonitrylu. Po dodaniu każdego z roztworów próbkę dokładnie wymieszać, następnie po 1 minucie umieścić w bloku grzejmym w temp. 55°C i prowadzić derywatyzację kolejne 10 minut.
3. **Derywatyizacja standardu aminokwasów.** Do 10 µl roztworu zawierającego 1 nmol każdego z aminokwasów dodać 70 µl buforu boranowego i 20 µl AQC w acetonitrylu, po dodaniu każdego z roztworów próbkę dokładnie wymieszać, następnie po 1 min umieścić w bloku grzejmym w temp. 55°C i prowadzić derywatyzację kolejne 10 minut.
4. **Rozdział chromatograficzny.** Rozdział zderywatyzowanych aminokwasów przeprowadzić w HPLC w odwróconym układzie faz na kolumnie AccQ•Tag C-18 (4 µm, 150 × 3,9 mm) w temp. 37°C w warunkach podanych w tabeli zamieszczonej poniżej. W celu dokładnego zrównoważenia kolumny i ustalenia warunków rozdziału przed właściwym rozdziałem aminokwasów należy przeprowadzić chromatografię w takich samych warunkach jak właściwy rozdział, ale bez nanoszenia próbki (tzw. „pusty gradient”).

czas [min]	przepływ [ml/min]	Eluent A [%]	woda [%]	acetonitryl [%]	gradient
początkowy	1,00	100	0	0	*
0,50	1,00	98	0	2	11 (skokowy)
18,00	1,00	95	0	5	6 (liniowy)
19,00	1,00	91	0	9	6 (liniowy)
29,50	1,00	83	0	17	6 (liniowy)
33,00	1,00	0	40	60	11 (skokowy)
36,00	1,00	100	0	0	11 (skokowy)

W pierwszej kolejności przeprowadzić rozdział zderywatyzowanego standardu aminokwasów w ilości 100–250 pmoli każdego aminokwasu (10–25 µl mieszaniny derywatyzacyjnej), a następnie BPTI (10–15 µl zderywatyzowanej próbki). W czasie rozdziału monitorować fluorescencję eluatu przy 395 nm, po wzbudzeniu światłem o długości fali $\lambda = 250$ nm.

5. W oparciu o rozdział standardu aminokwasów zidentyfikować i policzyć ilość poszczególnych aminokwasów w próbce BPTI (patrz przykład z rozdziału 0.).

Materiały i odczynniki

- preparat BPTI uzyskany w doświadczeniu 0.
- standard zawierający mieszaninę aminokwasów o stężeniu 0,1 mM (z wyjątkiem cystyny – 0,05 mM) firmy Pierce
- 6 M HCl o stałej temp. wrzenia
- fenol
- acetonitryl

- zestaw do derywatyzacji aminokwasów zawierający karbaminian 6-aminochinolino-N-hydroksybursztynyloimidu, bufor boranowy, AccQ•Tag Eluent A wraz z kolumną AccQ•Tag C-18 (4 μ m, 150 $\times$ 3,9 mm) firmy Waters
- hydrolizator białkowy firmy Knauer
- analityczny chromatograf cieczowy 600E
- skaningowy detektor fluorescencyjny model 470 firmy Waters

W opracowaniu rozdziału Białka korzystano z następujących źródeł:

- Affinity chromatography. Principles and methods.* Broszura firmy Amersham Pharmacia Biotech. Uppsala, Szwecja.
- Bednarski W., Reps A. *Biotechnologia żywności*. Praca zbiorowa. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001.
- Bickerstaff G.F. (red.) *Immobilization of enzymes and cells*. Methods Biotechnol. Humana Press Totowa, New Jersey 1997.
- Goldstein I.J., Hughes R.C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N. (1980) *What should be called a lectin?* Nature 285, 66-67.
- Jakubke H-D., Jeschkeit H. *Aminokwasy, peptydy, białka*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1989.
- Lawrence A.M, Besir H. (2009) Staining of proteins in gels with Coomassie G250 without organic solvent and acetic acid. J Vis Exp 30, doi: 10.3791/1350
- Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J. (red.) *The lectins*. Academic Press, New York 1986.
- Kączkowski J. *Biochemia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992.
- Kłyszczko-Stefanowicz L. *Ćwiczenia z biochemii*. Praca zbiorowa. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2003.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W. *Ćwiczenia z biochemii dla biologów*. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1992.
- Minakowski W. *Biochemia kręgowców*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1990.
- Muronetz V.I., Sholukh M., Korpela T. (2001) *Use of protein-protein interactions in affinity chromatography*. J. Biochem. Biophys. Methods 49, 29-47.
- Schägger H., von Jagow G. (1987) *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal. Biochem. 166; 368-379
- Schägger H. (2006) *Tricine-SDS-PAGE* Nat. Protoc. 1, 16-22
- Sharon N., Lis H. *Lectins*. Capman & Hall, London New York 1989.
- Stryer L. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- Świeżewska E. (1996) *Prenylacja i acylacja białek*. Materiały XXXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Kraków, 161.
- Voet D., Voet J.G. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York 1990.
- Witkiewicz, Z. *Podstawy chromatografii*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.
- Zgirski A., Gondko R. *Obliczenia biochemiczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
- Strona internetowa *International Union of Pure and Applied Chemistry*: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>