

12. WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNE BIAŁEK

1. Oznaczanie punktu izoelektrycznego białka

Zasada:

Oznaczenie opiera się na najniższej rozpuszczalności białek, w tym analizowanej kazeiny, w środowisku o wartości pH równej pI. Do zestawu roztworów buforowych o różnych wartościach pH wprowadza się jednakową ilość kazeiny i obserwuje powstający osad. Wartość pH roztworu buforowego, w którym wystąpi najobfitszy osad, odpowiada pI kazeiny.

Wykonanie:

- Przygotować 10 suchych probówek (wysokich), opisać je numerami od 1 do 10, po czym wprowadzić do: probówki nr jeden 5,5 ml wody, a do pozostałych po 5,0 ml wody.
- Następnie do probówki nr 1 dodać 4,5 ml 1 M roztworu CH_3COOH i wymieszać.
- Z probówki nr 1 pobrać 5 ml roztworu, który przenieść do probówki nr 2 i wymieszać.
- Z probówki nr 2 pobrać 5 ml roztworu, który przenieść do probówki nr 3 i wymieszać.
- Rozcieńczanie kontynuować aż do probówki nr 10, z której na koniec pobrać 5 ml roztworu, który należy wylać (np. do zlewu).
- Do wszystkich przygotowanych probówek z 5 ml roztworu kwasu octowego wprowadzić po 1 ml 0,5% roztworu kazeiny w roztworze 0,1 M CH_3COONa i wymieszać.
- Obejrzyć sporządzone roztwory kazeiny, zanotować zaobserwowane zmiany, oceniając stopień zmętnienia odpowiednią liczbą (+), a brak zmętnienia (-).
- Następnie odstawić na 20 minut w temperaturze pokojowej, po czym obejrzeć, ocenić i zanotować zaobserwowane zmiany stopnia zmętnienia, jak wyżej. Porównać wyniki.

- Obliczyć pH roztworu buforowego w każdej probówce i określić pI analizowanego białka kazeiny.

2. Wysalanie białek

Zasada:

Wysalaniem białek nazywamy proces wytrącenia z roztworu białek rozpuszczalnych w wodzie przez wysokie stężenie soli. Stosuje się w tym celu sole, których jony łatwo tworzą wodziany. Zjawisku wysalania sprzyjają te aniony, które tworzą wiązania wodorowe lub mają dużą elektroujemność. Elektroliity wielowartościowe działają silniej od jednowartościowych. Sole wiążące wodę pozbawiają białka płaszczą wodnego, sprzyjając ich asocjacji w większe agregaty o zmniejszonej rozpuszczalności, które wypadają z roztworu. Stężenie soli potrzebne do wysalania białek zależy od ich właściwości oraz pH środowiska. Najłatwiej wysolić białko w jego punkcie izoelektrycznym, ponieważ cząsteczki na zewnątrz obojętne łatwo asocjują w większe agregaty wypadające z roztworu. Do wysalania najczęściej stosuje się $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , MgSO_4 . Wysalanie białek jest procesem odwracalnym, usunięcie soli, np. przez dializę, sprawia, że wytrącone białko ponownie rozpuszcza się i wykazuje swe biologiczne właściwości. Wysalanie stosuje się do wstępnego frakcjonowania białek, również osocza. Z osocza wytrąca się fibrynogen przy 25% nasyceniu siarczanem amonu, większość globulin osocza wytrąca się przy 50% nasyceniu siarczanem amonu, natomiast albuminy i dobrze rozpuszczalne globuliny wysalane są dopiero przy 80% nasyceniu siarczanem amonu.

Wykonanie:

- Do 2 probówek odmierzyć po 2,1 ml osocza 5-krotnie rozcieńczonego płynem fizjologicznym, po czym dodać:
 - do 1 probówki 0,7 ml nasyconego roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (końcowe nasycenie = 25%);
 - do 2 probówki 2,1 ml nasyconego roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (końcowe nasycenie = 50%).
- Zawartość probówek wymieszać. Porównać optycznie ilość wytrąconego białka w obu probówkach. Osad odwirować przy 3000 obr./min przez 10 minut. Pamiętać o naprzeciwległym wstawieniu probówek do gilz rotora wirówki, aby zrównoważyć probówki! Zdekantować nadsącz. Do osadu białek dodawać wody destylowanej, aż do rozpuszczenia osadu. Zinterpretować uzyskane wyniki.

Denaturacja białek

Zasada:

Denaturacja polega na zniszczeniu (w różnym stopniu) struktury drugo-, trzecio- lub czwartorzędowej białka, czyli natywnej konformacji, czego konsekwencją jest utrata specyficznych biologicznych aktywności białek. Denaturacja białek zachodzi pod wpływem różnych czynników, zarówno chemicznych jak i fizycznych. Zjawisko to pojawia się pod wpływem wysokiej temperatury, mocnych kwasów lub zasad nieorganicznych, niektórych kwasów organicznych, rozpuszczalników organicznych, takich jak: alkohol lub aceton w temperaturze pokojowej i wyższej oraz kationów metali ciężkich. W zależności od intensywności działania tych czynników (w tym czasu oddziaływania), wielkość zmian denaturacyjnych może się różnić – od minimalnych do całkowitego zniszczenia oddziaływań stabilizujących konformację białka. Z drugiej strony, jedne białka są bardziej wrażliwe na czynniki denaturujące (np. lipoproteiny), inne są stosunkowo stabilne (np. albuminy).

Uwaga! Wytrącanie białka nie zawsze jest objawem denaturacji, należy rozważyć, kiedy nie jest i dlaczego.

3. Wpływ alkoholu na białka

Wykonanie:

- Przygotować 2 probówki, jedną umieścić w lodzie, drugą pozostawić w temperaturze pokojowej.
- Do obu probówek odmierzyć po 1 ml surowicy rozcieńczonej 5-krotnie płynem fizjologicznym i inkubować przez 5 min.
- Następnie do próby znajdującej się w lodzie wprowadzić 2 ml schłodzonego alkoholu etylowego, a do drugiej tę samą objętość etanolu o temperaturze pokojowej.
- Obie próby odwirować w wirówce przy 3000 obr./min przez 5 min. Pamiętać o naprzeciwległym wstawieniu probówek do gilz rotora wirówki, aby zrównoważyć probówki!
- Po odwirowaniu supernatanty zdekantować, wylewając je do zlewu. Do osuszonych osadów wprowadzić po 4 ml soli fizjologicznej. Obie próby dokładnie wymieszać bagietką, obserwując i porównując rozpuszczanie osadów. Zinterpretować uzyskane wyniki.

4. Wpływ temperatury na białka

Wykonanie:

- Przygotować 3 probówki (czyste i suche).
- Do 1 probówki odmierzyć 1 ml surowicy rozcieńczonej 5-krotnie płynem fizjologicznym, do 2 i 3 probówki – po 1 ml mleka.
- Następnie dodać do: 1 i 2 probówki po 1 kropli 1% kwasu octowego (wyjaśnić dlaczego?). Wszystkie próby ogrzać w łaźni wodnej do wrzenia. Obejrzyć analizowane próby, porównując próbę 2 z 3. Zinterpretować uzyskane wyniki.
- Do 1 próby, w której pojawił się biały kłaczkowaty osad białka, dodać niewielką ilość NaCl *in subst.* Osad staje się wyraźniejszy (wyjaśnić dlaczego?).
- Próby 1 i 2 odwirować w wirówce przy 3000 obr./min przez 5 min. Po odwirowaniu supernatanty zdekantować, wylewając je do zlewu. Do osuszonych osadów wprowadzić po 4 ml soli fizjologicznej. Obie próby dokładnie wymieszać bagietką, obserwując i porównując rozpuszczanie osadów. Zinterpretować uzyskane wyniki.

5. Wpływ stężonego HNO₃ na białka (odczyn Hellera)

Wykonanie:

Do probówki odmierzyć 1 ml stężonego HNO₃, po czym nawarstwić ostrożnie 1 ml surowicy rozcieńczonej 5-krotnie płynem fizjologicznym (postarać się, aby surowica powoli spływała po ściance probówki, lekko przechylonej). Na granicy zetknięcia się roztworów powstaje biały pierścień zdenaturowanego i wytrąconego białka.

6. Wpływ NaOH na białka

Wykonanie:

Do probówki odmierzyć 1 ml surowicy pełnej (nierozcieńczonej), następnie dodać 0,5 ml 2 M NaOH i wymieszać. Obejrzyć analizowaną próbę. Następnie dodawać kroplami 5% CH₃COOH, mieszać, wstrząsając probówkę, po każdej dodanej kropli. Krople dodawać, aż do momentu pojawienia się delikatnego osadu. Zinterpretować zaobserwowany wynik doświadczenia w analizowanym środowisku.

7. Wpływ kationów metali ciężkich na białka

Zasada:

- Białka w środowisku o wartości pH wyższej od pI obdarzone są ładunkiem ujemnym i mogą reagować z kationami. Kationy metali ciężkich (Fe^{+2} , Fe^{+3} , Hg^{+2} , Pb^{+2}) tworzą z białkami nierozpuszczalne kompleksy, które wytrącają się z roztworu. Działanie denaturujące metali ciężkich może być także konsekwencją ich reakcji z grupami $-\text{SH}$ i zrywania wiązań disiarczkowych. Dzięki temu, że białka z kationami metali ciężkich mogą tworzyć trudno rozpuszczalne sole, które wytrącają się z roztworu, niekiedy białka są stosowane jako odtrutki przy zatruciu metalami ciężkimi.

Wykonanie:

- Przygotować 3 probówki, do których odmierzyć po 2 ml surowicy rozcieńczonej 5-krotnie 0,1 M buforem Tris-HCl, pH 8,5. Następnie do pierwszej dodać kilka kropli 2% roztworu FeCl_2 , do drugiej dodać kilka kropli 2% roztworu $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, do trzeciej dodać kilka kropli 2% roztworu HgCl_2 .
- Próby wymieszać i zaobserwować wytrącone kompleksy.

8. Wpływ anionów na białka

Zasada:

W środowisku o wartości pH niższej od pI białka, dysocjacja grup karboksylowych jest cofnięta, dlatego eliminowane są oddziaływania jonowe, w których uczestniczyła zjonizowana grupa karboksylowa. Białka obdarzone są w tych warunkach ładunkiem dodatnim i z niektórymi kwasami organicznymi tworzą nierozpuszczalne połączenia.

Wykonanie:

- Przygotować 3 probówki, do których odmierzyć po 2 ml surowicy rozcieńczonej 5-krotnie solą fizjologiczną.
- Do pierwszej dodać 2 ml 10% roztworu kwasu trójchlorooctowego, do drugiej dodać 0,5 ml 20% roztworu kwasu sulfosalicylowego; do trzeciej dodać 0,5 ml 30% roztworu kwasu fosforowolframowego. Zaobserwować wytrącone kompleksy.

ODCZYNNIKI

Osocze, surowica wołowa; osocze i surowica rozcieńczona 5-krotnie płynem fizjologicznym; surowica rozcieńczona 5-krotnie 0,1 M buforem Tris-HCl pH 8,5; 1 M CH₃COOH; 0,5% roztwór kazeiny w 0,1 M CH₃COONa; nasycony roztwór (NH₄)₂SO₄; lód; etanol; płyn fizjologiczny; mleko; 1% kwas octowy; NaCl *in subst.*; HNO₃ stężony; 2 M NaOH; 5% CH₃COOH; 2% roztwór FeCl₂; 2% roztwór Pb(CH₃COO)₂; 2% roztwór HgCl₂; 10% roztwór kwasu trójchlorooctowego (TCA); 20% roztwór kwasu sulfosalicylowego; 30% roztwór kwasu fosforowolframowego.

NOTATKI