

Przygotowanie próbek biologicznych do analizy.

Badanie preparatów farmaceutycznych oraz tkanek i płynów fizjologicznych, laboratorium

Deproteinizacja jako niezbędny etap przygotowania próbek biologicznych

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

Przygotowały dr Katarzyna Kurpet i dr hab. Kamila Borowczyk, prof. UŁ

1. Wstęp

Określenie próbka biologiczna jest bardzo szerokie i najczęściej rozumiane jako porcja materiału pobrana od organizmu żywego. Do próbek takich zalicza się materiał pochodzenia roślinnego oraz zwierzęcego, a niekiedy żywność w szerokim pojęciu obejmującym zarówno surowy materiał z produkcji rolnej, jak i wysokoprzetworzony produkt spożywczy. Często głównym składnikiem próbek biologicznych jest białko, które przysparza najwięcej problemów podczas analizy. Wprowadzenie białek, np. do systemu HPLC, powoduje szybki spadek sprawności kolumny i wzrost oporu, który skutkuje podwyższeniem ciśnienia fazy ruchomej w układzie pomiarowym, takim jak chromatograf cieczowy. Wyjątek stanowią specjalne kolumny chromatograficzne, na które można nanosić rozcieńczone próbki zawierające białka. W związku z tym próbki biologiczne powinny być pozbawione białka, przed ich końcową analizą.

Popularną metodą oddzielenia białek od analitu jest ich wytrącanie, przy zastosowaniu odpowiednich odczynników lub temperatury. Po wytrąceniu białka, próbkę poddaje się sączeniu lub wirowaniu. Alternatywną metodą jest wirowanie płynnego materiału biologicznego na odpowiednich filtrach membranowych typu „cut off”, pozwalających na separację białka od innych małocząsteczkowych składników próbki.

Najczęściej białka są wytrącane przy użyciu roztworów kwasów, rozpuszczalników organicznych i soli. Mechanizm wytrącania białka jest różny w zależności od zastosowanych odczynników. W roztworach silnie kwaśnych, poniżej punktu izoelektrycznego, białka posiadają netto ładunek dodatni i tworzą nierozpuszczalne sole z kwasami takimi jak trichlorooctowy czy chlorowy(VII). Wytrącanie białka poprzez dodanie soli (wysalanie) polega

na powstrzymaniu hydratacji białka na korzyść hydratacji jonów zawartych w soli. Powoduje to usunięcie wody z powierzchni hydrofobowych białek, następstwem czego jest wzrost oddziaływań pomiędzy grupami hydrofobowymi białek, co prowadzi do ich agregacji i wytrącania. Dodanie rozpuszczalnika organicznego mieszalnego z wodą (aceton, acetonitryl, czy metanol) obniża stałą dielektryczną roztworu białka, co zwiększa przyciąganie pomiędzy naładowanymi cząsteczkami i ułatwia elektrostatyczne oddziaływania. Ponadto rozpuszczalnik organiczny wypiera przyłączone cząsteczki wody z fragmentów hydrofobowych białka, ułatwiając jego agregację i wytrącanie.

Podczas wytrącania białek należy rozważyć możliwość współwytrącania analitu i wpływu środowiska na jego trwałość. W przypadku stosowania rozpuszczalnika organicznego, ważne jest aby ten bardzo dobrze rozpuszczał analit, gdyż niektóre związki mogą się adsorbować na wytrączanych białkach. Wytrącając białko często stosuje się duże objętości rozpuszczalników w stosunku do wielkości próbki. W związku z tym należy zwrócić szczególną uwagę na czystość stosowanych odczynników, tak aby analizowany materiał nie uległ dodatkowemu zanieczyszczeniu.

Zjawiska wytrącania, deproteinizacji białek nie należy mylić z denaturacją białek. Denaturacja następuje wówczas, gdy pod wpływem czynników chemicznych, czy fizycznych ulega zniekształceniu struktura IV, III lub II rzędowa białka. Podczas denaturacji dochodzi do zmiany w konformacji łańcucha polipeptydowego, wskutek czego białko traci rodzime właściwości. Białko zdenaturowane może pozostać w roztworze, bądź może być z niego wytrącone w postaci „kłaczków”. Do czynników fizycznych wywołujących denaturację zaliczyć należy: wysoką temperaturę, ultradźwięki, promieniowanie krótkofalowe oraz wytrząsanie roztworów wodnych białka w atmosferze powietrza. Chemiczne czynniki denaturujące białka to np.: kwasy, zasady, jony metali ciężkich, mocznik, detergenty, alkohol, aceton, chloroform.

Celem ćwiczenia jest zbadanie efektywności wytrącania białka z jego wodnych roztworów przy zastosowaniu różnych odczynników chemicznych.

Oznaczenie zawartości białka pozostałego w roztworze po deproteinizacji zostanie wykonane metodą pomiaru absorbancji w nadfiolecie przy analitycznej długości fali wynoszącej 280 nm. Pomiar absorbancji w nadfiolecie jest możliwy dzięki obecności w białkach tyrozyny i tryptofanu, które posiadają maksimum absorpcji przypadające na 280 nm. Metoda obarczona jest błędem, gdyż występuje duża zmienność absorbancji dla różnych rodzajów białek, wynikająca z niejednakowej procentowej zawartości wspomnianych aminokwasów. Inną wadą tej metody jest to, iż związki wielkocząsteczkowe, takie jak kwasy

nukleinowe mogą wpływać na wartość absorbancji mierzonej przy 280 nm. Poza tym niektóre związki małowcząsteczkowe (puryny, pirymidyny, fenole) wykazują dużą absorbancję przy 280 nm. Pomimo tych wad metoda ta jest szeroko stosowana, gdyż pozwala na szybkie oznaczenie zawartości białka w próbce.

2. Aparatura i odczynniki

- spektrofotometr UV-Vis,
- kuweta kwarcowa o długości 10 mm,
- pipety automatyczne,
- probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 oraz 2 ml,
- kolby miarowe o pojemności 5 ml,
- roztwór standardowy albuminy o stężeniu 5 mg/ml,
- sztuczna ślina,
- 0,9% NaCl,
- 3 mol/l kwas chlorowy(VII) (PCA),
- acetonitryl (ACN).

Wymagane środki ostrożności

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):
 - Acetonitryl – F Produkt wysoce łatwopalny R11, Xn Produkt szkodliwy R20/21/22;
 - Kwas chlorowy(VII) – O Produkt utleniający R5, C Produkt żrący R35.
- ✓ Pierwsza pomoc:
 - w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody.
 - w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.
 - w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.
 - w razie spożycia: przepłukać usta wodą.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

3. Przygotowanie próbek i wykonanie oznaczenia

3.1. Przygotowanie krzywej wzorcowej do oznaczenia zawartości białek

Przygotować 2 serie roztworów standardowych albuminy w 0,9% NaCl o następujących stężeniach: 0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 oraz 1,0 mg/ml. W tym celu do probówek typu Eppendorf

o pojemności 2 ml dodać odpowiednie objętości roztworu standardowego albuminy o stężeniu 5 mg/ml oraz 0,9% NaCl, zgodnie z tabelą poniżej (Tabela 1). Przygotowane 2 serie roztworów albuminy delikatnie wymieszać (nie powodując pienienia), przelać do kuwety pomiarowej (rozpoczynając od najmniejszego stężenia) i zmierzyć absorbancję roztworu przy długości fali 280 nm.

Tabela 1. Objętości albuminy i soli fizjologicznej potrzebne do przygotowania krzywej wzorcowej.

Stężenie roztworu standardowego albuminy [mg/ml]	Objętość roztworu podstawowego albuminy [μl]	Objętość 0,9% NaCl [μl]
0,00	0	2000
0,05	20	1980
0,10	40	1960
0,25	100	1900
0,50	200	1800
1,00	400	1600

3.2. Spektrofotometryczne oznaczenie zawartości białek w ślinie

Przygotować roztwór śliny w dwóch powtórzeniach do pomiaru białka początkowego. W tym celu do kolby miarowej o pojemności 5 ml dodać 50 μ l śliny, a następnie dopełnić do kreski za pomocą 0,9% NaCl. Próbkę dokładnie wymieszać, a następnie przelać do kuwety pomiarowej i zmierzyć absorbancję roztworu przy długości fali 280 nm.

3.3. Wytrącenie białek i oznaczenie stężenia białka po odbiałczeniu

a) Wytrącanie białka za pomocą kwasu

W celu sprawdzenia wydajności deproteinizacji przygotować 2 serie roztworów śliny zgodnie z następującą procedurą. Do probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml wprowadzić po 500 μ l roztworu śliny, a następnie dodać odpowiednie objętości 0,9% NaCl oraz 3 M PCA (Tabela 2). Próbkę wymieszać, pozostawić na 5 min i odwirować przez 10 min przy 12000 rpm, pamiętając o wyważeniu probówek. Do kolb miarowych o pojemności 5 ml

wprowadzić po 500 μl supernatantu i uzupełnić do kreski za pomocą 0,9% NaCl. Roztwory wymieszać, przelać do kufy kwarcowej i zmierzyć ich absorbancję przy 280 nm.

Tabela 2. Objętości śliny, soli fizjologicznej i kwasu użyte do wytrącenia białka.

Nr próbówki	1	2	3
objętość śliny [μl]	500	500	500
objętość 0,9% NaCl [μl]	450	300	0
objętość 3 M PCA [μl]	50	200	500

b) Wytrącanie białka za pomocą rozpuszczalnika organicznego

Przygotować 2 serie roztworów śliny zgodnie z następującą procedurą. Do probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml wprowadzić odpowiednie objętości roztworu śliny oraz 0,9% NaCl, a następnie dodać acetonitryl w takiej ilości, aby stosunek objętościowy symulowanego płynu biologicznego do rozpuszczalnika organicznego wynosił: 2:1, 1:2 oraz 1:4 (Tabela 3). Próbkę wymieszać, pozostawić na 5 min i odwirować przez 10 min przy 12000 rpm, pamiętając o wyważeniu probówek. Do kolb miarowych o pojemności 5 ml wprowadzić po 500 μl supernatantu i uzupełnić do kreski za pomocą 0,9% NaCl. Roztwory wymieszać, przelać do kufy kwarcowej i zmierzyć ich absorbancję przy 280 nm.

Tabela 3. Objętości śliny, soli fizjologicznej i rozpuszczalnika organicznego użyte do wytrącenia białka.

Nr próbówki	1	2	3
objętość śliny [μl]	250	250	250
objętość 0,9% NaCl [μl]	1125	750	250
objętość ACN [μl]	125	500	1000

4. Opracowanie wyników

4.1. Wstęp teoretyczny.

4.2. Dla każdego punktu kalibracyjnego (seria I i II) obliczyć średnią wartość absorbancji, odchylenie standardowe (SD) oraz względne odchylenie standardowe (%RSD). Wykreślić krzywą kalibracyjną jako zależność średniej absorbancji od stężenia albuminy. Wyznaczyć równanie prostej metodą najmniejszych kwadratów oraz współczynnik determinacji (R^2).

- 4.3. Na podstawie uzyskanego równania obliczyć stężenie [mg/ml] białka początkowego w próbce śliny (seria I i II). Otrzymałą wartość przeliczyć na zawartość [mg] białka w ślinie (seria I i II). Podać średnią, SD oraz %RSD.
- 4.4. Na podstawie uzyskanego równania obliczyć stężenie [mg/ml] pozostałego po deproteinizacji białka w każdej próbce śliny. Otrzymałą wartość przeliczyć na zawartość [mg] białka w próbce. Podać średnią, SD oraz %RSD.
- 4.5. Dla każdej próbki obliczyć wydajność procesu deproteinizacji korzystając z następującego wzoru:

$$\text{Wydajność [\%]} = \frac{\text{początkowa ilość białka [mg]} - \text{ilość białka po deproteinizacji [mg]}}{\text{początkowa ilość białka [mg]}} * 100\%$$

- 4.6. Wyniki dla poszczególnych stężeń odczynnika deproteinizującego uśrednić i wyliczyć SD oraz %RSD.
- 4.7. Uzyskane wyniki zebrać w odpowiednich tabelach.

Krzywa kalibracyjna					
Stężenie albuminy [mg/ml]	Absorbancja [mAU]				RSD [%]
	Seria I	Seria II	Średnia	SD	
0,00					
0,05					
0,10					
0,25					
0,50					
1,00					
Równanie krzywej kalibracyjnej:					
Współczynnik determinacji (R ²):					

Początkowa zawartość białka w próbce śliny					
Próbka	Absorbancja [mAU]				RSD [%]
	Seria I	Seria II	Średnia	SD	
Ślina					

	Początkowe stężenie białka [mg/ml]				RSD [%]
	Seria I	Seria II	Średnia	SD	
	Początkowa zawartość białka w próbce [mg]				RSD [%]
	Seria I	Seria II	Średnia	SD	

Deproteinizacja za pomocą kwasu						
Nr próbki	Objętość kwasu [μl]	Absorbancja [mAU]				RSD [%]
		Seria I	Seria II	Średnia	SD	
1	50					
2	200					
3	500					
Nr próbki	Objętość kwasu [μl]	Stężenie białka po odbiałczeniu próbki [mg/ml]				RSD [%]
		Seria I	Seria II	Średnia	SD	
1	50					
2	200					
3	500					
Nr próbki	Objętość kwasu [μl]	Zawartość białka po odbiałczeniu próbki [mg]				RSD [%]
		Seria I	Seria II	Średnia	SD	
1	50					
2	200					
3	500					
Nr próbki	Objętość kwasu [μl]	Wydajność deproteinizacji [%]				RSD [%]
		Seria I	Seria II	Średnia	SD	
1	50					
2	200					
3	500					

Deproteinizacja za pomocą rozpuszczalnika organicznego						
Nr próbki	Objętość ACN [μ l]	Absorbancja [mAU]				RSD [%]
		Seria I	Seria II	Średnia	SD	
1	125					
2	500					
3	1000					
Nr próbki	Objętość ACN [μ l]	Stężenie białka po odbiałczeniu próbki [mg/ml]				RSD [%]
		Seria I	Seria II	Średnia	SD	
1	125					
2	500					
3	1000					
Nr próbki	Objętość ACN [μ l]	Zawartość białka po odbiałczeniu próbki [mg]				RSD [%]
		Seria I	Seria II	Średnia	SD	
1	125					
2	500					
3	1000					
Nr próbki	Objętość ACN [μ l]	Wydajność deproteinizacji [%]				RSD [%]
		Seria I	Seria II	Średnia	SD	
1	125					
2	500					
3	1000					

- 4.8. Przeprowadzić dyskusję wyników, uwzględniając wpływ rodzaju i objętości odczynnika deproteinizującego na skuteczność procesu odbiałczania oraz powtarzalność oznaczeń.
- 4.9. Wskaż ewentualne trudności związane z wykonaniem eksperymentu lub przygotowaniem sprawozdania.

Literatura

„Ćwiczenia z biochemii”, praca zbiorowa pod redakcją L. Kłyszejko-Stefanowicz, PWN, Warszawa, 1999, str. 233-245, 250.

C. Polson, P. Sarkar, B. Incedon, V. Raguvaran, R. Grant, *Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. B, 785 (2003) 263–275.