

## Przygotowanie próbek biologicznych do analizy.

### Badanie preparatów farmaceutycznych oraz tkanek i płynów fizjologicznych, laboratorium

## Wpływ rozdrobnienia próbki na wydajność ekstrakcji białek z batona proteinowego

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

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

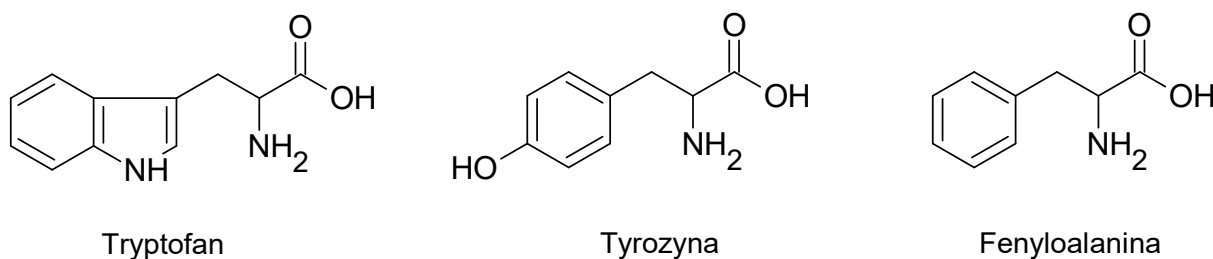
## I. Wprowadzenie

### I.1. Spektrofotometryczne oznaczanie białek

Białka są podstawowymi makrocząsteczkami zbudowanymi z szeregu aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi. Różnorodność właściwości białek wynika z kombinacji dwudziestu naturalnych aminokwasów, z których każdy posiada unikalną grupę boczną decydującą o charakterze chemicznym i reaktywności cząsteczki. Po syntezie łańcuch polipeptydowy ulega spontanicznemu fałdowaniu, przyjmując strukturę trzeciorzędową stabilizowaną przez oddziaływania hydrofobowe, mostki disiarczkowe, wiązania wodorowe i siły elektrostatyczne. Zarówno sekwencja aminokwasowa, jak i sposób fałdowania determinują właściwości fizykochemiczne białek, takie jak rozpuszczalność, stabilność konformacyjna, podatność na denaturację oraz zachowanie w polu elektromagnetycznym.

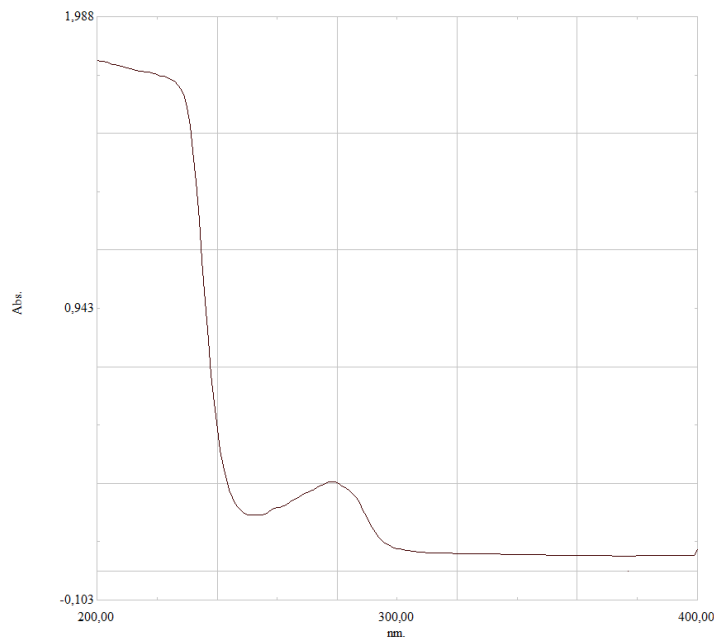
W oznaczeniach spektrofotometrycznych szczególne znaczenie mają aminokwasy aromatyczne, takie jak tryptofan, tyrozyna oraz fenyloalanina, ponieważ zawarte w ich pierścieniach układy sprzężonych wiązań podwójnych pochłaniają promieniowanie ultrafioletowe (Rys. 1). Tryptofan jest najsilniejszym chromoforem, wykazując wyraźne maksimum absorpcji w okolicach 280 nm, tyrozyna absorbuje umiarkowanie, natomiast fenyloalanina słabo (z maksimum przesuniętym w kierunku fal krótszych, tj. ok. 258 nm). Intensywność sygnału zależy zarówno od liczby reszt aromatycznych, jak i od stopnia ich

ekspozycji w strukturze białka – reszty ukryte we wnętrzu hydrofobowym mogą pochłaniać światło słabiej niż te znajdujące się na powierzchni cząsteczki. Należy również pamiętać, że silną absorpcję przy 205 nm wykazuje samo wiązanie peptydowe, co powoduje, że sygnał pochodzący od białka jest sumą oddziaływania chromoforów bocznych i łańcucha głównego. Zdolność białek do absorpcji światła przy długości fali 280 nm umożliwia zastosowanie spektrofotometrii UV do oznaczania ich stężenia w roztworach wodnych. Metoda ta opiera się na prawie Lamberta–Beera, zgodnie z którym absorbancja jest wprost proporcjonalna do stężenia analitu, pod warunkiem, że pomiar wykonywany jest w zakresie liniowości detektora (zazwyczaj  $A < 1,0 - 1,5$ ), co często wymusza wielokrotne rozcieńczanie ekstraktów białkowych. Ponadto wszystkie roztwory standardowe i próbki muszą być przygotowane w identycznym rozpuszczalniku, aby uniknąć efektów matrycowych. Szczególnie istotna jest obecność substancji wykazujących własną absorpcję w zakresie UV (m.in. niektóre detergenty, nukleotydy, fenole), które mogą zafałszować pomiar. Z kolei obecność zawiesiny powoduje rozpraszanie światła, dlatego próbki przed pomiarem odwirowuje się i pobiera jedynie fazę ciekłą wolną od cząstek stałych.



**Rys. 1.** Struktury chemiczne aminokwasów aromatycznych

Widmo absorpcji białek jest zależne od ich składu aminokwasowego, środowiska chemicznego oraz pH roztworu, które wpływa m.in. na jonizację grup fenolowych tyrozyny. Ze względu na to, że białka różnią się zawartością chromoforów aromatycznych, dla zapewnienia poprawności oznaczeń stosuje się kalibrację z wykorzystaniem roztworów wzorcowych białka o znanych stężeniach. Albumina jest najczęściej stosowanym standardem, ponieważ dobrze rozpuszcza się w wodzie, jest stabilna i posiada charakterystyczny dla wielu białek profil absorpcji (Rys. 2), umożliwiając wygenerowanie liniowej krzywej kalibracyjnej w szerokim zakresie stężeń.



**Rys. 2.** Widmo absorpcji albuminy.

Porównanie absorbancji próbek z wartościami odczytanymi z krzywej pozwala precyzyjnie określić stężenie białka w badanym roztworze. Metoda ta jest szybka, niewymagająca stosowania dodatkowych odczynników i bardzo powszechna, choć jej dokładność zależy od warunków pomiaru, rodzaju buforu, pH oraz obecności substancji interferujących.

## **I.2. Ekstrakcja**

**Ekstrakcja** jest powszechnie stosowaną techniką rozdzielania i oczyszczania składników mieszanin. Polega na rozpuszczeniu poszczególnych substancji lub grup związków chemicznych w odpowiednim rozpuszczalniku i oddzieleniu ich w postaci roztworu od pozostałych składników próbki. W trakcie procesu ekstrakcji ma miejsce transport składników z próbki, nazywanej matrycą pierwotną do matrycy odbierającej, tzw. wtórnej, która zazwyczaj ma jednoznacznie określony i prosty skład chemiczny. We współczesnych technikach ekstrakcji jako matrycę odbierającą stosuje się nie tylko ciekłe rozpuszczalniki, ale także gazy, ciała stałe lub płyny w stanie nadkrytycznym.

Wykorzystanie ekstrakcji w procedurze analitycznej pozwala na:

- izolację poszczególnych składników lub całej grupy związków z pierwotnej próbki do matrycy o prostszym składzie, a tym samym zmniejszenie interferencji innych składników na skutek przeniesienia do matrycy wtórnej tylko wybranych związków chemicznych,

- zażęcenie próbki, czyli uzyskanie odpowiedniego stężenia analitu, umożliwiające zastosowanie wybranej techniki i przyrządu pomiarowego w celu analizy ilościowej.

Należy jednak pamiętać, że ekstrakcja, jak każdy etap w procedurze analitycznej, wiąże się z możliwością utraty części analitów.

Wybór techniki ekstrakcji zależy przede wszystkim od stanu skupienia matrycy, właściwości i stężenia analitu oraz właściwości i stężenia substancji przeszkadzających. Technikę ekstrakcji należy dostosować do celu, czasu analizy, sposobu przygotowania próbki oraz czułości i selektywności metody końcowego oznaczania, jeśli takie jest stosowane.

Najstarszym rodzajem ekstrakcji stosowanym w analityce, a zarazem najpopularniejszą techniką izolacji analitów z próbek ciekłych jest ekstrakcja typu ciecz – ciecz (*liquid – liquid extraction*, LLE). Polega ona na przeniesieniu substancji rozpuszczonej w jednej fazie ciekłej do drugiej fazy ciekłej, niemieszającej się z pierwszą. Warunkiem prawidłowego przebiegu tego procesu jest występowanie dwóch faz ciekłych, które po zakończeniu procesu można łatwo rozdzielić mechanicznie. Najprostszym sposobem ekstrakcji ciecz – ciecz jest ekstrakcja w rozdzielniku. Próbkę ciekłą umieszcza się w rozdzielniku, dodaje rozpuszczalnik ekstrahujący i wytrząsa ręcznie lub mechanicznie. Następnie pozostawia do rozdzielania warstw. Ekstrakcję powtarza się wielokrotnie, a połączone ekstrakty przemywa czystą cieczą, w której była rozpuszczona próbka.

Kolejnym typem ekstrakcji jest ekstrakcja w układzie ciało stałe – ciecz (ang. *solid liquid extraction*, SLE), która polega ona na wyodrębnieniu z ciała stałego składnika rozpuszczającego się w odpowiednim rozpuszczalniku. Ekstrakcję za pomocą cieczy stosuje się do wydzielania substancji z materiału roślinnego, materiału pochodzenia zwierzęcego oraz z gleby i osadów. Ponadto ekstrakcja w układzie ciało stałe – ciecz jest często stosowana do desorpcji analitu z sorbentu stałego. Stosowane obecnie techniki ekstrakcji próbek stałych cieczą można podzielić na:

- techniki klasyczne, takie jak ekstrakcja przez wytrząsanie oraz ekstrakcja przez homogenizację próbki z rozpuszczalnikiem,
- techniki klasyczne wspomagane, np. ultradźwiękami czy promieniowaniem mikrofalowym,
- współczesne techniki ekstrakcji, z zastosowaniem niekonwencjonalnych rozpuszczalników oraz warunków procesu, np. ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym.

Klasyczne techniki ekstrakcji skutecznie wypierane są przez modyfikowane sposoby izolacji substancji. Stosowanie fizycznych metod wspomagających proces ekstrakcji, takich jak:

zwiększanie ciśnienia ekstrahenta, stosowanie promieniowania mikrofalowego lub fal ultradźwiękowych, zdecydowanie zwiększa wydajność ekstrakcji oraz pozwala na ograniczenie zużycia lotnych i szkodliwych rozpuszczalników.

Najprostszą techniką klasyczną jest ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie, która przy tym jest czasochłonna i wymagająca dużej ilości ekstrahenta. Próbkę po rozdrobieniu umieszcza się w naczyniu, zalewa rozpuszczalnikiem i wytrząsa. Najczęściej próbkę ekstrahuje się wielokrotnie, dodając za każdym razem świeżą porcję rozpuszczalnika. Uzyskane porcje ekstraktu łączy się, następnie sączy lub wiruje dla oddzielenia cząstek stałych próbki.

W przypadku próbek biologicznych często stosuje się homogenizację próbki z odpowiednim rozpuszczalnikiem. Próbkę zalewa się odpowiednim rozpuszczalnikiem i rozdrabnia z wykorzystaniem homogenizatora. Proces ekstrakcji zachodzi jednocześnie z rozdrabnianiem próbki. Uzyskany homogenat następnie poddaje się sączeniu lub częściowej wirowaniu w celu oddzielenia nierozpuszczalnych pozostałości. Uzyskany osad można poddać powtarzanej ekstrakcji. Powtarzanie tego procesu kilkoma porcjami świeżego rozpuszczalnika pozwala uzyskać większą wydajność ekstrakcji.

Oceny ilościowej procesu ekstrakcji można dokonać na podstawie **wydajności ekstrakcji (%E)**, która jest stosunkiem ilości substancji wyekstrahowanej, znajdującej się w eluencie do jej ilości w próbce wyjściowej. Na efektywność ekstrakcji wpływ mają takie czynniki jak: rodzaj substancji i stosowanego rozpuszczalnika, temperatura, intensywność wytrząsania oraz rozdrobnienie materiału.

## **II. Cel ćwiczenia**

Celem ćwiczenia jest określenie wpływu rozdrobnienia próbki na efektywność ekstrakcji białek z batona proteinowego.

## **III. Odczynniki i aparatura**

### **III.1. Odczynniki:**

- baton proteinowy,
- roztwór wzorcowy albuminy jaja kurzego, 10 mg/mL,
- woda dejonizowana.

### **III.2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny:**

- homogenizator IKA Labortechnik T25,
- waga analityczna RADWAG WPE 60,
- spektrofotometr UV-VIS,
- kuweta kwarcowa 1 cm,
- nóż lub skalpel,
- szkiełko zegarkowe do krojenia,
- łopatkę ze stali nierdzewnej,
- pęseta laboratoryjna ze stali nierdzewnej,
- naczynka wagowe,
- zlewki,
- probówki zakręcane typu „falcon” o pojemności 15 mL,
- probówki zakręcane typu „falcon” o pojemności 50 mL,
- probówki typu Eppendorf o pojemności 2 mL,
- kolby miarowe o pojemności 5 oraz 10 mL,
- statyw na probówki,
- pipety automatyczne 100 –1000  $\mu$ L,
- końcówki do pipet.

### **IV. Wymagane środki ostrożności**

- W trakcie wykonywania ćwiczenia student zobowiązany jest do noszenia odzieży ochronnej oraz okularów laboratoryjnych.
- Praca z rozpuszczalnikami organicznymi powinna odbywać się pod wyciągiem.
- Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- Szczegółowe opisy zagrożeń oraz sposoby postępowania w przypadkach niebezpiecznych sytuacji zawarte są w kartach charakterystyk, obecnych w pracowni laboratoryjnej.

## V. Wykonanie ćwiczenia

### V.1. Przygotowanie krzywej kalibracyjnej

W kolbach miarowych o pojemności 10 mL przygotować 2 serie roztworów standardowych albuminy jaja kurzego w wodzie dejonizowanej o stężeniach: 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 oraz 0,5 mg/mL. W tym celu do kolby dodać odpowiednią objętość roztworu wzorcowego białka o stężeniu 10 mg/mL (zgodnie z poniższą tabelą), a następnie dopełnić wodą dejonizowaną do kreski.

Stężenie roztworu standardowego albuminy [mg/mL]	Objętość roztworu podstawowego albuminy [ $\mu$ L]
0,0	0
0,1	100
0,2	200
0,3	300
0,4	400
0,5	500

Za pomocą spektrofotometru UV-Vis zmierzyć absorbancję przygotowanych roztworów przy długości fali 280 nm względem wody.

### V.2. Przygotowanie próbek do ekstrakcji

#### Ekstrakcja przez wytrząsanie:

Próbkę batona proteinowego pokroić nożem na kawałki wielkości kostki o wymiarach 0,5 cm  $\times$  0,5 cm  $\times$  0,5 cm. Przygotować trzy naważki pokrojonego batona o masie 1 g każda, a następnie przenieść je do falkonów o pojemności 15 mL. Dodać 10 mL wody dejonizowanej. Przygotowane próbki ekstrahować poprzez ręczne wytrząsanie falkonów ruchem góra–dół przez 1 min, z umiarkowaną intensywnością. 2000  $\mu$ L otrzymanego ekstraktu przenieść do próbki typu Eppendorf o pojemności 2 mL, a następnie poddać wirowaniu przy 12000 rpm przez 10 min w temperaturze pokojowej. Otrzymany supernatant rozcieńczyć 10-krotnie za pomocą wody dejonizowanej. W tym celu do kolby miarowej o pojemności 5 mL dodać 500  $\mu$ L supernatantu i uzupełnić wodą dejonizowaną do kreski. Próbki wymieszać delikatnym, powolnym odwracaniem kolby 8–10 razy, ruchem góra–dół, tak aby nie tworzyć piany. Następnie zmierzyć absorbancję przygotowanych roztworów przy długości fali 280 nm.

### Homogenizacja:

Trzykrotnie odważyć po 2 g batona. Każdą z naważek umieścić w falkonie o pojemności 50 mL. Dodać 20 mL wody dejonizowanej, aby otrzymać 10-krotne rozcieńczenie próbki. Próbkę homogenizować przez 1 min. 2000  $\mu$ L otrzymanego homogenatu przenieść do probówki typu Eppendorf o pojemności 2 mL, a następnie odwirować przy 12000 rpm przez 10 min. Supernatant rozcieńczyć 100-krotnie. W tym celu do kolby miarowej o pojemności 5 mL dodać 50  $\mu$ L supernatantu i uzupełnić wodą dejonizowaną do kreski. Próbki wymieszać delikatnym, powolnym odwracaniem kolby 8–10 razy, ruchem góra–dół, tak aby nie tworzyć piany. Następnie za pomocą spektrofotometru UV-Vis zmierzyć absorbancję przygotowanych roztworów przy długości fali 280 nm.

## **VI. Wykonanie sprawozdania i opracowanie wyników**

1. Przygotować wstęp teoretyczny.
2. Sporządzić tabelę stężeń roztworów wzorcowych i odpowiadających im absorbancji, zgodnie z poniższym wzorem:

Stężenie roztworu wzorcowego [mg/mL]	Absorbancja [mAU]		
	Seria I	Seria II	Średnia
0,0			
0,1			
0,2			
0,3			
0,4			
0,5			

3. Wykreślić krzywą zależności absorbancji w funkcji stężenia albuminy. Metodą najmniejszych kwadratów wyznaczyć równanie krzywej kalibracyjnej oraz współczynnik determinacji ( $R^2$ ).
4. Wykorzystując równanie prostej kalibracyjnej, obliczyć stężenie białka całkowitego w każdej próbce batona na podstawie absorbancji roztworów po rozcieńczeniu.
5. Przeliczyć wynik na stężenie w ekstrakcie pierwotnym, uwzględniając rozcieńczenia. Wyniki przedstawić w tabeli, zgodnie ze wzorem poniżej.
6. Dla uzyskanych wartości absorbancji, stężenia wyliczonego z krzywej kalibracyjnej oraz stężenia białka całkowitego w ekstrakcie (z trzech powtórzeń) wyliczyć wartości średnie, odchylenia standardowego (SD) i względnego odchylenia standardowego (%RSD).

7. Na podstawie uzyskanych wyników porównać wydajność ekstrakcji metodą wytrząsania i homogenizacji.
8. W dyskusji wyjaśnić, w jaki sposób rozdrobnienie próbki wpływa na wydajność procesu ekstrakcji oraz jakie są tego przyczyny.

<b>Ekstrakcja przez wytrząsanie</b>			
Nr próbki	Absorbancja [mAU]	Stężenie białka wyliczone z krzywej wzorcowej [mg/mL]	Stężenie białka w ekstrakcie po uwzględnieniu rozcieńczenia próbki [mg/mL]
1			
2			
3			
Średnia			
SD			
RSD [%]			
<b>Homogenizacja</b>			
Nr próbki	Absorbancja [mAU]	Stężenie białka wyliczone z krzywej [mg/mL]	Stężenie białka w ekstrakcie po uwzględnieniu rozcieńczenia próbki [mg/mL]
1			
2			
3			
Średnia			
SD			
RSD [%]			

## VII. Literatura

1. J. Namieśnik, Z. Jamróiewicz, M. Pilaszczyk, J. Torres, *Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy*, WNT, Warszawa 2000, ISBN 83-204-2482-8.
2. J.R. Dean, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, John Wiley & Sons, Newcastle 2009, ISBN 978-0-470-77285-0.
3. P. Stepnowski, E. Synak, B. Szafranek, Z. Kaczyński, *Techniki separacyjne*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010, ISBN 978-83-7326-712-1.
4. M.H. Simonian. *Spectrophotometric determination of protein concentration*. **Curr Protoc Cell Biol.** 2002; Appendix 3. DOI:10.1002/0471143030.cba03bs15.