

Praktické cvičení z lékařské biochemie

„Bílkoviny – kvalitativní průkaz, precipitace/denaturace, dialýza, elektroforéza“

Úlohy:

1. Biuretová reakce – kvalitativní analýza
2. Reverzibilní a ireverzibilní precipitace bílkovin
3. Dialýza
4. Elektroforéza bílkovin (videoprezentace)

Bílkoviny (proteiny) tvoří základní součást buněk, kde mají mnohočetné funkce (strukturní, transportní, enzymové, regulační aj.). Jsou složeny z 20 různých **aminokyselin** vzájemně vázaných **peptidovými vazbami**, přesné pořadí aminokyselin určuje **primární strukturu** bílkovin. Další uspořádání bílkovin je dáno vodíkovými můstky (sekundární struktura), elektrostatickými silami, hydrofobními interakcemi a disulfidovými můstky (terciární struktura). Oligomery identických nebo podobných podjednotek bílkovin se mohou někdy navzájem vázat nekovalentními vazbami a vytvářet tak kvartérní strukturu. Bílkoviny obsahují v řetězci více než 100 aminokyselin, jedná se velké polymery o **molekulové hmotnosti 10 – 1000 kDa** ale i více.

Detekce bílkovin patří k základním metodám používaným v biochemii. Můžeme prokázat jejich prostou přítomnost (**kvalitativní stanovení**), nejčastěji se ale stanovuje jejich koncentrace (**kvantitativní stanovení**). Nicméně samotná koncentrace bílkovin nevypovídá o jejich **biologické aktivitě**, tu je třeba stanovit zvlášť jako např. enzymovou nebo imunologickou aktivitu. Změna struktury bílkoviny vede obvykle ke změně její funkce.

Bílkoviny v roztoku lze stanovit buď pomocí **absorpce ultrafialového světla** (při 280 nm) nebo indukováním **tvorby barevného produktu** přidáním vhodného činidla. Barevný produkt je pak kvantifikován spektrofotometricky. Oddělení jednotlivých frakcí bílkovin ve směsi (např. krevní sérum) je možné na základě jejich odlišné velikosti, resp. molekulové hmotnosti pomocí **elektroforézy**.

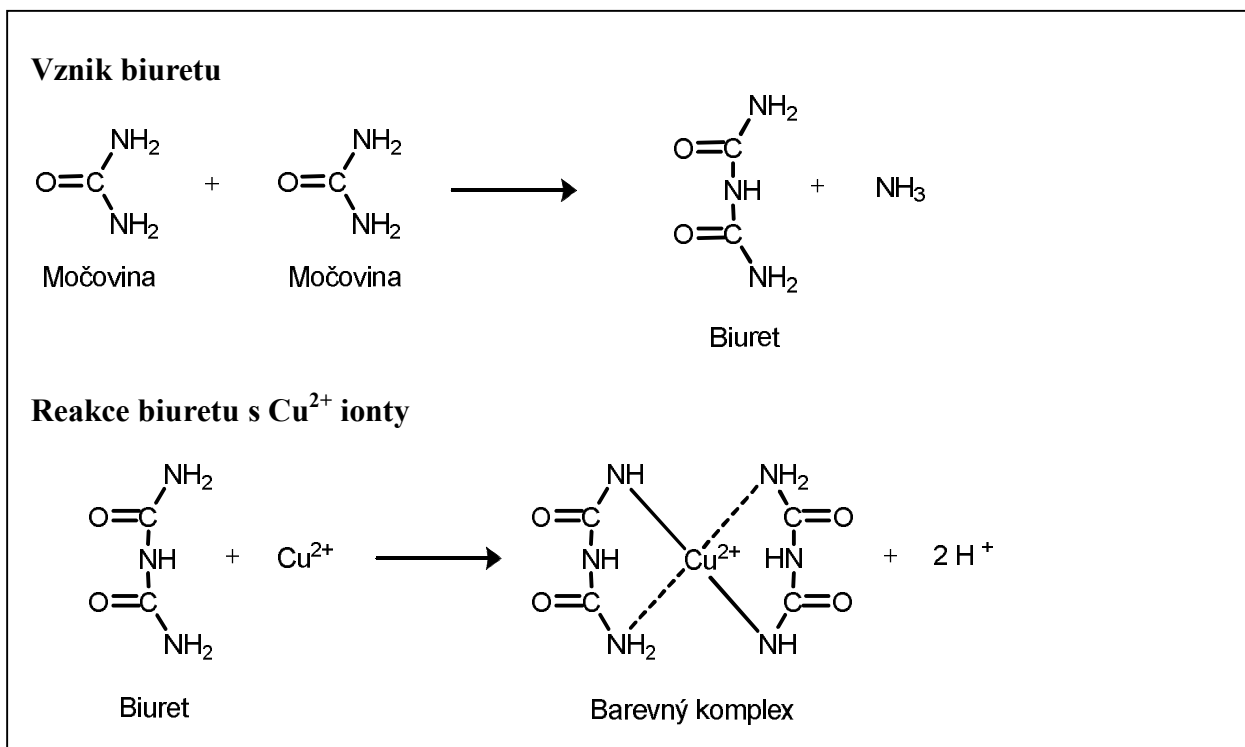
1. Biuretová reakce – kvalitativní analýza

Princip:

Biuretová reakce je založena na reakci Cu^{2+} (stabilizovaný jako vínanový komplex) v alkalickém prostředí s bílkovinou nebo jejími štěpnými produkty, peptony a polypeptidy. Sloučeniny, obsahující v molekule **2 a více amidových nebo peptidových vazeb** ($-\text{CO}-\text{NH}-$ nebo $-\text{CO}-\text{NH}_2$) poskytují s Cu^{2+} ionty charakteristicky červenofialově zbarvenou komplexní měďnatou sůl. Biuretová reakce se využívá k průkazu bílkovin. Nicméně, reakci neposkytují jen bílkoviny, ale i jejich štěpné produkty, peptony a polypeptidy. Odstín (intenzita) zbarvení produktu je podmíněn délkou řetězce peptidu, a tedy počtem peptidových vazeb. Peptidy se

čtyřmi a více zbytky aminokyselin vytvářejí komplex červený, tripeptidy fialový, dipeptidy nereagují.

Název reakce je odvozen od „**biuretu**“, triviálního názvu sloučeniny, která vzniká ze dvou molekul močoviny při jejím zahřívání. V této látce je přítomna amidová vazba analogická peptidové vazbě v proteinech a jedná se o **nejjednodušší sloučeninu poskytující pozitivní reakci**.



Pomůcky:

1. zkumavky
2. kádinka s vodou
3. Vortex

Reagencie:

1. močovina (pevná substance)
 2. roztok síranu měďnatého (7%) – základní sada chemikálií
 3. roztok hydroxidu sodného (2 mol/l) – základní sada chemikálií
 4. prášková kyselina glutamová
 5. roztok vaječné bílkoviny (1-2 vaječné bílky protřepané v 1 l fyziologického roztoku)
- připraveno**

Pracovní postup:

Příprava biuretu

Ve zkumavce se nad kahanem opatrně zahřívá cca 0,1 g močoviny (cca 0,5 cm od dna zkumavky). Močovina nejprve taje a rozkládá se za vzniku biuretu. Zahřívání se ukončí, když tavenina ztuhne v bílou hmotu. Po **vychladnutí** (jinak může dojít k prasknutí zkumavky) se biuret rozpustí cca v 1 ml vody za použití Vortexu.

Vlastní biuretová reakce

Biuretovou reakci provedeme s biuretem, kyselinou glutamovou a roztokem bílkoviny. Do zkumavky č. 1 - 3 přidáme příslušnou zkoumanou látku dle tabulky. V případě kyseliny glutamové dáme malé množství prášku na dno zkumavky a rozpustíme cca v 1 ml vody. Do všech zkumavek pak přidáme cca 1 ml hydroxidu sodného a nakonec 1 - 2 kapky roztoku síranu měďnatého. **Pozor** - síran měďnatý přidáný v nadbytku vytváří modrou sraženinu hydroxidu měďnatého, který komplikuje správné hodnocení reakce.

	Zkumavka č. 1	Zkumavka č. 2	Zkumavka č. 3
Biuret rozpuštěný ve vodě	asi 1 ml	-	-
Roztok kyseliny glutamové	-	asi 1 ml	-
Roztok bílkoviny	-	-	asi 1 ml
Hydroxid sodný	asi 1 ml	asi 1 ml	asi 1 ml
Síran měďnatý	1 - 2 kapky	1 - 2 kapky	1 - 2 kapky

Vyhodnocení:

Pozitivní reakce se projeví vznikem sytě modrého, červeno-fialového či fialového zbarvení, které je lépe patrné proti bílému pozadí. Vhodné je srovnávat barvu obsahu zkumavek č. 1 - 3 s barvou samotného biuretového činidla ve zvláštní zkumavce (přibližně po 1 ml vody a hydroxidu sodného + 1 - 2 kapky síranu měďnatého)

Úkoly:

Popište zbarvení v jednotlivých zkumavkách a konfrontujte s předpokládaným výsledkem

2. Reverzibilní a ireverzibilní precipitace bílkovin

Princip:

Bílkoviny (koloidní částice) jsou udržovány v disperzním stavu díky svému náboji a solvatačnímu (hydratačnímu) obalu, které brání jejich agregaci. Dojde-li ke ztrátě solvatačního obalu a náboje, částice agregují a vypadnou z roztoku – sráží se. Toho se využívá při izolaci bílkovin **srážením v izoelektrickém bodě** nebo při **vysolování**.

Pokud jde o **náboj**, chovají se molekuly aminokyselin a bílkovin jako **amfolyty**. Disociace postranních řetězců aminokyselin, a tedy rozpustnost bílkovin je závislá na pH – bílkoviny jsou nejméně rozpustné při pH rovném jejich **izoelektrickému bodu pI** (pH, při kterém je výsledný náboj molekuly nulový, neboť je vyrovnaná disociace karboxylových a amino skupin aminokyselin). Při takovém pH se tedy molekuly bílkovin vzájemně neodpužují a jsou nejméně stabilní – vypadávají z roztoků jako sraženina.

Okolo nabité molekuly bílkoviny se v roztoku tvoří vrstva orientovaných molekul rozpouštědla – hydratační obal. Hydratační obal opět stabilizuje molekuly bílkovin v roztoku a brání jejich vzájemné agregaci. Přidání malého množství neutrálních solí, které odnímají hydratační obal, vede ke shlukování molekul a jejich vyloučení z roztoku – tzv. **vysolování**.

Vysolování patří k základním metodám **frakcionace a izolace bílkovin** ze směsi (např. sérum). Výhodou této metody je, že při ní bílkoviny precipitují reverzibilně (nedenaturují) a lze je následně rozpustit ve vodě nebo pufru a dále zpracovávat. Velmi často se používá vysolování amonnými solemi, solemi alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin ((NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄, NaCl, MgSO₄). Použitím vhodných koncentrací solí lze jednotlivé typy bílkovin navzájem dělit postupnou (frakcionovanou) precipitací. **Globuliny** krevního séra (či

plazmy) se srážejí **polovičním nasycením síranem amonným**, **albumin** až při **úplném nasycení**. **Globuliny** se také srážejí **úplným nasycením chloridem sodným** a teprve následným **slabým okyselením** zhruba k izoelektrickému bodu vypadne z roztoku i **albumin**.

Dojde-li srážením ke změnám konformace molekuly bílkoviny v důsledku porušení nativních fyzikálně-chemických vlastností, jedná se o **denaturaci**. Hlavním důsledkem denaturace je **změna biologických vlastností** bílkovin.

Přidání malého množství **solí těžkých kovů** k roztoku bílkoviny vede ke srážení mechanismem vazby těžkého kovu. Vytvářejí se komplexní sloučeniny, soli bílkovin s těžkými kovy. Ztrátou náboje se částice stávají méně rozpustné, avšak s nadbytkem kovových iontů mohou náboje opět získat a znovu se rozpustí, nicméně jejich biologická aktivita se již nevrací (denaturace).

Koncentrované minerální kyseliny srážejí bílkoviny z roztoků jednak tím, že bílkovinné částice dehydratují, jednak tím, že vytvoří s bílkovinami nerozpustné soli. Tento typ srážení se využívá při detekci patologické příměsi bílkoviny v moči (Hellerova zkouška s kyselinou dusičnou na proteinurii).

Denaturace **organickými kyselinami** má obdobný mechanismus jako u minerálních kyselin. V medicíně se používá kyselina trichloroctová k tzv. deproteinaci séra před některými analytickými metodami, kyselina sulfosalicylová se opět používá k detekci proteinurie.

Působením **tepla** se srážejí téměř všechny bílkoviny. Některé již při teplotě 50-60 °C, jiné teprve při krátkém nebo delším povaření. Denaturaci bílkovin teplem napomáhá i vhodné pH blízké izoelektrickému bodu, který je pro většinu bílkovin okolo pH 5. Proto srážení teplem (varem) nastává rychleji po slabém okyselení. V silně kyselých a zásaditých roztocích jsou bílkovinné částice více disociovány, proto jsou stabilnější a varem se nesrážejí. Důležitou úlohu má při denaturaci teplem také přítomnost solí. V silně kyselých roztocích bílkoviny denaturují teprve po přidání většího množství neutrální soli.

2.1 Reverzibilní srážení proteinů - Frakcionace a izolace bílkovin

Pomůcky:

1. zkumavky, stojan
2. nálevka a filtrační papír
3. kádinka
4. Vortex

Reagencie:

5. sérum (hovězí) neředěné
6. fyziologický roztok k ředění séra
7. nasycený roztok síranu amonného – v kádince v digestoři
8. pevný síran amonný jemně rozetřený
9. chlorid sodný jemně rozetřený
10. roztok kyseliny octové (10 g/l) – základní sada chemikálií
11. chemikálie k provedení biuretové reakce jako v úloze 1 (roztoky hydroxidu sodného a síranu měďnatého)

2.1.1 Izolace albuminu a globulinů z krevního séra vysolováním pomocí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Pracovní postup:

Příprava 2x ředěného séra pro tuto a následující úlohu - ve zkumavce se smíchá 1 ml neředěného séra a 1 ml fyziologického roztoku, krátce zvortexovat. Do nové zkumavky se napipetuje 1 ml takto vzniklého ředěného séra (zbylý 1 ml ponechat pro další experiment 2.2) a přidá se 1 ml nasyceného roztoku síranu amonného.

Po 5 min se obsah zkumavky přefiltruje přes filtrační papír, čímž se odseparuje sraženina globulinů.

Ve zbylém filtrátu se vysolí přítomný albumin přidáváním rozetřeného síranu amonného za mírného míchání zkumavky, dokud nevznikne nasycený roztok, tzn. přidávaný síran se již dále nerozpouští. Po 5 min se obsah zkumavky přefiltruje přes dvojitý filtrační papír, na kterém se zachytí sraženina albuminu. Filtrát se uschová.

Filtrační papír se sraženinou albuminu se vloží do kádinky s cca 1 ml destilované vody a krouživými pohyby se albumin rozpustí.

Z uschovaného konečného filtrátu a rozpuštěného precipitátu se ve zkumavkách provede biuretová reakce na přítomnost bílkovin. (viz úloha 1)

Vyhodnocení:

Stejně jako v úloze 1; pozitivní reakce indikuje přítomnost bílkovin v dané frakci.

Úkoly:

Popište zbarvení v jednotlivých zkumavkách a konfrontujte s předpokládanou přítomností bílkoviny v dané frakci.

2.1.2 Izolace albuminu a globulinů z krevního séra vysolováním pomocí NaCl

Pracovní postup:

Do zkumavky se zbylým 1 ml ředěného séra připraveného v úloze 2.1 se přidává rozetřený chlorid sodný, dokud nedojde k nasycení. Vzniklá sraženina globulinů se opět odstraní přefiltrováním.

Ke zbylému filtrátu obsahujícímu albumin opatrně přidat po jednotlivých kapkách celkem 3 kapky **ředěné kyseliny octové ze základní sady chemikálií** (po každé kapce kontrola, zda se vytváří sraženina, v případě přebytku kyseliny dochází k rozpuštění sraženiny). Po 5 min opět zfiltrovat přes dvojitý filtrační papír, finální filtrát uschovat, sraženinu na filtračním papíru opět rozpustit v kádince s cca 1 ml destilované vody.

Z uschovaného konečného filtrátu a rozpuštěného precipitátu se ve zkumavkách provede biuretová reakce na přítomnost bílkovin. (viz úloha 1)

Vyhodnocení:

Stejně jako v úloze 1; pozitivní reakce indikuje přítomnost bílkoviny v dané frakci.

Úkoly:

Popište zbarvení v jednotlivých zkumavkách a konfrontujte s předpokládanou přítomností bílkoviny v dané frakci.

2.2 Ireverzibilní srážení proteinů spojené s denaturací

Pomůcky:

1. zkumavky, stojan
2. vodní lázeň (kádinka s vodou na varné desce)

Reagencie:

1. roztok vaječné bílkoviny - připraveno
2. roztok octové kyseliny (10 g/l) – základní sada chemikálií
3. koncentrovaná kyselina octová – v digestoři
4. nasycený roztok chloridu sodného – v kádince v digestoři
5. roztok hydroxidu sodného (2 mol/l) – základní sada chemikálií
6. roztok octanu olovnatého (5 g/l)
7. roztok síranu měďnatého (5 g/l) – základní sada chemikálií
8. koncentrovaná kyselina dusičná – v digestoři
9. roztok kyseliny trichloroctové (30 g/l)
10. roztok kyseliny sulfosalicylové (200 g/l)

2.2.1 Srážení solemi

Pracovní postup:

Do dvou zkumavek se dá po cca 1 ml roztoku bílkoviny. Do první zkumavky se pak přidává po kapkách roztok octanu olovnatého, do druhé zkumavky roztok síranu měďnatého. Ke vzniklé sraženině se opět přidá příslušný roztok soli v nadbytku, sraženina se rozpouští.

Úkoly:

Zaznamenejte vytvoření či rozpuštění sraženiny v jednotlivých zkumavkách. Vysvětlete důvod opětovného rozpuštění sraženiny.

2.2.2 Srážení minerálními kyselinami

Pracovní postup:

Do zkumavky se dá cca 1 ml koncentrované kyseliny dusičné, opatrně po stěnách zkumavky se přidá cca 1 ml roztoku bílkoviny. Na rozhraní vznikne bílý prstenec sražené bílkoviny.

Úkoly:

Zaznamenejte vytvoření sraženiny.

2.2.3 Srážení organickými kyselinami

Pracovní postup:

Do dvou zkumavek se dá cca 1 - 2 ml roztoku bílkoviny. Do první zkumavky se pak přidá několik kapek trichloroctové kyseliny, do druhé několik kapek sulfosalicylové kyseliny.

Bílkoviny se srážejí.

Úkoly:

Zaznamenejte vytvoření sraženiny

2.2.4 Srážení působením teploty (varem)

Pracovní postup:

Příprava nasyceného roztoku chloridu sodného: do zkumavky se dají cca 2 ml vody, poté se přidává chlorid sodný za mírného protřepávání, až se přidávaná sůl přestane rozpouštět. Toto množství stačí pro několik pracovních dvojic (typicky 4 pracovní dvojice)

Vlastní provedení:

Zkontrolujeme, zda se vyhřívá vodní lázeň. Do 5 zkumavek se dá po cca 1 - 2 ml roztoku bílkoviny.

Dále:

zkumavka č. 1 - povaří se ve vodní lázni - dochází ke srážení

zkumavka č. 2 - přidá se 1 kapka ředěné kyseliny octové (10 g/l) a povaří se ve vodní lázni - ke srážení dochází rychleji (pH je blíže izoelektrickému bodu)

zkumavka č. 3 - přidá se cca 0,5 ml koncentrované kyseliny octové a povaří se ve vodní lázni - ke srážení nedochází ani po zahřátí

zkumavka č. 4 - přidá se cca 0,5 ml koncentrované kyseliny octové a několik kapek nasyceného roztoku NaCl a povaří se ve vodní lázni - dochází ke srážení

zkumavka č. 5 - přidá se cca 0,5 ml roztoku hydroxidu sodného a zahřeje se - ke srážení nedochází ani po povaření

Úkoly:

Zaznamenejte, zda (ne)dochází k vytvoření sraženiny, vysvětlete důvod.

3. Dialýza

Princip:

Dialýza je metoda sloužící k oddělení látek tvořících pravé roztoky (menší než 1 nm) od látek koloidních (nepravé roztoky, makromolekulární disperze - typicky bílkoviny; velikost 1 - 1000 nm). Je založena na principu, že koloidní částice neprocházejí membránami, zatímco látky tvořící pravé roztoky procházejí volně. Jako dialyzační membránu je možno použít přírodní materiály (pergamen) či uměle vyrobené membrány (celofán, koloidové filtry).

V případě úlohy č. 3 budou ionty a malé molekuly (částice menší než 1 nm) volně procházet membránou dialyzačního střevo mezi dvěma kompartmenty (v daném případě SO_4^{2-} z vnitřního do zevního, OH^- ze zevního do vnitřního), zatímco molekuly albuminu neprocházejí. Tato difúze umožní rozvinutí biuretové reakce uvnitř dialyzačního střevo.

Pomůcky:

Dialyzační střevo namočené v destilované vodě - plastová vanička na pracovním stole
Automatická pipeta

Reagencie:

1. Roztok albuminu (albumin 20 g/l, jodid draselný 90 mmol/l, vinan draselno-sodný 95 mmol/l, síran sodný 250 mmol/l) **směs připravená na pracovních stolech**
2. Roztok síranu měďnatého - základní sada chemikálií
3. Roztok hydroxidu sodného (1 mol/l) - na pracovním stole, **nezaměňovat s roztokem v základní sadě chemikálií**
4. Roztok dusičnanu barnatého - základní sada chemikálií
5. Roztok kyseliny sulfosalicylové
6. Roztok kyseliny chlorovodíkové - základní sada chemikálií

Pracovní postup:

8 ml připraveného roztoku albuminu se smíchá s 2 - 3 kapkami roztoku síranu měďnatého. Nabobtnalé dialyzační střevo se vyjme z misky s vodou, asi 3 cm od kraje se zaváže pevný uzel provázken. Připravený roztok albuminu se nalije do dialyzačního střeva a střevo se uzavře stejným způsobem jako na protilehlém konci. Střevo se z vnějšku opláche destilovanou vodou a ponoří se do kádinky s cca 50 ml roztoku NaOH (dialyzační médium). Během 1 - 3 min je možno pozorovat počínající barevné změny, v závislosti na rychlosti difúze OH^- . Během dalších 30 - 50 min probíhá difúze SO_4^{2-} ze střeva do dialyzačního média. Po této době, kdy by měl být obsah střeva rovnoměrně fialově zabarven, se odlije trochu dialyzačního média z kádinky do dvou zkumavek a provede se:

Zkumavka č.1: test na přítomnost iontů SO_4^{2-} pomocí dusičnanu barnatého. Obsah ve zkumavce se okyselí kyselinou chlorovodíkovou (reakce pH papírku musí být slabě kyselá), poté se přidá dusičnan barnatý. Pokud je reakce negativní na přítomnost SO_4^{2-} , dialýza se ponechá probíhat déle a průkaz se zopakuje.

Zkumavka č. 2: test na přítomnost albuminu kyselinou sulfosalicylovou (analogicky jako v úloze 2.2.3)

Úkoly:

Zaznamenejte, zda dochází k rozvoji fialového zbarvení uvnitř dialyzačního střeva a vysvětlete.

Zaznamenejte výsledek průkazu iontů SO_4^{2-} v dialyzátu a vysvětlete.

Zaznamenejte výsledek průkazu bílkoviny (albuminu) v dialyzátu a vysvětlete.

4. Elektroforéza bílkovin

Videoprezentace

Elektroforéza je separační metoda založená na odlišné rychlosti putování jednotlivých bílkovinných frakcí nebo jiných makromolekul nesoucích elektrický náboj ve stejnosměrném elektrickém poli. **Odlišná rychlost pohybu molekul může být dána rozdílnou velikostí (molekulovou hmotností) nebo elektrickým nábojem molekul.** Vlastní pohyb molekul probíhá na nosiči – filtračním papíru (papírová elektroforéza), acetátcelulóze nebo gelu (agarózový gel, škrobový gel, polyakrylamidový gel). Některé typy gelů (např. polyakrylamidový, škrobový) přispívají k dělení molekul také velikostí svých pórů, chovají se jako molekulární síto a omezují tak pohyb větších molekul. Elektroforéza v gelu může být modifikována vytvořením gradientu hustoty gelu k rozlišení separovaných částic podle relativních molekulových hmotností (gradientová PAGE) nebo vytvořením gradientu pH amfolytu přidaného do gelu k rozlišení separovaných částic podle jejich pI (izoelektrická

fokusace – IEF). Gelová elektroforéza může být kombinována s imunoprecipitací v gelu pomocí protilátek proti příslušné bílkovině (imuno elektroforéza).

Elektroforéza bílkovin je v medicíně používána v diagnostice onemocnění, která se projevují změnami v zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin krevního séra či patologickou přítomností bílkovin (sérum, moč, likvor). Elektroforéza séra probíhá v pufru o alkalickém pH. Frakce, které lze elektroforeticky detekovat, se označují (od anody ke katodě): albumin a α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - a γ -globuliny. Rozdělené frakce na nosiči lze obarvit a jejich poměr stanovit fotometricky po eluci bílkovin s navázaným barvivem, nebo také denzitometricky, tzn. měřením odraženého, nebo prošlého světla, pokud je použitý nosič transparentní. Při znalosti hmotnostní koncentrace celkové bílkoviny a poměrů mezi absorbancemi jednotlivých frakcí lze tyto frakce kvantifikovat.

Gelové elektroforézy se také uplatňují při dělení nukleových kyselin (DNA, mRNA).

Upravil MUDr. Jan Krtíl

podle:

Kraml, J. a kol., Návody k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie, Karolinum, Praha, 1999

Materiál MUDr. Martina Vejražky, PhD. (kapitola dialýza)

Materiál kolektivu autorů Katedry biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze