

# ZAGADNIENIA DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z ENZYMOLOGII I CHEMII BIAŁEK DLA STUDENTÓW III ROKU BIOTECHNOLOGII MEDYCZNEJ

## Ćwiczenie 1. SPEKTROFOTOMETRYCZNE OZNACZANIE STĘŻENIA BIAŁKA.

### Charakterystyka spektralna białka w zakresie światła ultrafioletowego

#### *Zasada metody*

Obecność w białkach aminokwasów aromatycznych (tyrozyny i tryptofanu) oraz wiązań peptydowych powoduje, że związki te absorbują światło ultrafioletowe. Wiązania peptydowe absorbują światło w zakresie 210-230 nm, a aminokwasy aromatyczne światło o długości 280 nm. 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. Maksimum absorpcji w zakresie dalekiego ultrafioletu (poniżej 230 nm) to efekt występowania w białkach wiązań peptydowych. Intensywność absorbowania światła w ultrafiolecie zależy zarówno od składu aminokwasowego, jak i struktury białka. 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 posiadają dodatkowe maksima absorpcji w zakresie światła widzialnego.

#### **Wykonanie:**

Sporządzić widmo dla 0,1% roztworów albuminy surowicy bydlęcej, owoalbuminy i cytochromu c w zakresie 220–300 nm wobec 0,9% NaCl.

Porównać charakterystyki spektralne badanych białek.

### **Oznaczanie stężenia białka metodą Bradforda**

#### *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. Wiąże się z tym zmiana maksimum pochłaniania z 465 nm do 595 nm). Natężenie barwy jest proporcjonalne do stężenia białka w roztworze.

*Zakres metody: 1–10 µg*

### **Odczynniki:**

- odczynnik Bradforda
- standardowy roztwór białka: albumina o stężeniu 0,05 mg/ml
- 0.9% NaCl

### **Wykonanie**

1. Ze standardowego roztworu białka o stężeniu 0,05 mg/ml przygotować serię rozcieńczeń do wykonania krzywej kalibracyjnej w stężeniach: 1, 2, 4, 6, 8 i 10  $\mu\text{g/ml}$ . Próby wzorcowe rozcieńczyć 0,9% NaCl, a końcowa objętość prób wzorcowych powinna wynosić 0,5 ml.
2. Do probówek o obj. 2 ml odmierzyć po 0,5 ml roztworu badanego białka (próba badana), roztworów wzorcowych białka o stężeniu 1–10  $\mu\text{g/ml}$  (próby wzorcowe) oraz 0,9% NaCl (próba ślepa), a następnie do każdej dodać po 0,5 ml odczynnika Bradforda.
3. Próby wymieszać i inkubować 5 minut w temp. pokojowej.
4. Odczytać absorbancję prób badanych i prób wzorcowych wobec próby ślepej przy  $\lambda = 595 \text{ nm}$ .
5. Wykreślić krzywą wzorcową i odczytać wartość stężenia próby badanej.

### **Uwaga!**

Barwnik Coomassie Brilliant Blue G-250 ma tendencję do przylegania do ścian kuwety, dlatego najlepiej używać kuwet polistyrenowych.

### **Oznaczanie stężenia białka metodą Lowrego**

Instrukcja do oznaczania białka metodą Lowrego jest dostępna w Skrypcie do ćwiczeń laboratoryjnych z biochemii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej pod red. L. Węglarz, str. 53-54.

### **Zagadnienia do ćwiczenia:**

- Struktura i właściwości wiązania peptydowego.
- Poziomy organizacji łańcucha polipeptydowego w białkach (wiązania chemiczne stabilizujące struktury) – struktura I-, II-, III- i IV-rzędowa.
- Właściwości fizykochemiczne białek.
- Metody ilościowego oznaczania białek (metoda oznaczania w UV, metoda Bradforda, metoda Lowrego).

Teoretyczne przygotowanie do zajęć laboratoryjnych według powyższych zagadnień umożliwia podręcznik: SKRYPT DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z BIOCHEMII pod redakcją prof. Ludmiły Węglarz