

Instrukcja do ćwiczenia 2

WŁASNOŚCI BIAŁEK I BIAŁKA SUROWICY

ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

- Budowa, podział i własności amfoteryczne aminokwasów
- Właściwości białek, białka jako polielektrolity, wpływ pH na ładunek białek i ich rozpuszczalność, właściwości amfoteryczne. Wiązanie wody i wpływ soli na rozpuszczalność białek
- Główne frakcje białek osocza – skład, własności i funkcje.

1. Oznaczanie punktu izoelektrycznego (pI) kazeiny

Zasada: Białka są amfoterycznymi polielektrolitami. Ładunek cząsteczki białka zależy od stężenia jonów wodorowych w środowisku i jego wartość zmienia się wraz ze zmianą pH. Wartość pH, w którym cząsteczka białka zawiera tę samą liczbę zjonizowanych grup dodatnich i ujemnych, odpowiada **punktowi izoelektrycznemu (pI)** białka, wówczas jego sumaryczny ładunek równy jest zero. Białko w tym punkcie nie wędruje w polu elektrycznym, ma najniższą rozpuszczalność i najmniejszą lepkość, najłatwiej je wtedy wytrącić lub wykrystalizować. Białka w pI wykazują również najmniejsze ciśnienie osmotyczne, najslabiej pęcznią i nie reagują z anionami ani z kationami.

Punkty izoelektryczne (pI) przykładowych białek					
Pepsyna	1,0	Globuliny osocza	5,0-7,0	Histony	10-11
Albumina osocza	4,8	Hemoglobina	6,8	Trypsyna	10,5
Insulina	5,3	Mioglobina	7,0	Cytochrom c	10,6

Wykonanie:

10 probówek (wysokich) w statywie opis� nr od 1 do 10 i wprowadź do nich kolejno roztwory wg instrukcji w tabeli 1:

Numer probówki	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Roztwór	Dodana ilość (ml)											
H₂O	5,5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
1,5M CH₃COOH - tylko do 1 probówki, dalej kolejne rozcieńczanie: przenosząc 5 ml z poprzedniej do następnej probówki, po wymieszaniu	4,5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5 ml wylać
0,5% kazeina w 0,1M CH₃COONa (wymieszać)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Stopień wytrącenia, po 20 min. (w skali od 0 do +5)												
Obliczona wartość pH												
Zmierzona wartość pH												

Ustal pI kazeiny, zinterpretuj uzyskane wyniki.

2. Analiza zaburzeń ilości poszczególnych frakcji białek surowicy

Zasada: Terminem elektroforeza określa się technikę rozdzielania cząstek lub cząsteczek, opartą o zjawisko ich migracji w polu elektrycznym, w zależności od posiadanego ładunku.

Elektroforeza stosowana jest między innymi do rozdzielania białek surowicy na poszczególne frakcje (jest to tzw. proteinogram). Rutynowo wykonywane rozdzielanie białek surowicy pozwala na uzyskanie 5 frakcji. Są to: największa homogenna frakcja albumin (≈60%) oraz pozostałe heterogenne frakcje reprezentujące globuliny alfa 1 (≈4%), alfa 2 (≈9%), beta (≈10%) oraz gamma (≈17%), składające się z licznych białek, pełniących różnorodne funkcje.



Ryc. 1. Prawidłowy proteinogram

ZABURZENIA ILOŚCI POSZCZEGÓLNYCH FRAKCJI BIAŁEK SUROWICY

Elektroforeza białek surowicy jest techniką stosowaną rutynowo w laboratoriach klinicznych. Zmiany względnych stężeń poszczególnych frakcji pozwalają na łatwe rozpoznanie zaburzeń związanych z wieloma stanami patologicznymi. Najważniejsze z nich to:

- Hipoalbuminemia, manifestująca się obniżeniem wartości albumin, może być spowodowana:
 - niedoborami pokarmowymi (niedożywienie, zespoły złego wchłaniania)
 - upośledzoną syntezą albumin przez wątrobę
 - nasiloną utratą albumin (zespół nerczycowy, oparzenia)
 - hiperkatabolizmem
- Wzrost frakcji albumin wskazuje na ostre odwodnienie i towarzyszy wzrostowi stężenia innych białek
- Bisalbuminemia, charakteryzująca się dwoma pikami w zakresie frakcji albumin, może być wynikiem uwarunkowanego genetycznie występowania dwóch odmian albumin, bądź towarzyszyć określonym patologiom trzustki
- Podwyższenie frakcji globulin alfa 1 i alfa 2 jest charakterystyczne m.in. dla reakcji ostrej fazy w stanach zapalnych
- Wzrost frakcji β -globulin występuje w niedoborze żelaza, czego konsekwencją jest wzrost stężenia transferryny (należącej do tej frakcji)
- Obniżenie frakcji gamma występuje w okresie noworodkowym (fizjologicznie). U dorosłych może wynikać z zaburzeń odporności, spowodowanych chemio- i radioterapią, leczeniem immunosupresyjnym oraz podawaniem kortykoidów.
- Obraz zlania frakcji beta i gamma (tzw. mostek β - γ) sugeruje wzrost IgA, charakterystyczny dla marskości wątroby, a także reumatoidalnego zapalenia stawów i przewlekłych stanów zapalnych

Wykonanie: Na podstawie proteinogramów przedstawionych przez prowadzącego ćwiczenia spróbuj określić typ nieprawidłowości i stan patologiczny o jakim może ona świadczyć.

Polecana literatura:

1. Chemia medyczna pod redakcją Iwony Żak, ŚAM Katowice 2001, Rozdziały 13-15.
2. Praktikum z chemii medycznej pod redakcją Iwony Żak, ŚAM Katowice 2001, Rozdział 12.
3. Biochemia Harpera, Murray RR i wsp. PZWL Rozdział: Białka osocza, str. 770-793.