**Aminokwasy i białka**

**Aminokwasy** są pochodnymi kwasów organicznych, w których jeden atom wodoru, najczęściej przy węglu α, jest podstawiony grupą aminową a drugi karboksylową. Niektóre aminokwasy posiadają dwie grupy aminowe zlokalizowane przy różnych atomach węgla, nieliczne zawierają dwie lub nawet trzy grupy karboksylowe. Dwa aminokwasy; prolina i jej hydroksylowana pochodna – hydroksyprolina, nie posiadają grupy aminowej, lecz grupę iminową, dlatego są nazywane iminokwasami.

Fragment cząsteczki aminokwasu, złożony z węgla **α**, grupy α**-**aminowej i grupy α-karboksylowej jest wspólnym elementem strukturalnym wszystkich aminokwasów białkowych (za wyjątkiem iminokwasów). W fizjologicznym pH (7,4) większość grup karboksylowych jest zdysocjowana, tworzy anion -**COO-**, a większość grup aminowych wiąże **H+** tworząc kation -**NH3+**. W tych warunkach dominującą formą aminokwasu jest jon obojnaczy, będący nośnikiem dwóch przeciwstawnych ładunków elektrycznych. Dlatego, przyjęto jako regułę zapisywanie wzorów strukturalnych aminokwasów z grupą aminową w postaci kationowej -**NH3+** i grupą karboksylową w postaci anionowej -**COO-**.

Właściwości chemiczne, wspólne dla wszystkich aminokwasów, wynikają z obecności w ich cząsteczkach grupy α-karboksylowej i α-aminowej. Wszystkie aminokwasy, zawierające wolną grupę α-aminową, w **reakcji z ninhydryną** tworzą produkty o barwie niebiesko-fioletowej, natomiast prolina i hydroksyprolina, zawierające grupę iminową, tworzą produkty o barwie żółtej. W trakcie reakcji ninhydrynowej aminokwas ulega dekarboksylacji i deaminacji, a uwolniony amoniak wiąże się z ninhydryną tworząc produkt barwy niebiesko-fioletowej.

Pozostałe fragmenty cząsteczek aminokwasów, zespolone z węglem **α**, noszą nazwę łańcuchów bocznych lub podstawników bocznych. Oznacza się je symbolem **R**. To one nadają aminokwasom ich indywidualne właściwości. Struktura łańcucha bocznego decyduje o roli aminokwasu w białku. Łańcuchy boczne różnią się bowiem składem pierwiastkowym, strukturą przestrzenną, wielkością, ładunkiem elektrycznym, zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych oraz reaktywnością chemiczną. W podstawnikach tych mogą występować: dodatkowa grupa aminowa, grupa amidowa, dodatkowa grupa karboksylowa, grupa –SH, grupa –S-CH3, grupa –OH, grupa guanidynowa oraz podstawniki pierścieniowe: fenylowy, hydroksyfenylowy, indolowy lub imidazolowy. Obecność tych grup sprawia, iż poszczególne aminokwasy można wykryć w materiale biologicznym prostymi metodami. Dotyczy to zarówno aminokwasów wolnych, jak i wchodzących w skład cząsteczki białka.

Pierścienie aromatyczne **fenyloalaniny**, **tyrozyny** i **tryptofanu** pod działaniem kwasu azotowego tworzą nitropochodne barwy żółtej. Proces ten nosi nazwę **reakcji ksantoproteinowej**.

**Tyrozyna**, podobnie jak i inne fenole, reaguje z odczynnikiem Millona, który jest roztworem azotanów (V) i azotanów (III) rtęci w kwasie azotowym. Nitrofenole, powstające z tyrozyny pod działaniem kwasu azotowego (V), tworzą z rtęcią kompleksy barwy czerwonej. Ogrzewanie mieszaniny, zawierającej wolną lub peptydowo związaną tyrozynę oraz odczynnik Millona, powoduje powstanie czerwonego osadu.

Aminokwasy zawierające siarkę: **cysteina** i **metionina**, w silnie alkalicznym środowisku ulegają degradacji uwalniając jony siarczkowe, które reagują z octanem ołowiu (II). Powstaje brunatno-czarny siarczek ołowiu (II).

Pierścień indolowy **tryptofanu** reaguje z kwasem glioksalowym w obecności kwasu siarkowego (VI), tworząc produkt o barwie czerwono-fioletowej. Kwas glioksalowy występuje (jako składnik zanieczyszczający) w handlowym preparacie stężonego kwasu octowego.

**Peptydy i białka**

Białka zbudowane są z L-α-aminokwasów połączonych **wiązaniami peptydowymi**. Dwa aminokwasy wiążą się ze sobą w wyniku reakcji grupy α-karboksylowej jednego z nich z grupą α-aminową drugiego. Odłącza się cząsteczka wody i powstaje wiązanie peptydowe. Produktem reakcji dwóch aminokwasów jest dipeptyd, zachowujący wolną grupę aminową jednego z aminokwasów i wolną grupę karboksylową drugiego z nich. Grupa karboksylowa dipeptydu może reagować z grupą aminową trzeciego aminokwasu tworząc następne wiązanie peptydowe. Tą drogą dipeptyd przekształca się w tripeptyd, itd. Peptydy złożone z kilku - kilkunastu aminokwasów to oligopeptydy, dłuższe - noszą nazwę polipeptydów. Polipeptyd zawierający ponad 100 reszt aminokwasowych jest nazywany białkiem.

Skład aminokwasowy białek jest bardzo zróżnicowany. Niektóre np. **albumina, białko jaja kurzego,** zawierają wszystkie aminokwasy budujące białka; inne np. **żelatyna** (zdenaturowany kolagen) nie zawierają cysteiny i tryptofanu, bądź zawierają jedynie znikome, niewykrywalne w naszych warunkach, ilości fenyloalaniny i tyrozyny.

**Wiązanie peptydowe** ma cechy wiązania podwójnego o konfiguracji *trans*. Tlen grupy C=O i wodór grupy N-H są skierowane w przeciwne strony. Atomy C i O grupy C=O oraz atomy N i H grupy N-H, wraz z sąsiednimi atomami węgli α, leżą w jednej płaszczyźnie. Struktura wiązań peptydowych przypomina wiązania występujące w prostym związku zwanym **biuretem**. Od niego wywodzi się nazwa **reakcji biuretowej**, charakterystycznej zarówno dla biuretu, jak i dla peptydów czy białek.

**Reakcja biuretowa** jest powszechnie stosowaną reakcją barwną, służącą do wykrywania oraz ilościowego oznaczania peptydów i białek. Jest ona charakterystyczna dla struktur, które posiadają, co najmniej dwa wiązania peptydowe. W obecności peptydu lub białka **odczynnik biuretowy**, będący roztworem CuSO4, NaOH i winianu sodowo-potasowego, zmienia barwę z niebieskiej na fioletową. W alkalicznym środowisku powstaje kompleks Cu2+ z peptydem lub białkiem oraz z winianem. Ten ostatni zwiększa rozpuszczalność całego kompleksu. Natężenie barwy jest proporcjonalne do stężenia białka w roztworze.

Strukturę białek można rozpatrywać na czterech „poziomach”. Są to struktury: pierwszorzędowa, drugorzędowa, trzeciorzędowa i czwartorzędowa. Trzy ostatnie są określane wspólną nazwą: **konformacja białka**. **Denaturacja białka** polega na zniszczeniu jego struktur przestrzennych z zachowaniem struktury pierwszorzędowej. Jedynie ciągłość łańcucha polipeptydowego pozostaje nienaruszona. Istotą denaturacji jest rozpad wiązań o niskiej energii, które stabilizują strukturę przestrzenną białka. Czynnikami denaturującymi są przede wszystkim: podwyższona temperatura (na ogół powyżej 58-60o C), rozpuszczalniki organiczne, kwasy, zasady, jony metali ciężkich (np. Hg2+, Pb2+), stężone roztwory mocznika lub chlorowodorku guanidyny. Zdenaturowane białko traci aktywność biologiczną, np. enzym traci swoje właściwości katalityczne, przeciwciało - zdolność wiązania antygenu, kolagen zdolność do tworzenia włókien, a hemoglobina zdolność do wiązania tlenu. Denaturacja białka na ogół zmienia jego rozpuszczalność. Białko rozpuszczalne traci rozpuszczalność a białko nierozpuszczalne staje się rozpuszczalnym. Białka rozpuszczalne w wodzie tworzą roztwory rzeczywiste lub koloidowe. Trwałość roztworów białek zależy głównie od ładunku elektrycznego cząsteczek, stopnia ich uwodnienia i temperatury. Białko, które wskutek działania czynnika denaturującego utraciło charakter koloidu, zwykle wypada z roztworu. Roztwory białek są na ogół **roztworami rzeczywistymi**, o mono-molekularnym stopniu dyspersji. Niekiedy jednak cząsteczki białek asocjują, tworząc agregaty złożone z dwu lub kilku cząsteczek. Roztwór białka przybiera wtedy cechy **roztworu koloidalnego**.

Białka wykazują **właściwości amfoteryczne**. Zachowują się w roztworze (zależnie od pH) jak kwasy lub zasady. Właściwość ta uwarunkowana jest głównie obecnością grup polarnych z ładunkiem elektrycznym w łańcuchach bocznych niektórych aminokwasów. Grupy **-NH2** wiążą jony **H+** obecne w roztworze zapobiegając zakwaszeniu, a protony odłączane w trakcie dysocjacji grup **-COOH** zobojętniają jony **-OH-**, zapobiegając jego alkalizacji. Ta właściwość aminokwasów, peptydów i białek ma istotne znaczenie w utrzymaniu **równowagi kwasowo-zasadowej** tkanek i płynów ustrojowych. Właściwości kwasowe nadają białku przede wszystkim grupy **β**-karboksylowe reszt kwasu asparaginowego i **γ**-karboksylowe reszt kwasu glutaminowego, które dysocjują uwalniając protony (H+) i tworząc ujemnie naładowane grupy –COO-. **Środowisko zasadowe** sprzyja dysocjacji grup karboksylowych i przechodzeniu białek w formę anionową. Właściwości zasadowe nadają białku grupy **ε**-aminowe reszt lizyny, grupy guanidynowe reszt argininy i pierścienie imidazolowe reszt histydyny. Mogą one wiązać protony (H+) nadając cząsteczce białka ładunek dodatni. **Środowisko kwaśne** sprzyja wiązaniu protonów przez wyżej wymienione grupy i przechodzeniu białka w formę kationową.

Pojedyncze grupy α-aminowe i α-karboksylowe, występujące w aminokwasach N-końcowych i C-końcowych, mają niewielki wpływ na sumaryczny ładunek elektryczny cząsteczki białka. Każde białko ma charakterystyczną dla siebie wartość pH, w której liczba ładunków dodatnich i ujemnych na powierzchni cząsteczki równoważy się nawzajem. Tę wartość pH nazywamy punktem **izoelektrycznym - pI**. W punkcie izoelektrycznym sumaryczny ładunek elektryczny cząsteczki białka równa się zeru. W tych warunkach białko nie przemieszcza się w polu elektrycznym, a jego rozpuszczalność jest najmniejsza.

W środowisku o **pH wyższym od punktu izoelektrycznego** białka wykazują **ujemny** ładunek wypadkowy i mogą tworzyć związki z kationami metali ciężkich. Oddziaływanie kwaśne utrudnia przebieg tych reakcji, gdyż dysocjacja grup karboksylowych zostaje cofnięta. Białko traci właściwości anionowe i nie reaguje z kationami. W środowisku o **pH niższym od punktu izoelektrycznego** wypadkowy ładunek białka staje się **dodatni**. Protony pochodzące z dysocjacji kwasów obecnych w roztworze wiążą się z grupami aminowymi, tworząc dodatnio naładowane grupy NH3+. Białko, w postaci kationowej, można wytrącić z roztworu odczynnikami alkaloidowymi, które są nośnikami ładunku ujemnego. Należą do nich między innymi kwasy: sulfosalicylowy i pikrynowy, oraz heksacyjanożelazian. Odczynniki alkaloidowe zawdzięczają nazwę swoją zdolności do wytrącania alkaloidów z roztworów. Alkaloidy są to azotowe związki organiczne o charakterze słabych zasad. Niektóre z nich wykazują aktywność farmakologiczną (np. morfina).

Białka można oddzielić od związków drobnocząsteczkowych w procesie zwanym **dializą**. Do tego celu stosuje się worki dializacyjne sporządzone z błony półprzepuszczalnej (np. z celofanu). Związki drobnocząsteczkowe, znajdujące się w roztworze zawartym wewnątrz worka, przenikają do wody otaczającej worek, dążąc do wyrównania stężeń po obydwu stronach błony. Natomiast związki wielkocząsteczkowe, np. białka, nie przechodzą przez błony półprzepuszczalne.

Wyraźny wpływ na rozpuszczalność białek mają niektóre sole obojętne np. siarczan amonu, chlorek sodu. Niskie stężenia tych soli zwiększają rozpuszczalność wielu białek. Postępujący wzrost stężenia soli w roztworze powoduje dehydratację białek, a w konsekwencji obniża ich rozpuszczalność. Przy odpowiednio wysokich stężeniach soli można całkowicie wytrącić białka z roztworu. Zjawisko to nosi nazwę **wysalania**. Jest to jedna z metod frakcjonowania białek. Białka surowicy krwi można rozdzielić przez wysalanie siarczanem amonu - (NH4)2SO4. Zarówno jony NH4+jak iSO42- mają bardzo duże powinowactwo do cząsteczek wody i odrywają je od otoczki hydratacyjnej białka. Globuliny wytrącają się z roztworu przy 50% nasyceniu siarczanem amonu, natomiast albuminy przy całkowitym wysyceniu roztworu tą solą.

***Cel ćwiczenia:*** *Poznanie niektórych właściwości aminokwasów i białek w roztworach, pomiar stężenia białka*

**Wykonanie**

**1. Reakcja ninhydrynowa - wspólna dla wszystkich aminokwasów**

Do 1 ml rozcieńczonego, obojętnego **roztworu aminokwasu** dodać kilka kropli roztworu ninhydryny, a następnie ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez kilkadziesiąt sekund. Zaobserwować zmianę zabarwienia. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**2. Reakcje charakterystyczne dla poszczególnych aminokwasów**

**a. wykrywanie aminokwasów aromatycznych - próba ksantoproteinowa**

Do 1 ml **roztworu** **albuminy** dodać 0,5 ml stężonego kwasu azotowego (V) i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez około 30 sekund. W miarę ogrzewania powstaje żółte zabarwienie, które pogłębia się po dodaniu kilku kropli 20% roztworu NaOH. Powtórzyć próbę z roztworem **żelatyny** i porównać wyniki. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**b. wykrywanie aminokwasów siarkowych – próba cysteinowa**

Do 0,5 ml **roztworu albuminy** i do 0,5 ml roztworu **żelatyny** dodać po 10 kropli 20% roztworu NaOH i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez minutę. Następnie, do obu probówek dodać po 1-2 krople roztworu octanu ołowiu (II). Tylko roztwór albuminy barwi się na kolor brunatny lub czarny wskutek powstania zawiesiny siarczku ołowiu (II). Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**3. Wykrywanie wiązania peptydowego - próba biuretowa**

Do 1,0 ml **roztworu albuminy** dodać 0,5 ml 2M NaOH, a następnie kroplami dodawać roztwór siarczanu miedzi (II). Płyn zmienia zabarwienie z niebieskiego na fioletowe. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**4. Denaturacja termiczna białek**

Ogrzać we wrzącej łaźni wodnej 1 ml roztworu **albuminy**. Płyn opalizuje, lecz osad nie powstaje. Zawartość probówki oziębić i dodawać stopniowo kroplami 1% kwas octowy. Początkowo powstaje osad, który rozpuszcza się w nadmiarze kwasu octowego. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**5. Wytrącanie białek alkoholem etylowym**

Ochłodzić, przez zanurzenie w mieszaninie wody z lodem, w oddzielnych probówkach 1 ml **surowicy krwi** i 5 ml 96% etanolu. Następnie zmieszać oba płyny. Zaobserwować wypadanie białka z roztworu. Odsączyć wytrącone białko i rozpuścić je (na sączku) w wodzie destylowanej.

Wykonać drugą, taką samą próbę bez chłodzenia, a mieszaninę surowicy krwi z etanolem pozostawić w temperaturze pokojowej przez godzinę i następnie przesączyć. Powstały osad nie powinien rozpuszczać się w wodzie. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**6. Działanie stężonego kwasu azotowego na białko**

Wlać do probówki 1 ml stężonego kwasu azotowego (V), a potem ostrożnie, po ściance pochylonej probówki wprowadzić podobną objętość **roztworu albuminy** (unikać zmieszania obu płynów). Na granicy obydwu płynów powstaje biało-żółta warstwa zdenaturowanego białka. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**7. Wytrącanie białek stężonymi roztworami soli - wysalanie**

Do 3 ml nierozcieńczonej **surowicy krwi** dodać 3 ml nasyconego roztworu siarczanu amonu i wymieszać. Przesączyć przez suchy sączek do suchej probówki. Na sączku pozostaną wytrącone globuliny, natomiast albuminy znajdą się w roztworze. Sączek należy przenieść do innej probówki i osad globulin rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej (potrzebna do ich rozpuszczenia ilość soli znajduje się na sączku) – globuliny przejdą do roztworu. Wykonać próbę biuretową na obecność białka w tym roztworze. Odmierzyć 0,5 ml przesączu globulin i dodać 2 ml odczynnika biuretowego.

Przesącz zawierający albuminy podzielić na dwie części. Z jedną wykonać próbę biuretową. Drugą przenieść do małej szalki Petriego i dodawać siarczan amonu (w substancji), który należy rozcierać (używając zatopionego końca probówki) aż do zupełnego wysycenia roztworu. Przesączyć a otrzymany przesącz poddać próbie biuretowej. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**8. Amfoteryczne właściwości białek**

Do dwóch probówek dodać po 2 ml wody i po 3 krople błękitu tymolowego, który jest wskaźnikiem pH. Do jednej z nich dodać kroplami 0,02M NaOH, aby płyn przybrał barwę niebieską (środowisko alkaliczne), a do drugiej 0,02M HCl, aby wystąpiła wyraźna barwa czerwona (środowisko kwaśne). Należy unikać nadmiaru NaOH i HCl. Do obydwu probówek należy dodawać kroplami tyle roztworu białka - **surowicy krwi**, aby zobojętnić zarówno kwas, jak i zasadę, co można stwierdzić przez zmianę zabarwienia błękitu tymolowego (wskaźnika pH) do stanu wyjściowego. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**9. Wytrącanie białka anionowego solami metali ciężkich**

**a**. **próba z jonem Fe3+**

Do 1,5 ml **roztworu** **białka** dodawać kroplami 0,2M FeCl3. Powstaje osad, który rozpuszcza się w miarę dalszego dodawania odczynnika. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**b**. **próba z jonem Pb2+**

Do 1,5 ml **roztworu** **białka** dodawać kroplami roztwór octanu ołowiu (II). Wytrąca się osad. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**10. Wytrącanie białka kationowego odczynnikami alkaloidowymi**

**a. próba z heksacyjanożelazianem**

Do 1,5 ml **roztworu białka**, zakwaszonego kilkoma kroplami 1% kwasu octowego, dodać kilka kropli heksacyjanożelazianu (III) potasu. Powstaje biały osad. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**11. Dializa**

Do probówki dodać 3 ml surowicy krwi, 3 ml 0,9% NaCl i 3 ml 10% roztworu glukozy. Wymieszać zawartość probówki i przelać do worka dializacyjnego. Worek należy zawiązać i przymocować do bagietki szklanej. Ułożyć bagietkę poziomo na krawędzi zlewki o pojemności 200 ml i dodać tyle wody destylowanej, aby jej poziom zrównał się z poziomem płynu w worku dializacyjnym. Zawartość zlewki mieszać, co 10-15 minut przez delikatne wstrząsanie lub poruszanie workiem. Po 2 godzinach wykonać próby na obecność chlorków i białka w dializowanym roztworze (pobranym z wnętrza worka dializacyjnego) oraz w płynie dializacyjnym. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**a. próba na obecność chlorków**

Przygotować dwie probówki. Do pierwszej przenieść 1 ml dializowanego roztworu, a do drugiej 1 ml płynu dializacyjnego. Do obydwu dodać po 2 krople 0,1M AgNO3 i wymieszać. Jony chlorkowe reagują z jonami srebra tworząc nierozpuszczalny, opalizujący AgCl. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**b. próba na obecność białka - próba biuretowa**

Przygotować dwie probówki. Do pierwszej przenieść 1 ml dializowanego roztworu, a do drugiej 1 ml płynu dializacyjnego. Do obu probówek dodać 0,5 ml 2M NaOH, a następnie 10 kropli siarczanu miedzi (II). Porównać zabarwienia. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu.

**12. Ilościowe oznaczanie białka metodą biuretową**

a) Wykres kalibracyjny albuminy wołowej

Wzorzec albuminy należy rozcieńczyć wodą wg tabeli I. Następnie do każdej probówki dodać po 2 ml odczynnika biuretowego i dokładnie wymieszać. Próby odstawić na 20 minut w temperaturze pokojowej.

Ekstynkcję zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 550 nm. W zeszycie sporządzić tabelę I. Wpisać w odpowiedniej kolumnie w tabeli wartości ekstynkcji (E550) odczytane na spektrofotometrze.

**Tabela I.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr próby | Objętość 1% r-ru wzorca  [ml] | Objętość  H2O  [ml] | Objętość odczynnika biuretowego [ml] | Stężenie białka [mg/ml] | Wartość  E550 |
| 0 | - | 0,5 | 2 | 0 |  |
| 1 | 0,1 | 0,4 | 2 | 2 |  |
| 2 | 0,2 | 0,3 | 2 | 4 |  |
| 3 | 0,3 | 0,2 | 2 | 6 |  |
| 4 | 0,4 | 0,1 | 2 | 8 |  |
| 5 | 0,5 | - | 2 | 10 |  |

W zeszycie sporządzić wykres kalibracyjny dla albuminy wołowej na podstawie zmierzonych absorbancji (oś rzędnych) oraz stężenia białka w próbach (oś odciętych).

b) Oznaczenie stężenia białka w badanej próbie

Do 0,5 ml próby badanej dodać 2 ml odczynnika biuretowego i dokładnie wymieszać. Próby odstawić na 20 minut w temperaturze pokojowej. Ekstynkcję zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 550 nm. wobec próby „0”. Roztwory zawierające białko przybierają barwę fioletową, której intensywność narasta w czasie, osiągając maksimum po upływie 20 minut.

Stężenie białka odczytać z wykresu kalibracyjnego. Wnioski i obserwacje wpisać do zeszytu