

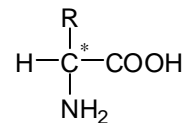
Oznaczanie białka całkowitego w płynach ustrojowych metodą biuretową

Wprowadzenie

Termin białko pochodzi od greckiego słowa *proteios* = pierwszorzędny. Takie jest jego znaczenie praktycznie we wszystkich procesach biologicznych:

- prawie wszystkie enzymy są białkami,
- białka biorą udział w transporcie (np. hemoglobina) i magazynowaniu (np. ferrytyna) małych cząsteczek i jonów,
- białka są głównymi składnikami mięśni,
- białkami są przeciwciała,
- białka mają istotny wpływ na tworzenie, wzrost i naprawę uszkodzonych tkanek.

Białka zbudowane są z aminokwasów. Każdy aminokwas zbudowany jest z grupy karboksylowej COOH, aminowej NH₂, atomu wodoru i łańcucha bocznego R.



Tetraedryczny atom węgla α powoduje, że aminokwasy są związkami optycznie czynnymi. Białka zbudowane są wyłącznie z 20 L-aminokwasów, niezależnie od tego czy bierzemy pod uwagę bakterie, czy bardziej skomplikowane organizmy jakim jest organizm człowieka.

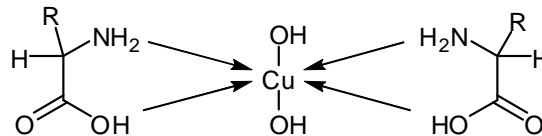
Wzrost poziomu białka może być rezultatem chorób kości lub poważnego odwodnienia. Obniżenie poziomu białka zauważa się w uszkodzeniach nerek, zatrzymywaniu soli w organizmie, w przypadku ciężkich oparzeń.

Metodami pozwalającymi na ilościowe oznaczenie białka w roztworze są m.in.:

- metoda biuretowa
- metoda Lowry'ego
- metoda Bradford
- pomiar absorbancji w nadfiolecie

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest ilościowe oznaczenie białka całkowitego metodą biuretową. W metodzie tej wykorzystuje się zdolność kompleksowania wiązania peptydowego z jonami miedzi (II) z rozcieńczonego roztworu siarczanu (VI) miedzi. W środowisku zasadowym kompleks przyjmuje barwę fioletową i charakteryzuje się maksimum absorpcji przy 546nm.



Natężenie barwy jest proporcjonalne do zawartości białka w badanej próbce.

Sprzęt i materiały:

- Wzorcowy roztwór albuminy o stężeniu 8 g/dl,
- Surowica krwi ludzkiej,
- Zestaw diagnostyczny do oznaczania stężenia białka całkowitego

Lquick Cor-TOTAL PROTEIN-skład:

- Siarczan (VI) miedzi 12 mmol/l
 - Winian sodowo-potasowy 30 mmol/l
 - Jodek potasu 30 mmol/l
 - Wodorotlenek sodu 200 mmol/l
- 6 Probówek typu eppendorf,
 - Pipety automatyczne, końcówki do pipet,
 - 1 Kuweta polistyrenowa (poj. 800 µl) do pomiarów spektrofotometrycznych (d = 10 mm),
 - Wyrząsarka typu Vortex,
 - Spektrofotometr UV-Vis SP-830 *PLUS* lub Spectroquant® Pharo 100/300.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Próba zerowa: odczynnik do oznaczeń pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Do kuwety pobrać 800 µl. Wykonać pomiary absorbancji przy długości fali 546 nm.

2. Próba wzorcowa: do próbki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie dodać 20µl roztworu wzorcowego. Wymieszać i pozostawić na 5 min. Przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 546 nm względem próby zerowej jako próby odniesienia. Pomiar wykonać trzykrotnie.
3. Próbką badana: do próbki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie dodać 20µl roztworu badanego. Wymieszać i pozostawić na 5 min. Przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 546 nm względem próby zerowej jako próby odniesienia. Pomiar wykonać trzykrotnie.

Próba Składnik próbki	Zerowa (PZ)	Wzorcowa (PW)	Badana (PB)
Odczynnik do oznaczeń	800 µl	1 ml	1 ml
Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej			
Roztwór wzorcowy	---	20µl	---
Roztwór badany	---	---	20µl
Wymieszać i pozostawić na 5 min. w temperaturze pokojowej. Przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Trzykrotnie wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 546 nm względem próby zerowej jako próby odniesienia. Absorbancja jest stabilna przez 30min.			

Opracowanie wyników:

- Obliczyć stężenie białka w badanej próbce korzystając ze wzoru:

$$\text{Stężenie białka} = A(\text{PB}) / A(\text{PW}) \times \text{stężenie wzorca}$$

WARTOŚCI PRAWDŁOWE (surowica)

Wcześniejsi	1 dzień	3.4-5.0 g/dl
dzieci	≤4 tygodnie	4.6-6.8 g/dl

	2-12 miesięcy	4.8-7.6 g/dl
	≥1 rok	6.0-8.0 g/dl
dorośli		6.6-8.7 g/dl

Zalecane jest opracowanie przez każde laboratorium własnych zakresów wartości prawidłowych charakterystycznych dla lokalnej populacji.

- Przeprowadzić analizę statystyczną wyników, obliczając średnią zawartość białka w próbce, odchylenie standardowe oraz procentowy błąd oznaczenia.

Literatura uzupełniająca:

1. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN Warszawa 1996.
2. L. Kłyszejko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN Warszawa 1999.
3. L. Stryer, *Biochemia*, PWN Warszawa 1999.

Zagadnienia:

1. Białka (budowa, znaczenie w procesach biologicznych, wpływ poziomu białka w surowicy na kondycję organizmu).
2. Spektrofotometria UV-Vis (prawa absorpcji i odchylenia od tych praw, aparatura).
3. Metody pozwalające na ilościowe oznaczanie białka w roztworze.
4. Opracowanie wyników i ich ocena statystyczna.