

ODBIALCZANIE PRÓBEK BIOLOGICZNYCH JAKO NIEZBĘDNY ETAP ICH PRZYGOTOWANIA DO ANALIZY

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

Zakres obowiązującego materiału – wymagania wstępne:

- znajomość praw absorpcji,
- znajomość elementów budowy aparatury pomiarowej, w tym spektrofotometru jedno- i dwuwiązkowego,
- umiejętność wykorzystania spektrofotometrii w analizie jakościowej oraz ilościowej,
- znajomość zasad pomiaru z wykorzystaniem spektrofotometru jedno- i dwuwiązkowego.

1. Wprowadzenie

Przygotowanie próbki do analizy uznawane jest za jeden z najważniejszych i jednocześnie najtrudniejszych etapów całego procesu analitycznego (Rysunek 1). Uzyskanie miarodajnego wyniku analizy w dużej mierze zależy od sposobu pobrania i przygotowania materiału do badań. Co więcej, uważa się, że jest to najbardziej czasochłonny i pracochłonny, lecz niezbędny, etap postępowania analitycznego. Wykorzystywane na etapie analizy techniki analityczne nie są na tyle uniwersalne, aby umożliwiły określenie składu próbki i zawartości poszczególnych jej składników bez konieczności poddania jej etapom wstępnego oczyszczania czy wzbogacania. Nierzadko na proces ten składa się wiele etapów, co pociąga za sobą ryzyko popełnienia błędów przez analityka. Powszechnie przyjmuje się, że odsetek błędów związanych z etapem przygotowania próbki do analizy może wynosić nawet 30% całkowitego błędu! Stąd tak istotne staje się projektowanie procedur (metod) charakteryzujących się prostotą wykonania, których zastosowanie umożliwia poddanie analizowanego materiału niezbędnym procesom, aby finalnie spełniał on wymagania wykorzystywanej na etapie analizy końcowej techniki pomiarowej.

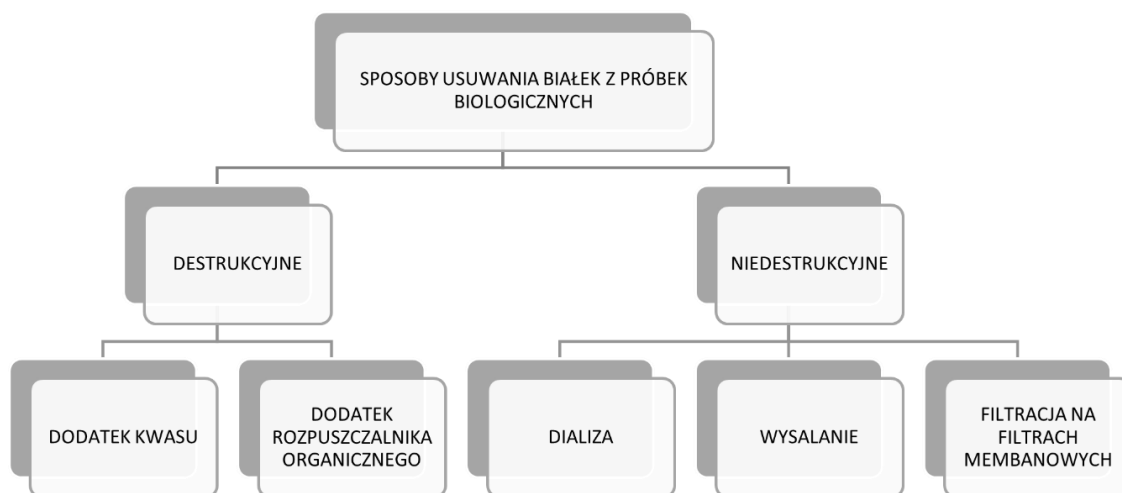


Rysunek 1. Schemat obrazujący etapy procesu analitycznego. Materiały własne.

2. Odbiałczanie próbek

Składnikiem większości próbek biologicznych, także tych o znaczeniu diagnostycznym (krew, osocze, ślina czy moczu) są białka, czyli wielkocząsteczkowe biopolimery będące głównym budulcem żywych organizmów [1]. Prawie zawsze ich obecność w materiale poddawany analizie metodami opartymi na wykorzystaniu technik separacji w fazie ciekłej i gazowej jest niepożądana, ponieważ może prowadzić do powstania niedrożności w układzie pomiarowym, a w konsekwencji spadku jego sprawności. Z tego względu istnieje konieczność ich usunięcia na etapie przygotowania próbek do analizy.

Istnieje wiele sposobów umożliwiających usuwanie białek z płynnych próbek biologicznych. Zasadniczo można je podzielić na dwie grupy, a mianowicie metody destrukcyjne i niedestrukcyjne (Rysunek 2), czyli nie uszkadzające struktury białka. Te pierwsze umożliwiają oddzielenie białek od pozostałych składników próbki poprzez zastosowanie dodatku odczynników chemicznych, takich jak kwasy (np. kwas chlorowy(VII) lub trichlorooctowy) czy rozpuszczalniki organiczne (np. acetonitryl lub metanol). Do metod niedestrukcyjnych możemy zaliczyć dializę, wysalanie (np. siarczanem(VI) amonu) czy filtrację na filtrach membranowych, np. typu *cut-off* czy strzykawkowych [1-3].



Rysunek 2. Klasyfikacja sposobów usuwania białek z próbek biologicznych. Opracowanie własne na podstawie [1-3].

Literatura uzupełniająca

- [1] Piechocka Justyna, Pietrzyk Daria, Głowacki Rafał, Sposoby odbiałczania płynnych próbek biologicznych, *Analityka: nauka i praktyka* 2020 (1) 38-42.

- [2] White, Christophe, Deproteination of blood plasma in human body for serum analysis, *Journal of Proteomics & Bioinformatics* 2022 (15) 1–2.
- [3] Kłyszajko-Stefanowicz Leokadia, *Ćwiczenia z Biochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2013.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Celem ćwiczenia jest zbadanie wpływu wybranych czynników na efektywność procesu usuwania białek z płynnych próbek biologicznych przy wykorzystaniu techniki spektrofotometrii UV-VIS.

I.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny

- spektrofotometr UV-VIS (analityczna długość fali 280 nm);
- kuweta kwarcowa 1 cm, 2 sztuki;
- waga analityczna;
- wirówka laboratoryjna;
- zestaw pipet automatycznych wielomiarowych o pojemności w zakresie 10 - 100 μ l, 100 -1000 μ l oraz 1 - 5 ml.

I.2. Odczynniki

- 5 mg/ml albumina jaja kurzego (Alb) (około 200 ml);
- woda dejonizowana (około 100 ml);
- acetonitryl (ACN) (około 25 ml);
- metanol (MeOH) (około 25 ml);
- 0,9% chlorek sodu (sól fizjologiczna) (około 50 ml);
- 3 mol/l kwas chlorowy(VII) (PCA) (około 10 ml);
- 10% kwas trichlorooctowy (TCA) (około 10 ml);
- 40% siarczan(VI) amonu (około 50 ml);
- siarczan(VI) amonu (około 3 g).

I.3. Materiały

- filtry z membraną PES typu *cut-off* 30 kDa, 3 sztuki;
- filtry z membraną nylonową o wielkości porów 0,2 μ m, 3 sztuki;

- strzykawka o pojemności 5 ml, 1 sztuka;
- probówki polipropylenowe o pojemności 2 ml, 120 sztuk;
- probówki typu Falcon o pojemności 15 ml, 24 sztuki;
- łoPATKA wagowa, 1 sztuka;
- statyw na probówki o pojemności 2 ml oraz próbki typu Falcon;
- zestaw końcówek do pipet automatycznych wielomiarowych o pojemności w zakresie 10 - 100 μ l, 100 -1000 μ l oraz 1 - 5 ml;
- zlewka o pojemności 100 ml, 1 sztuka;
- nożyczki;
- pojemnik na odpady;
- lignina / ręcznik papierowy;
- marker laboratoryjny.

II. Wymagane środki ostrożności

- W trakcie wykonywania ćwiczenia Student zobowiązany jest do noszenia odzieży ochronnej (fartuch laboratoryjny, okulary ochronne oraz rękawiczki), a także do przestrzegania zasad BHP oraz regulaminu pracowni.
- Podczas wykonywania ćwiczenia Student powinien postępować zgodnie z wytycznymi przedstawionymi przez prowadzącego zajęcia.
- Identyfikacja zagrożeń*:

* opracowanie na podstawie kart charakterystyki substancji dostępnych na stronie www.sigmaaldrich.com (data dostępu 29.03.2023)

- ✓ **acetonitryl** (ACN) – wysoce łatwopalna ciecz i pary. Działa drażniąco na oczy oraz może powodować ich uszkodzenie. Działa szkodliwie w kontakcie ze skórą. Może powodować podrażnienie dróg oddechowych. Działa toksycznie po połyknięciu.



- ✓ **metanol** (MeOH) - wysoce łatwopalna ciecz i pary. Działa toksycznie po połyknięciu. Działa toksycznie w kontakcie ze skórą. Działa toksycznie w następstwie wdychania. Powoduje uszkodzenie narządów.



- ✓ **kwas chlorowy(VII)** (PCA) – łatwopalna ciecz. Działa szkodliwie po połknięciu. Powoduje oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. Może powodować uszkodzenie narządów (tarczyca) poprzez długotrwałe narażenie na jego działanie.



- ✓ **kwas trichlorooctowy** (TCA) – powoduje oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. Może powodować podrażnienie dróg oddechowych. Działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.



- ✓ **albumina** (Alb) - może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.



III. Wykonanie ćwiczenia

Przygotowanie próbek do analizy

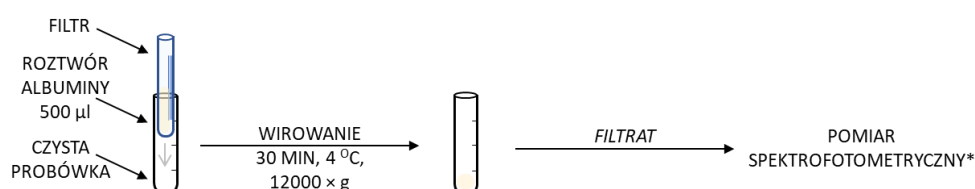
Podczas wykonywania ćwiczenia należy postępować zgodnie, ze schematycznie przedstawionymi poniżej, procedurami. Każdorazowo, podczas badania wpływu wybranego czynnika na efektywność procesu odbiałczania próbek, należy przygotować próbki w trzech seriach pomiarowych. Wyłącznie takie podejście umożliwi uzyskanie miarodajnych (precyzyjnych i dokładnych) wyników pomiarów.

1. Próba niepoddana odbiałczaniu (próba kontrolna)

Analizie należy poddać roztwór wzorcowy Alb o stężeniu 5 mg/ml stosując jako roztwór odniesienia (ślepa próba) sól fizjologiczną (0,9% roztwór chlorku sodu).

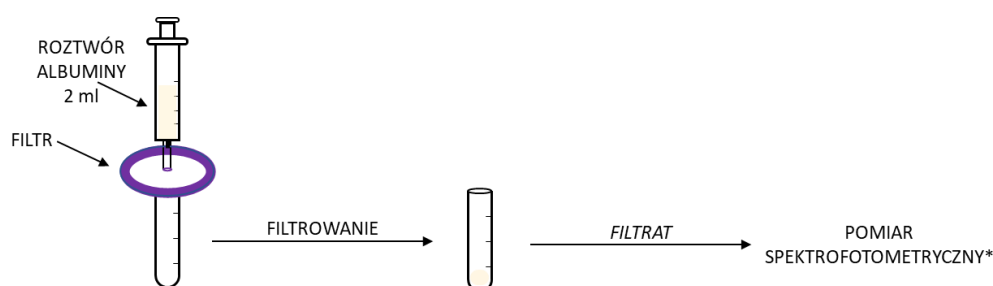
2. Odbiałczanie próbek na drodze ultrafiltracji z użyciem filtrów membranowych typu *cut-off*

W pierwszej kolejności, filtry membranowe typu *cut-off* należy poddać kondycjonowaniu poprzez zanurzenie w wodzie dejonizowanej (30 minut, 25 °C). Po tym czasie, filtry należy delikatnie osuszyć, poprzez usunięcie nadmiaru wody, jednocześnie nie dopuszczając do przesuszenia się membrany. Do tak przygotowanych filtrów wprowadzić próbkę i podstępować zgodnie z procedurą zobrażowaną na poniższym schemacie.



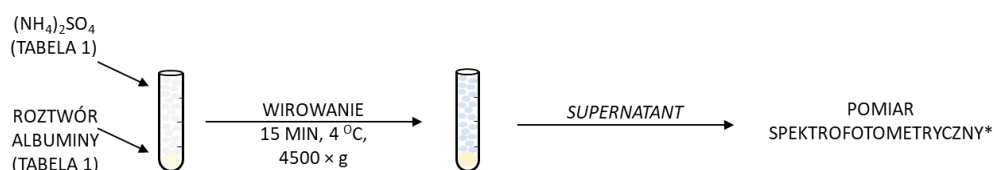
*ROZTWÓR ODNIESIENIA (ŚLEPA PRÓBA): 0,9% ROZTWÓR NaCl (SÓL FIZJOLOGICZNA)

3. Odbiałczanie próbek na drodze filtracji z użyciem filtrów membranowych (strzykawkowych)



*ROZTWÓR ODNIESIENIA (ŚLEPA PRÓBA): 0,9% ROZTWÓR NaCl (SÓL FIZJOLOGICZNA)

4. Odbiałczanie próbek na drodze wysalania siarczanem(VI) amonu



*ROZTWÓR ODNIESIENIA (ŚLEPA PRÓBA): WODA DEJONIZOWANA

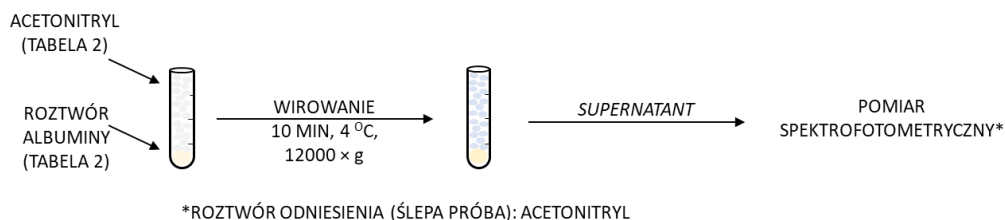
Tabela 1. Sposób przygotowania próbek poddanych wysoleniu.

Stężenie soli w próbce [%]	Objętość roztworu wzorcowego Alb [ml]	Objętość roztworu (NH ₄) ₂ SO ₄ / masa (NH ₄) ₂ SO ₄
10	1,00	0,33 ml
15	1,00	0,60 ml
20	1,00	1,00 ml
25	1,00	1,66 ml
30	1,00	3,00 ml
35	1,00	7,00 ml
40	1,00	0,70752 g

Objaśnienia: **Alb** albumina.

W analogiczny sposób należy przygotować próbki w przypadku, gdy zamiast (NH₄)₂SO₄ dodano wodę (próby odniesienia). Próbki, w których stężenie soli mieści się w zakresie od 10 do 20% przygotować w probówkach polipropyleonowych o pojemności 2 ml. W pozostałych przypadkach należy skorzystać z probówek typu Falcon.

5. Odbiałczanie próbek na drodze dodatku rozpuszczalnika organicznego

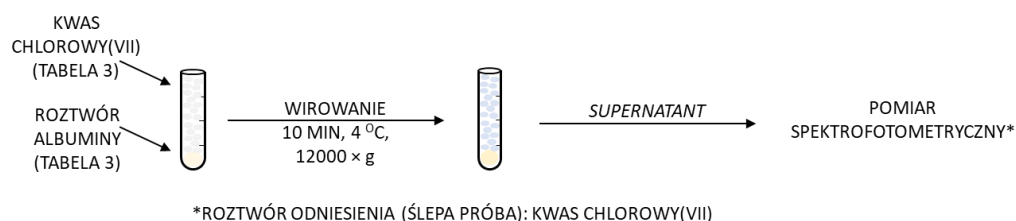
**Tabela 2.** Sposób przygotowania próbek poddanych działaniu rozpuszczalnika organicznego.

Stosunek objętościowy V _{Alb} : V _{ACN}	Objętość roztworu wzorcowego Alb [ml]	Objętość ACN [ml]
1:1	1,00	1,00
1:2	0,50	1,00
1:3	0,50	1,50
1:4	0,25	1,00
1:5	0,25	1,25

Objaśnienia: **Alb** albumina, **ACN** acetonitryl.

W analogiczny sposób należy przygotować próbki, w przypadku, gdy zamiast ACN dodano MeOH bądź wodę (próby odniesienia).

6. Odbiałczanie próbek na drodze dodatku kwasu



W analogiczny sposób należy przygotować próbki, w przypadku, gdy zamiast 3 mol/l PCA dodano 10% TCA bądź wodę (próbki odniesienia).

Tabela 3. Sposób przygotowania próbek poddanych działaniu dodatku kwasu.

Stosunek objętościowy $V_{\text{Alb}} : V_{\text{PCA}}$	Objętość roztworu wzorcowego Alb [ml]	Objętość kwasu [ml]
1:0,1	1,00	0,10
1:0,2	1,00	0,20
1:0,25	1,00	0,25
1:0,33	1,00	0,33
1:0,5	1,00	0,50
1:1	1,00	1,00

Objaśnienia: **Alb** albumina, **PCA** kwas chlorowy(VII).

Przygotowane próbki należy ostrożnie odstawić na stojak, aby ich zawartość nie uległa wymieszaniu. Zebrany *supernatant* (roztwór z nad osadu) / filtrat należy przenieść do czystej i suchej kuwety kwarcowej używając w tym celu pipety automatycznej (około 1 ml). Kuwetę z próbką badaną oraz kuwetę z odpowiednim roztworem odniesienia – ślepa próba (patrz schemat powyżej) umieścić w przeznaczonym do tego miejscu układu pomiarowego. Następnie wykonać pomiar absorbancji każdej z przygotowanych próbek, wykorzystując spektrofotometr dwuwiązkowy rejestrujący widmo spektrofotometryczne w zakresie 190 – 400 nm (zbierając sygnał co 1 nm). Wielkość sygnału analitycznego Alb należy odczytać przy 280 nm.

IV. Opracowanie i dyskusja wyników

1. Zinterpretować otrzymane wyniki przeprowadzając analizę jakościową zarejestrowanych widm. Zestawić uzyskane wyniki w tabeli, której wzór zamieszczono poniżej.
2. Wykreślić zależność uśrednionej wartości absorbancji analizowanych roztworów w funkcji stężenia soli w próbce (usuwanie białek na drodze wysalania) / stosunku objętościowego Alb i odpowiedniego rozpuszczalnika (usuwanie białek na drodze dodatku rozpuszczalnika organicznego / kwasu). Na wykresach nanieść słupki błędów odnoszące się do wyznaczonej wielkości odchylenia standardowego oznaczeń z trzech serii pomiarowych.
3. Zinterpretować uzyskane wyniki i odpowiedzieć na następujące pytania:
 - Który/-e spośród rozpatrywanych sposobów usuwania białek z próbek biologicznych umożliwił całkowite usunięcie białka z roztworu?
 - Którą/-e z rozpatrywanych metod usuwania białek z próbek biologicznych uważa Pan/-i za najbardziej efektywną/-e? Odpowiedź proszę krótko uzasadnić.
 - Jakie zalety i ograniczenia wykazują wykorzystane metody odbiałczania próbek? Proszę wskazać co najmniej dwa przykłady w stosunku do każdej z metod.
 - Czy pomiary zostały przeprowadzone precyzyjnie? Co o tym świadczy? Jako kryterium akceptacji należy przyjąć wartości wyznaczonego parametru, charakteryzującego precyzję pomiarów, nieprzekraczającą 15%.

Prawidłowo przygotowane sprawozdanie powinno zawierać opis obserwacji poczynionych podczas prowadzenia doświadczenia, tabelę z zestawionymi w niej wynikami, wykresy sporządzone na podstawie uzyskanych wyników, interpretację wyników i wnioski.

Zestawienie uzyskanych wyników

Rodzaj próbki	Sposób usuwania białek	Absorbancja [AU]		
		Seria 1	Seria 2	Seria 3
Próba niepoddana odbiałczaniu				
Odbiałczanie próbek na drodze (ultra)filtracji				
PRÓBA BADANA	filtry z membraną PES typu <i>cut-off</i>			
	filtry z membraną nylonową (strzykawkowe)			
Odbiałczanie próbek na drodze wysalania siarczanem(VI) amonu				
	Stężenie soli w próbce [%]			
PRÓBA BADANA	10			
	15			
	20			
	25			
	30			
	35			
	40			
PRÓBA ODNIESEINIA	10			
	15			
	20			
	25			
	30			
	35			
	40			
Odbiałczanie próbek na drodze dodatku rozpuszczalnika organicznego				
	Stosunek objętościowy $V_{Alb} : V_{rozpuszczalnik\ organiczny}$			
PRÓBA BADANA -	1:1			
	1:2			

	1:3			
	1:4			
	1:5			
PRÓBA BADANA - MeOH	1:1			
	1:2			
	1:3			
	1:4			
	1:5			
PRÓBA ODNIESIENIA	1:1			
	1:2			
	1:3			
	1:4			
	1:5			
Odbiałczanie próbek na drodze dodatku kwasu				
	Stosunek objętościowy $V_{\text{Alb}} : V_{\text{kwas}}$			
PRÓBA BADANA – 3 mol/l PCA	1:0,1			
	1:0,2			
	1:0,25			
	1:0,33			
	1:0,5			
	1:1			
PRÓBA BADANA – 10% TCA	1:0,1			
	1:0,2			
	1:0,25			
	1:0,33			
	1:0,5			
	1:1			
PRÓB A ODNI ESIEN	1:0,1			
	1:0,2			

	1:0,25			
	1:0,33			
	1:0,5			
	1:1			