

## Rozdział 7

# Analiza składu aminokwasowego białek i peptydów

### 7.1. Zastosowania analizy składu aminokwasowego

Mianem „analiza składu aminokwasowego” określa się techniki analityczne pozwalające na oznaczenie stężenia indywidualnych aminokwasów w badanej próbce. Dotyczy to zarówno próbek zawierających aminokwasy w stanie wolnym (np. w płynach fizjologicznych, homogenatach tkanek, próbkach żywności czy paszach) jak i próbek, w których aminokwasy są związane w łańcuchy polipeptydowe tworząc konkretne białka lub peptydy. W tym drugim przypadku pomiar ilości poszczególnych aminokwasów jest poprzedzony hydrolizą, czyli procesem chemicznym lub enzymatycznym mającym na celu rozerwanie wiązań peptydowych i uwolnienie wolnych aminokwasów. Szczególnym przypadkiem jest tzw. całkowita analiza składu aminokwasowego próbki złożonej, obejmująca oznaczenie wszystkich aminokwasów wchodzących w skład próbki, zarówno wolnych jak i białkowych, mająca zastosowanie głównie w naukach o żywieniu.

Analiza składu aminokwasowego jest szeroko stosowaną techniką analityczną. W przypadku aminokwasów wolnych oznaczanie ich ilości jest wykorzystywane w biologicznych naukach podstawowych (badania nad szlakami metabolicznymi oraz transportem i funkcją metabolitów), w medycynie (diagnozowanie schorzeń metabolicznych, nauka o odżywianiu, farmakologia), w naukach rolniczych (problematyka żywienia zwierząt i produkcji pasz, porównywanie wartości odżywczej produktów roślinnych i zwierzęcych) oraz w szeroko pojętym przemyśle spożywczym i biotechnologicznym, służąc tam do charakterystyki żywności oraz oceny procesów technologicznych jakim ta żywność jest poddawana.

Natomiast określanie ilości poszczególnych aminokwasów budujących konkretne białka i peptydy jest bardzo przydatne w chemii białek, pozwalając przede wszystkim na najbardziej rzetelny wśród znanych metod pomiar stężenia badanego białka lub peptydu. Analiza aminokwasowa czystych białek i peptydów jest ponadto wykorzystywana do potwierdzania sekwencji zarówno nowo charakteryzowanych łańcuchów polipeptydowych jak i peptydów syntetycznych oraz białek rekombinantowych. Jest bardzo przydatna przy planowaniu

strategii fragmentacji nieznanego białka (pomaga wówczas oszacować liczbę miejsc cięcia), stosuje się ją przy charakterystyce dróg obróbki potranslacyjnej białek i wreszcie przy użyciu odpowiednich baz danych analiza aminokwasów pozwala z pewnym prawdopodobieństwem na identyfikację białka na podstawie jego unikalnego składu aminokwasowego.

## **7.2. Przegląd technik stosowanych w analizie aminokwasowej**

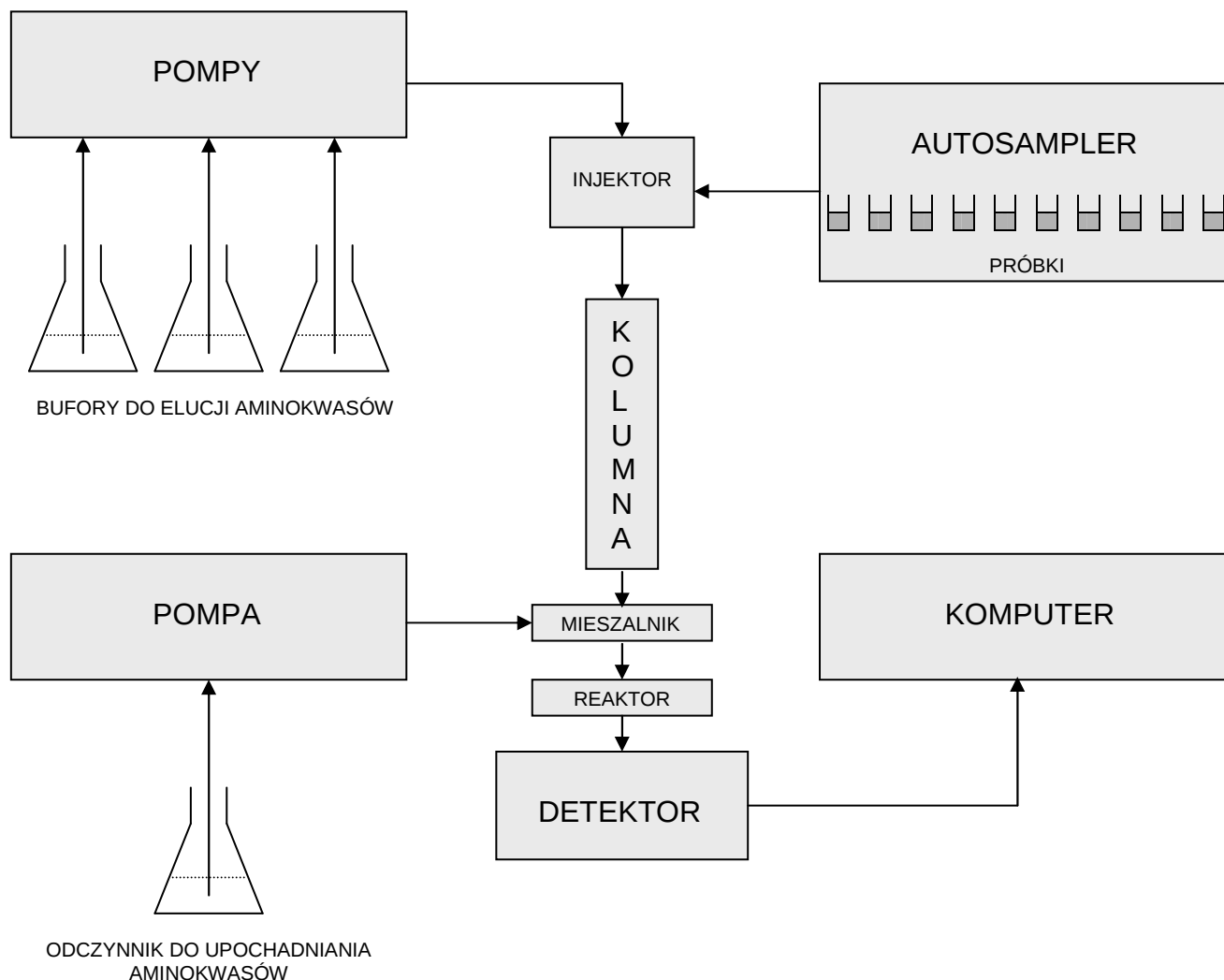
Idealna technika stosowana w analizie składu aminokwasowego powinna być ilościowa i powinna mieć dużą rozdzielczość oraz selektywność ze względu na znaczną liczbę oznaczanych aminokwasów. Ponadto, powinna charakteryzować się prostotą, szybkim czasem oznaczeń, wysoką czułością, wysoką powtarzalnością a zarazem możliwie niskim kosztem analiz. W niniejszym rozdziale omówiono najczęstsze, rutynowo stosowane w analizie aminokwasowej techniki, a mianowicie chromatografię cienkowarstwową, chromatografię kolumnową (jonowymienną, wysokociśnieniową, kapilarną i gazową), elektrochromatografię, elektroforezę kapilarną oraz techniki enzymatyczne. Dodatkowo krótko przedstawiono nowoczesną technikę analityczną opartą na tzw. mikrochipach. Każda z tych technik spełnia w różnym stopniu wymienione wyżej kryteria idealnej metody.

Najprostszą techniką stosowaną w analizie składu aminokwasowego jest chromatografia cienkowarstwowa. Jest ona stosowana powszechnie przy badaniach przesiewowych zaburzeń metabolicznych noworodków, a szczególnie w diagnozowaniu fenyloketonurii. Metoda wykorzystuje dwukierunkowe rozwijanie chromatogramu na płytce szklanej pokrytej warstwą żelu krzemionkowego, lecz stosuje się również płytki pokryte tlenkiem glinu, proszkami celulozowymi lub celulozowymi wymiennicami jonowymi. Detekcja odbywa się po rozpyleniu na płytkę roztworu ninhidryny i bezpośrednią obserwację otrzymanego układu czerwono-fioletowych plam, bądź też płytkę natryskuje się roztworami fluoreskaminy lub aldehydu *o*-ftalowego (OPA) i obserwuje fluoryzujące plamy w świetle ultrafioletowym. Technika ta pozwala na szybką jakościową i w mniejszym stopniu ilościową ocenę obecności danych aminokwasów w próbce moczu lub osocza krwi. Metoda ta nie jest szczególnie precyzyjna ani czuła lecz w zupełności spełnia kryteria szybkiego i taniego testu przesiewowego, nie wymagającego właściwie żadnego zaplecza aparaturowego ani skomplikowanych procedur przygotowania próbki.

Inne techniki analizy aminokwasowej są już technikami aparaturowymi. Historycznie najstarszą, lecz współcześnie nadal szeroko stosowaną techniką jest chromatografia

jonowymienia, zastosowana do oznaczania aminokwasów po raz pierwszy przez S. Moore'a i W.H. Stein'a w roku 1948. W technice tej mieszanina aminokwasów jest rozdzielana na termostatowanej kolumnie ze złożem jonowymiennym. Początkowo stosowano układ dwóch kolumn oraz elucję izokratyczną z użyciem od trzech do sześciu buforów o różnym pH, a współcześnie najpowszechniejsza jest ciągła, liniowa elucja gradientowa przy zastosowaniu jednej kolumny oraz najwyżej trzech buforów o różnej sile jonowej i pH. Podczas rozdzielania aminokwasów białkowych stosuje się bufony zawierające kationy sodowe zapewniające szybki rozdział (czas analizy rzędu kilkunastu minut) natomiast podczas analizowania aminokwasów fizjologicznych używane są bufony oparte o kationy litowe. Kationy te słabiej niż sodowe eluują aminokwasy z jonowymieniacza i czynią to w sposób bardziej selektywny, zapewniając tym samym większą zdolność rozdzielczą dużej liczbie różnorodnych aminokwasów fizjologicznych. Ta wysoka rozdzielczość zapewniana przez jony litu okupiona jest jednak dłuższym czasem rozdziału, wynoszącym od 60 do 120 minut. Podczas rozdziału wykorzystywane są naturalne własności jonowe niezmodyfikowanych aminokwasów i bezpośrednia detekcja tych z nich, które nie są aminokwasami aromatycznymi jest praktycznie niemożliwa. Dlatego konieczne jest przeprowadzenie specjalnej reakcji detekcyjnej czyli innymi słowy przekształcenie chemiczne aminokwasów w pochodne łatwe do detekcji. W omawianej chromatografii jonowymiennej najczęściej spotykanym typem reakcji detekcyjnej jest reakcja z ninhidryną, fluoreskamina lub z OPA. Eluat wypływający z kolumny jest w sposób ciągły mieszany z odpowiednimi odczynnikami w oddzielnej termostatowanej komórce (reaktorze), po czym trafia do detektora spektrofotometrycznego (w przypadku ninhidryny) lub spektrofluorymetrycznego (w przypadku OPA i fluoreskaminy). Bardziej szczegółowe informacje na temat reakcji detekcyjnych znajdują się w rozdziale 7.3.

Mimo dużego postępu w innych zaawansowanych technikach rozdziału aminokwasów, na rynku wciąż bardzo popularne są analizatory aminokwasowe oparte na wyżej omówionej tradycyjnej chromatografii jonowymiennej. Jest to spowodowane tym, że są to najczęściej w pełni zautomatyzowane urządzenia, minimalizujące konieczność ingerencji operatora i gwarantujące uzyskanie zakładanej czułości oraz precyzji oznaczeń. Analizatory te w tańszych wersjach wyposażone są w kolumny wypełnione jonowymieniaczami na bazie sulfonowanego polistyrenu i bazują na detekcji z ninhidryną. Najbardziej zaawansowane modele posiadają kolumny z wysokorozdzielczym kopolimerem diwinylobenzenowo-polistyrenowym oraz czuły system detekcji oparty na reakcji z OPA.



**Rysunek 7-1:** Schemat blokowy automatycznego analizatora aminokwasów opartego na chromatografii jonowymiennej.

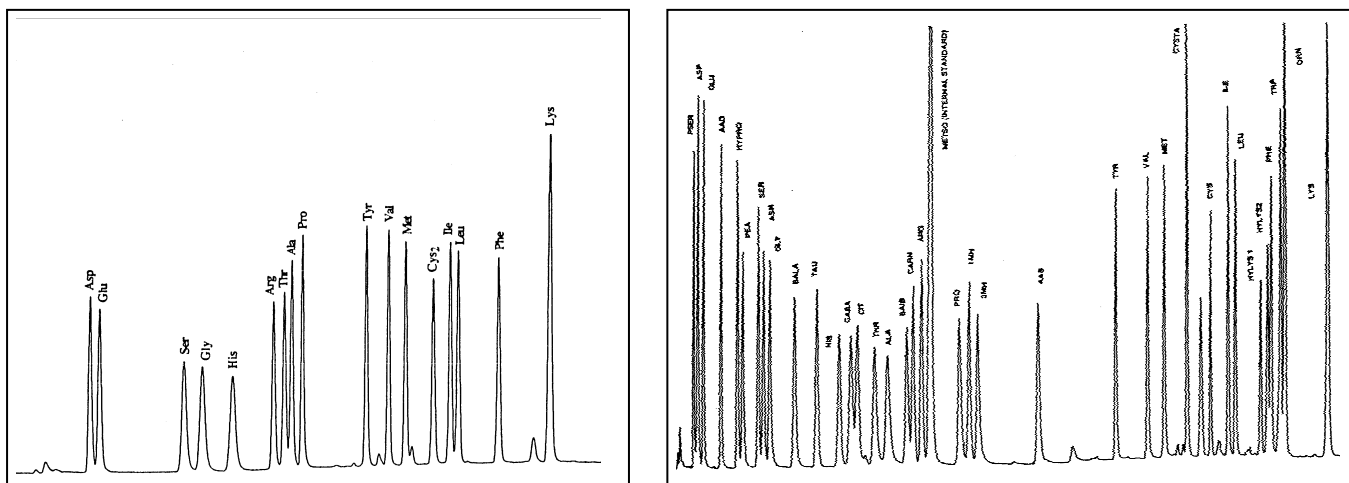
Limit detekcji tych metod wynosi odpowiednio od 5 do 0,5 pikomola. Schemat budowy współczesnego automatycznego analizatora aminokwasów zaprezentowano na Rys. 7-1.

Kolejną techniką stosowaną w analizie składu aminokwasowego jest chromatografia o odwróconych fazach. Ogólnie terminem tym określa się wszystkie cieczowe techniki chromatograficzne w których faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma. W odniesieniu do rozdzielania aminokwasów ogromna większość konkretnych metod bazuje na separacji chemicznie zmodyfikowanych aminokwasów na kolumnach wypełnionych żelem

krzemionkowym, którego polarne grupy silanolowe są zablokowane hydrofobowymi łańcuchami węglowodorowymi, liczącymi najczęściej 18 atomów węgla (jest to tak zwane wypełnienie typu C-18). Gęstość powierzchniowa takiej matrycy węglowodorowej na powierzchni ziaren żelu krzemionkowego jest tak duża, że można mówić o powstaniu wspomnianej wyżej niepolarniej fazy stacjonarnej. Elucja zaabsorbowanych na tej fazie zmodyfikowanych aminokwasów prowadzona jest za pomocą gradientu wzrastającego stężenia rozpuszczalnika organicznego, kolejno wymywającego z kolumny związki w kolejności od najmniej do najbardziej hydrofobowego. W celu zapewnienia wystarczającej dla aminokwasów rozdzielczości stosowany żel krzemionkowy musi posiadać bardzo małą średnicę ziaren (rzędu 5  $\mu\text{m}$ ) oraz drobną porowatość (rzędu 100 Å). Tego rodzaju wypełnienia stawiają bardzo wysokie wymagania odnośnie układu chromatograficznego ze względu na wysokie ciśnienia powstające podczas tłoczenia rozpuszczalników. Konieczne jest stosowanie w tej technice układów chromatografii wysokociśnieniowej (HPLC), wyposażonych w specjalne pompy zapewniające bezpulsacyjny przepływ przy ciśnieniach w zakresie 5-40 MPa a także w detektory spektro- i fluorymetryczne z komórkami pomiarowymi o małych pojemnościach, odpornymi na wysokie ciśnienia. Próbkę musi zostać nastrzyknięta na kolumnę za pomocą precyzyjnego injektora zapewniającego powtarzalne dozowanie ściśle określonych objętości z zakresu mikrolitowego.

Jak wspomniano, aminokwasy rozdzielane techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami (RP HPLC) są modyfikowane chemicznie przed rozdzieleniem. Modyfikacja ta ma na celu wprowadzenie do aminokwasu ugrupowania chemicznego umożliwiającego detekcję, a zarazem na tyle hydrofobowego aby możliwe było związanie się tak spreparowanego aminokwasu do również hydrofobowego wypełnienia kolumny. Najczęściej stosowaną modyfikacją jest wprowadzona przez Edmana w 1950 r. reakcja aminokwasów z fenyloizotiocyanianem (PITC) przeprowadzana w zasadowym środowisku. Powstająca wtedy pochodna fenyliotiokarbamilowa aminokwasu (PTC-aminokwas) absorbuje fale świetlne o długości 254 nm, co pozwala na wygodną detekcję spektrofotometryczną. Ponadto, pochodne PTC dobrze wiążą się do kolumn z odwróconymi fazami, lecz ze względu na obecność polarnych grup funkcyjnych w niektórych aminokwasach często dodaje się odczynnik powodujący powstawanie par jonowych z rozdzielanymi aminokwasami. Takie pary jonowe zobojętniają nawzajem swe ładunki, zwiększa się siła ich oddziaływania z fazą stacjonarną, polepsza selektywność oraz zdolność rozdzielcza. W rozdzielaniu pochodnych PTC najpowszechniej stosowanym odczynnikiem tworzącym pary jonowe jest trietanoloamina.

Istnieje bardzo wiele sposobów chemicznej modyfikacji aminokwasów umożliwiających ich analizowanie techniką RP-HPLC, ich przegląd można znaleźć w rozdziale 7.3. Podobnie jak w przypadku poprzednio omawianej techniki jonowymiennej na rynku również są dostępne automatyczne analizatory aminokwasów oparte na RH-HPLC. Posiadają one porównywalną z jonowymiennymi analizatorami czułość lecz mają gorszą precyzję oznaczeń i z tej racji są to dość rzadko używane instrumenty. O wiele częściej spotykaną w praktyce sytuacją jest adaptowanie w danym laboratorium posiadanego uniwersalnego zestawu HPLC do potrzeb analizy aminokwasowej. Rozdzielanie aminokwasów wymaga wówczas jedynie zastosowania odpowiedniej dla aminokwasów kolumny i zestawu rozpuszczalników. Wiele pochodnych aminokwasów można rozdzielać na uniwersalnych kolumnach z odwróconymi fazami (najlepsze rezultaty daje stosowanie wspomnianych wyżej kolumn C-18) lecz wiąże się to często z trudnościami praktycznymi bowiem właściwa optymalizacja gradientu, składu buforów i temperatury rozdziału jest niezwykle pracochłonna. Optymalizacji takiej zaś nie da się uniknąć bowiem specyfiką analizy aminokwasowej jest konieczność uzyskania na jednym chromatogramie idealnej separacji wszystkich szczytów aminokwasów, niezbędnej dla ich prawidłowej integracji (czyli obliczenia pola powierzchni), która z kolei jest niezbędna przy oznaczeniach ilościowych. Ze względu na te trudności najczęściej stosowanym wyjściem jest zakup specjalnej kolumny przygotowanej specjalnie do rozdzielania konkretnego rodzaju pochodnych aminokwasów. Przykładem może być kolumna o nazwie PicoTag (firmy Waters), która przeznaczona jest do rozdzielania PTC pochodnych aminokwasów. Kolumna to jest klasyczną kolumną do wysokociśnieniowej chromatografii z odwróconymi fazami lecz jej żel krzemionkowy zmodyfikowany jest łańcuchami węglowodorowymi typu C-18 posiadającymi odgałęzienia dimetylowe. Ten typ wypełnienia zapewnia optymalne warunki rozdziału PTC pochodnych aminokwasów, ponadto kolumny te można zakupić w tańszej krótkiej formie do rozdzielania aminokwasów z hydrolizatów białkowych i w formie długiej, droższej, lecz zapewniającej wysoką zdolność rozdzielczą, konieczną przy oznaczaniu aminokwasów w płynach fizjologicznych. Przykładowe chromatogramy PTC pochodnych aminokwasów uzyskane na kolumnach PicoTag zamieszczono na rys. 7-2. Na zakończenie omawiania technik analizy składu aminokwasowego opartych na RP-HPLC trzeba zaznaczyć, że zapewniają one w porównaniu z technikami jonowymiennymi nieco lepszą czułość i podobne czasy oznaczeń. Standardowo z wykorzystaniem PTC-pochodnych i detekcji spektrofotometrycznej oznacza się aminokwasy na poziomie minimum 10 pikomoli, zaś przy wykorzystaniu innych pochodnych i detekcji spektrofluorymetrycznej czułość zwiększa się do zakresu 0,1 pikomoli.



**Rysunek 7-2:** Przykładowe chromatogramy PTC-pochodnych aminokwasów rozdzielanych metodą RP-HPLC na kolumnie PicoTag. Po lewej stronie przykładowy rozdział aminokwasów hydrolizatu białkowego, po prawej aminokwasów fizjologicznych.

Generalnie w olbrzymiej większości laboratoriów do analizy składu aminokwasowego próbek stosuje się jedną z wymienionych powyżej technik, to znaczy albo chromatografię jonowymienną, albo też chromatografię z odwróconymi fazami. Przewaga obu tych technik wynika z tego, że mają one cechy w najlepszym stopniu spełniające kryteria wspomnianej wyżej idealnej techniki analizy, a zarazem koszt oznaczeń, uwzględniający również zakup aparatury, mieści się w rozsądnych granicach. W chwili obecnej istnieje jednak kilkaset publikacji przedstawiających inne techniki analizy składu aminokwasowego lecz nie są one popularnie stosowane ze względu na swój eksperymentalny i pionierski charakter oraz stosowanie skomplikowanej w obsłudze i kosztownej aparatury. Tym niemniej, warto wymienić te nowoczesne techniki, poczynając od najprostszych. Do rozdzielania aminokwasów można zastosować tzw. techniki „mikro-LC” (ang. micro liquid chromatography), czyli chromatografii na kolumnach kapilarnych o bardzo małych średnicach, rzędu 100-500  $\mu\text{m}$ . Kolumny takie mogą zawierać tradycyjne wypełnienia ziarniste o charakterystyce wypełnień podobnej do stosowanych w chromatografii z odwróconymi fazami lecz mogą być również przygotowane w tzw. technice monolitycznej. Wypełnieniem takich monolitycznych kolumn jest spolimeryzowany bezpośrednio w kolumnie polikondensat diwinylobenzenu lub dimetyloakryloetyleny ze styrenem lub metakrylanem. Wypełnienia takie tworzą monolityczną fazę nieruchomą o porach molekularnych rozmiarów nadającą kolumnie wielką zdolność rozdzielczą liczoną w setkach

pólek teoretycznych na metr. Rozdział nawet dużej liczby aminokwasów fizjologicznych jest w technice mikro-LC bardzo krótki (rzędu minut) i może być prowadzony również techniką kombinowaną, zwaną elektrochromatografią (CEC, ang. capillary electrochromatography), w której analogicznie jak w chromatografii dochodzi do podziału składników analizowanej mieszaniny pomiędzy fazę ruchomą i nieruchomą, z tą różnicą, że zamiast hydraulicznego przepływu fazy ruchomej wymuszonego w HPLC działaniem pompy, zastosowano przepływ elektroosmotyczny, wywołany różnicą potencjałów przyłożoną do końców kolumny kapilarnej.

W analizie aminokwasowej mogą być również wykorzystywane techniki oparte na elektroforezie kapilarnej. W odróżnieniu od poprzednio omówionej mikro-LC oraz CEC w elektroforezie kapilarnej rozdział odbywa się w kapilarach kwarcowych o średnicy wewnętrznej 10-100  $\mu\text{m}$ , które są wypełnione tylko roztworem buforującym, brak w nich medium rozdzielającego. Rozdział aminokwasów odbywa się wskutek przepływu elektroosmotycznego wywołanego przyłożonym do końców kapilary wysokim napięciem elektrycznym, rzędu kilkudziesięciu kV i odbywa się na zasadzie różnicy ładunków między rozdzielanymi związkami. Podobnie jak w przypadku chromatografii stosuje się tutaj wiele odmian tej techniki lecz w odniesieniu do aminokwasów najczęściej stosowana jest klasyczna elektroforeza kapilarna we wspomnianych kapilarach wypełnionych buforami (zwana wówczas strefową elektroforezą kapilarną CZE (ang. capillary zone electrophoresis) oraz micellarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna, w której bufor umieszczony w kapilarze zawiera detergent w stężeniu powodującym tworzenie micelli, a rozdział ma zwiększoną rozdzielczość wskutek podziału analizowanych aminokwasów pomiędzy fazę ruchomą oraz fazę micellarną.

Techniki mikro-LC, elektrochromatograficzne oraz elektroforetyczne kapilarne posiadają bardzo dużą zdolność rozdzielczą, krótkie czasy analizy oraz bardzo dużą czułość (rzędu femtomoli) dzięki zastosowaniu zaawansowanych rodzajów detekcji. W przypadku rzadko stosowanego rozdzielania aminokwasów niezmodyfikowanych stosuje się detekcję elektrochemiczną (amperometria), spektrometrię masową oraz pośrednią detekcję spektro- i fluorymetryczną. Te dwie ostatnie metody polegają na dodaniu do buforów związków chemicznych (głównie o charakterze aromatycznym), które zmieniają swe własności spektralne wskutek oddziaływania ich cząsteczek z cząsteczkami natywnych aminokwasów. W przypadku powszechniejszej detekcji pochodnych aminokwasów stosowana jest metoda spektrofotometryczna (najmniej czuła), spektrofluorymetryczna klasyczna oraz spektrofluorymetryczna wzbudzana światłem laserowym. Ponadto podobnie jak przy

niezmodyfikowanych aminokwasach, wykorzystuje się detekcję elektrochemiczną i opartą na spektrometrii masowej.

Chromatografia gazowa jest jedną z rzadziej stosowanych technik w analizie aminokwasowej. Głównym ograniczeniem tej metody jest oczywiście konieczność przeprowadzenia aminokwasów w lotne pochodne.

Na zakończenie warto wspomnieć jeszcze o dwóch technikach, które spotyka się w badaniach składu aminokwasowego. Pierwsza oparta jest na oznaczaniu aminokwasów z wykorzystaniem enzymów i polega na zastosowaniu kombinowanej elektrody amperometryczno-enzymatycznej zawierającej immobilizowaną oksydazę aminokwasów. Pomiar stężenia aminokwasów jest bardzo prosty i polega na zanurzeniu elektrody do badanego roztworu bądź też na wypełnieniu badanym roztworem elektrody przepływowej i następnie na amperometrycznym pomiarze powstałych produktów utleniania. Rzadziej stosuje się technikę enzymatyczną nieelektrodową, w której bezpośrednio do badanego roztworu dozowana jest porcja dekarboksylazy aminokwasów, a powstały dwutlenek węgla mierzony jest manometrycznie. Techniki enzymatyczne ze względu na prostotę stosuje się do pomiarów w warunkach polowych natomiast automatyzacja pomiarów stworzyła możliwości ich stosowania przy badaniu dużej ilości próbek. Głównym ograniczeniem technik enzymatycznych jest stosunkowo mała czułość oznaczeń oraz mała selektywność zdeterminowana rodzajem zastosowanego enzymu.

Ostatnia technika stosowana w analizie aminokwasów jest znacznie nowocześniejsza i opiera się na zastosowaniu mikroukładów (ang. chips). Wykorzystuje się w niej scalone układy półprzewodnikowe w mikrotechnice litograficznej pozwalające na wytworzenie w krzemowych lub szklanych matrycach mikrokanalów i prowadzeniu w nich elektroosmotycznego rozdziału aminokwasów na zasadach podobnych do elektrochromatografii. Kanały te mają niezwykle małą średnicę wewnętrzną rzędu dziesiątek nanometrów i tworzą zwiniętą lub meandrowatą strukturę zapewniającą bardzo wysoką zdolność rozdzielczą, która waha się w granicach  $10^5$ - $10^7$  pól teoretycznych na kanał o długości sumarycznej kilkudziesięciu milimetrów. Mikroukłady mogą zawierać wytworzone na tej samej strukturze układy detekcji mikroamperometrycznej lub też mogą być sprzężone są z laserowymi detektorami fluorescencyjnymi lub spektrometrami masowymi. Standardowo pozwalają na trwającą sekundy analizę o wysokiej czułości sięgającej attomoli. Jak dotąd technika ta jest jednak wciąż na etapie jednostkowych i prototypowych eksperymentów prowadzonych przez wysokobudżetowe laboratoria zajmujące się zaawansowanymi

technologiami lecz ze względu na swe wielkie możliwości analityczne będzie się na pewno bardzo dynamicznie rozwijać.

### **7.3. Typy reakcji detekcyjnych stosowanych przy analizie aminokwasów**

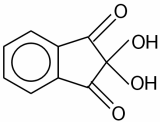
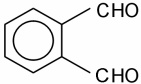
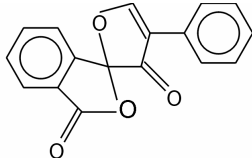
Przy omawianiu technik rozdzielania aminokwasów zwrócono uwagę na istotny problem detekcji tych związków. Najmniej problematyczna jest bezpośrednia spektrofotometryczna detekcja absorbujących w bliskim ultrafiolecie (190-280 nm) aminokwasów aromatycznych (tryptofan, fenyloalanina, tyrozyna) oraz cysteiny, metioniny i histydyny. Pozostałe aminokwasy dzięki obecności ugrupowania karboksylowego można teoretycznie oznaczać również spektrofotometrycznie w dalekim nadfiolecie (poniżej 190 nm), tym niemniej z powodów technicznych (konieczność dokonywania pomiarów w gazie obojętnym, problem ze znalezieniem odpowiednich, nieabsorbujących przy tej długości fali rozpuszczalników oraz materiałów do konstrukcji naczynek pomiarowych) oraz z powodu małej czułości, pomiar taki nie jest praktycznie stosowany. W niektórych technikach stosuje się wspomnianą w poprzednim rozdziale detekcję spektrofotometryczną lub fluorymetryczną niebezpośrednią (czyli dodawanie do buforów substancji zmieniających swe własności spektralne w obecności aminokwasów). Technika ta jest również mało czuła, występują problemy z dryfem linii podstawowej, niemożność zastosowania wymywania gradientowego oraz trudności z analizowaniem próbek złożonych (zawierających nie tylko aminokwasy). Precyzyjna oraz czuła detekcja wszystkich aminokwasów jest możliwa tylko po zastosowaniu reakcji detekcyjnej, czyli po chemicznym przekształceniu do pochodnych łatwych do wykrywania. Taka idealna reakcja detekcyjna powinna być szybka i prosta czyli w praktyce jednoetapowa, otrzymane pochodne powinny być stabilne, powinny posiadać wydajne, znacznie zwiększające czułość oznaczeń ugrupowania chromoforowe o podobnej charakterystyce widmowej we wszystkich rodzajach aminokwasów zaś ich właściwości fizykochemiczne powinny umożliwiać separację z wysoką rozdzielczością.

W zależności od tego, czy aminokwasy poddawane są reakcji detekcyjnej przed czy też po rozdziale wyróżniamy reakcje przedkolumnowe oraz pokolumnowe. Reakcje pokolumnowe, historycznie starsze to i takie w których poszczególne aminokwasy po rozdzieleniu ich na kolumnie są w sposób ciągły i automatyczny mieszane z odpowiednim odczynnikiem i przekształcane w reaktorze do pochodnych. Stosuje się je wyłącznie przy rozdzielaniu aminokwasów techniką cieczonej, kolumnowej chromatografii jonowymiennej i mają pewne

istotne zalety w stosunku do metod przedkolumnowych. Przede wszystkim, podczas rozdzielu chromatograficznego wszystkie substancje interferujące z reakcją detekcyjną ulegają wcześniejszemu oddzieleniu od aminokwasów. Odczynnik generujący oznaczany barwnik (w przypadku reakcji detekcyjnej z ninhidryną) lub też odczynnik modyfikujący aminokwasy (OPA lub fluoreksamina) reaguje już tylko z czystymi aminokwasami, reakcja jest więc ilościowa i nie powstają szkodliwe produkty uboczne. Na kolumnę można nałożyć próbkę zanieczyszczoną, a więc zminimalizowana jest konieczność wcześniejszego pracochłonnego przygotowania próbki, cały proces analizy można zautomatyzować i tym samym zminimalizować możliwość pomyłek i niedokładności wynikających z pracy ręcznej. Dzięki temu analizatory wykorzystujące detekcję pokolumnową są aparatami zapewniającymi wysoką precyzję i powtarzalność oznaczeń. Niestety jest to okupione znacznym stopniem komplikacji aparatury, a tym samym jej wyższym kosztem. Ponadto mieszanie rozdzielonych aminokwasów z chemikaliami zmniejsza różnicę między sygnałem użytecznym a szumem, zmniejsza rozdzielczość i między innymi przez to ten typ reakcji detekcyjnej jest generalnie mniej czuły niż detekcja przedkolumnowa. Wzory oraz właściwości odczynników używanych w detekcji pokolumnowej zebrano w Tabeli 7-1.

Przedkolumnowy typ reakcji detekcyjnej w większości przypadków wykonywany jest ręcznie przez operatora. Ze względu na swoją specyfikę poprzedzony musi być etapem przygotowania próbki, czyli szeregiem czynności, które mają na celu selektywne zagęszczenie próbki aminokwasów i możliwie dokładne pozbycie się substancji interferujących z reakcją oraz z późniejszym rozdziałem. Jeśli mamy do czynienia z próbką aminokwasów wolnych lecz znajdujących się w płynie fizjologicznym (np. osocze krwi, mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy) konieczne jest możliwie dokładne pozbycie się polipeptydów, białek i lipoprotein. Do najefektywniejszych metod selektywnego doczyszczania takich próbek zaliczamy ultrafiltrację przez membrany półprzepuszczalne posiadające limit mas cząsteczkowych w granicach 10 kDa oraz zastosowanie miniaturowych kolumn do ekstrakcji z fazy stałej (tzw. SepPak) zawierających wypełnienie z odwróconymi fazami typu C-18. W niektórych laboratoriach stosuje się wytrącanie zanieczyszczających białek za pomocą kwasu sulfosalicylowego lub kwasu trichlorooctowego lecz nie jest to rekomendowana metoda ze względu na dużą zmienność w odzysku niektórych aminokwasów. W przypadku próbek białkowych lub peptydowych etap przygotowania próbki musi zostać wykonany jeszcze przed hydrolizą. Oczywiście podstawowym wymogiem gwarantującym uzyskanie prawidłowego składu aminokwasowego danego białka lub peptydu jest jego homogenność. Jest to warunek podstawowy lecz nie jedyny, bowiem dodatkowo białko musi

zostać możliwie dokładnie pozbawione soli, substancji buforujących oraz detergentów, które to związki mogą negatywnie wpłynąć na proces hydrolizy i późniejszej modyfikacji aminokwasów. Dopuszczalne jest użycie białek i peptydów jedynie w postaci roztworu

| Skrót lub nazwa potoczna | Nazwa chemiczna i wzór strukturalny                                                                    | Właściwości pochodnych aminokwasowych                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ninhydryna               | Ninhydryna<br>        | Detekcji podlegają nie pochodne aminokwasów lecz końcowy produkt ich reakcji z ninhidryną, tzw. czerwień Ruhemana, oznaczana spektrofotometrycznie przy 570 nm (lub 440 nm dla reakcji z proliną). Praktyczna czułość kilka pikomoli.                                            |
| OPA                      | Aldehyd o-ftalowy<br> | Detekcja fluorymetryczna pochodnych przy maksimum wzbudzenia 340 nm i emisji 455 nm, praktyczna czułość 0,5 pikomola, reakcja może być dodatkowo uczulana odpowiednimi dodatkami chemicznymi, problemy z oznaczaniem proliny, która bez uprzedniego utlenienia nie reaguje z OPA |
| Fluoreskamina            | Fluoreskamina<br>    | Detekcja fluorymetryczna przy maksimum wzbudzenia 390 nm i emisji 475 nm, czułość w zakresie kilku pikomoli, problemy z oznaczaniem proliny, która bez uprzedniego utlenienia nie reaguje z fluoreskamina                                                                        |

**Tabela 7-1:** Odczynniki stosowane w pokolumnowych reakcjach detekcji aminokwasów.

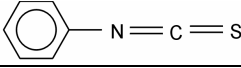
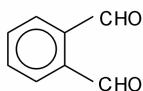
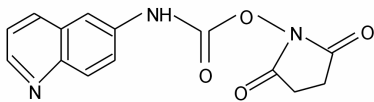
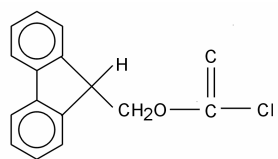
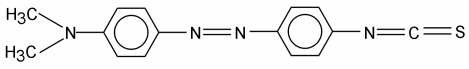
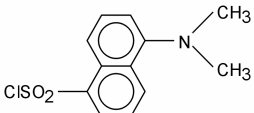
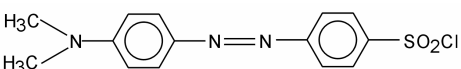
wodnego lub w buforze fosforanowym o możliwie niskiej molarności (szczegółowe dane na ten temat zaprezentowano w rozdziale 7.2). Generalnie, najbardziej polecaną techniką ostatecznego doczyszczania, a zarazem odsolenia białek i peptydów jest poddanie ich chromatografii RP HPLC. Zebrany po takim rozdziale szczyt białka poddaje się liofilizacji i uzyskujemy odsolony preparat o bardzo wysokim stopniu czystości. Bardzo podobnie do RP HPLC działa odsalanie białek lub peptydów na wspomnianych wyżej kolumnach SepPak typu C-18. Ponadto do doczyszczania/odsolenia białek i peptydów można zastosować płukanie na membranach półprzepuszczalnych, precypitację acetonem, etanolem lub mieszaniną chloroformu i metanolu. Najczęściej konieczne jest wówczas tylko pozbycie się resztek kwasu solnego przez odparowanie zhydrolizowanej próbki na koncentratorze próżniowym.

Odczynników używanych do przedkolumnowego typu detekcji jest znacznie więcej niż wymienionych wyżej używanych w reakcjach pokolumnowych. Najczęściej stosowanym

typem reakcji przedkolumnowej aminokwasów jest reakcja z PITC. Rutynowo stosuje się również reakcje z OPA, AQC oraz z popularnym odczynnikiem chlorkiem Fmoc znanym bardziej z zastosowania do protekcji grup funkcyjnych przy syntezie peptydów (patrz roz. 10). Do rzadziej stosowanych rodzajów reakcji detekcyjnych zaliczamy reakcje z DABITC, chlorkiem dansylu oraz z chlorkiem dabsylu. Wzory oraz właściwości wszystkich tych odczynników zaprezentowano w Tabeli 7-2. Należy zwrócić jednak uwagę, że podane praktyczne czułości oznaczeń aminokwasów z użyciem tych odczynników mieszczą się czasami w szerokich granicach, bowiem niektóre reakcje można modyfikować, stosując dodatek substancji potęgujących własności spektralne powstającego produktu. Ponadto, niekiedy własności spektralne pochodnych poszczególnych aminokwasów są na tyle różne, że inna jest czułość oznaczeń dla poszczególnych aminokwasów. Ponadto należy pamiętać, że zawsze można zastosować zaawansowane formy detekcji takie jak wzbudzanie laserowe przy pomiarach spektrofluorymetrycznych oraz detekcja za pomocą spektrometru masowego i wówczas wielokrotnie wzrasta ich czułość.

#### **7.4. Hydroliza białek i peptydów**

Prawidłowe przeprowadzenie hydrolizy wszystkich wiązań peptydowych przy minimalnej destrukcji tworzących je składowych ma kluczowe znaczenie dla rzetelnego oznaczenia składu aminokwasowego badanego białka lub peptydu. Techniki hydrolizy dzielimy na enzymatyczne oraz chemiczne, zaś chemiczne z kolei mogą być prowadzone pod działaniem kwasów lub zasad. Hydrolizę enzymatyczną stosuje się w przypadkach, gdy z jakichś względów niemożliwe lub trudne jest odsolenie danych białek lub peptydów, względnie też w przypadku, gdy zachodzi konieczność oznaczenia aminokwasów fizjologicznych bądź też nietrwałych podczas hydrolizy chemicznej. Ze względu na konieczność hydrolizy wszystkich wiązań peptydowych zazwyczaj stosuje się mieszaniny enzymów, zarówno endo- jak i egzopeptydaz. Najczęściej stosowanym takim preparatem enzymatycznym jest pronaza, będąca mieszaniną niespecyficznych proteaz wyizolowanych ze *Streptomyces griseus*. Pronaza wprawdzie często zdolna jest do trawienia białek do poszczególnych aminokwasów lecz ze względu na upakowanie cząsteczek białkowych oraz istnienie w nich domen hydrofobowych całkowita proteoliza wielu białek z użyciem tego preparatu jest trudna. W praktyce stosuje się więc mieszaniny wielu preparatów enzymatycznych, np. wspomnianej pronazy, wieprzowej aminopeptydazy M oraz wieprzowej prolidazy. Pronaza trawi wszystkie eksponowane wiązania peptydowe, aminopeptydaza odcina kolejno od N-końca aminokwasy

| Skrót lub nazwa potoczna | Nazwa chemiczna i wzór strukturalny                                                                                                    | Właściwości pochodnych aminokwasowych                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PITC                     | Fenylizotiocyanian<br>                                | Detekcja spektrofotometryczna przy 254 nm, praktyczna czułość kilkadziesiąt pikomoli, reakcja modyfikacyjna prosta, szybka (kilka min.)                                                                                                                                                                                                                                                 |
| OPA                      | Aldehyd o-ftalowy<br>                                 | Detekcja fluorymetryczna przy maksimum wzbudzenia 340 nm i emisji 455 nm, stosowanie różnych dodatków podczas reakcji modyfikacyjnej sprawia, że czułość waha się od kilkudziesięciu femtomoli do kilkudziesięciu pikomoli, reakcja modyfikacyjna bardzo szybka (1 min.) lecz czasami skomplikowana, problemy z oznaczaniem proliny, która bez uprzedniego utlenienia nie reaguje z OPA |
| AQC                      | 6-aminochinolino-N-hydroksybursztynylokarbaminian<br> | Detekcja fluorymetryczna przy maksimum wzbudzenia 250 nm i emisji 395 nm, czułość kilkadziesiąt do setek femtomoli, reakcja modyfikacyjna prosta, szybka (kilka min.) i mało wrażliwa na zanieczyszczenia nieaminokwasowe próbki                                                                                                                                                        |
| Chlorek Fmoc             | Chloromrówczan 9-fluorenylometylu<br>               | Detekcja fluorymetryczna przy maksimum wzbudzenia 260 nm i emisji 300-350 nm, praktyczna czułość kilkadziesiąt femtomoli, prosta i szybka (1 min.) reakcja modyfikacyjna                                                                                                                                                                                                                |
| DABITC                   | 4-N,N-dimetyloaminoazo-benzeno-4'-izotiocyanian<br> | Detekcja spektrofotometryczna przy 466 nm, praktyczna czułość rzędu kilku-kilkudziesięciu pikomoli, reakcja modyfikacyjna prosta i szybka (5 min.)                                                                                                                                                                                                                                      |
| Chlorek dansylu          | Chlorek 5-dimetyloaminonaftaleno-1-sulfonylu<br>    | Detekcja spektrofotometryczna przy 250 nm lub spektrofluorymetryczna przy maksimum wzbudzenia 350 nm i emisji 530 nm, praktyczna czułość kilka-kilkadziesiąt pikomoli, reakcja modyfikacyjna prosta lecz długa (kilkadziesiąt minut), bardzo wrażliwa na substancje interferujące, pochodne wrażliwe na światło                                                                         |
| Chlorek dabsylu          | Chlorek 4-dimetyloaminoazo-benzeno-4'-sulfonylu<br> | Detekcja spektrofotometryczna przy 436 nm, praktyczna czułość kilka pikomoli, reakcja modyfikacyjna szybka (10 min.) lecz kłopotliwa ze względu na wrażliwość na nadmiar odczynnika i tworzenie wielokrotnych pochodnych                                                                                                                                                                |

**Tabela 7-2:** Odczynniki stosowane w przedkolumnowych reakcjach detekcji aminokwasów.

znacznie ułatwiając tym samym destrukcję agregatów hydrofobowych zaś prolidaza trawi wiązania peptydowe przed proliną, które są odporne na działanie aminopeptydazy M. Proteazy stosuje się w bardzo małych ilościach, rzędu dziesiątych części procenta wagowego w stosunku do masy trawionego białka. Unika się w ten sposób zanieczyszczenia aminokwasami pochodzącymi z autohydrolizy użytych enzymów. Należy jednak pamiętać, że pomimo ciągłego doskonalenia składu proteaz hydrolizujących białka oraz optymalizacji warunków ich działania, techniki hydrolizy enzymatycznej wciąż znacznie ustępują hydrolizie chemicznej pod względem skuteczności i niezawodności w dokładnej fragmentacji białka. Ponadto, mieszanina aminokwasów po hydrolizie enzymatycznej jest często tak zanieczyszczona solami pochodzącymi z buforów niezbędnych dla prawidłowego działania enzymów, że możliwe jest ich analizowanie jedynie analizatorach z pokolumnowym typem reakcji detekcyjnej.

Z metod hydrolizy chemicznej najczęściej stosowaną i zarazem dającą najrzetelniejsze wyniki jest hydroliza kwaśna. Białko lub peptyd hydrolizowane jest w 6M kwasie solnym w temperaturze 110°C przez 24 godziny. W przypadku analizy ponad 10 µg suchej masy białka, stosuje się hydrolizę bezpośrednią w ciekłym kwasie solnym, natomiast w przypadku wysokoczułych analiz białek i peptydów na poziomie mikrogramowym i niższym zalecana jest hydroliza w fazie gazowej. Preparat umieszcza się wówczas w postaci liofilizatu w otwartej szklanej probówce poddanej działaniu par HCl dozowanego w postaci ciekłej na dnie większego hermetycznego naczynia. Hydroliza zarówno w fazie ciekłej jak i gazowej musi zostać przeprowadzona w próżni, w naczyniu dokładnie pozbawionym śladów tlenu poprzez przedmuchanie gazem obojętnym jak azot lub argon. Ze względu na agresywne warunki hydrolizy (gorący stężony kwas i wysokie ciśnienie jego par) najpewniejszym rozwiązaniem jest zastosowanie probówki lub rurki szklanej zatopionej pod próżnią. Można również zastosować handlowo dostępne, specjalne naczynia do hydrolizy z zaworami teflonowymi produkowane przez firmę Pierce.

Ze względu na znaczny, a zarazem trudny do dokładnego oszacowania wpływ zanieczyszczeń na odzysk poszczególnych aminokwasów hydroliza kwaśna jest etapem skrajnie wrażliwym na obecność wszelkich substancji obcych w próbce. Dlatego też probówki na próbki oraz szkło w których prowadzona jest hydroliza muszą być bardzo dokładnie umyte, wytrawione w kwasie solnym lub azotowym, gruntownie przepłukane wodą o wysokiej czystości oraz metanolem, a następnie poddane pirolizie, czyli kilkugodzinnemu wyprażaniu w temperaturze kilkuset stopni. Kwas solny powinien mieć najwyższy możliwy stopień czystości, najlepszym jego źródłem są ampułki 6M kwasu sprzedawane przez firmę Pierce specjalnie do celów

wysokoczułej analizy aminokwasowej. Mieszanina aminokwasów, która powstaje po hydrolizie kwaśnej nawet w takich wzorcowych, idealnych warunkach odbiega nieco od składu aminokwasowego wyjściowego białka i dlatego podczas interpretacji wyników należy zawsze pamiętać o następujących prawidłowościach:

1. Podczas standardowej kwaśnej hydrolizy rozkładowi ulega tryptofan oraz cysteina. Oznaczenie tych aminokwasów wymaga zastosowania innych metod, zarówno hydrolizy jak i przygotowania próbki.
2. Asparagina oraz glutamina ulegają ilościowej konwersji do odpowiednio kwasu asparaginowego oraz glutaminowego i w takiej postaci są oznaczane. W razie konieczności oznaczenia asparaginy i glutaminy należy przekształcić te aminokwasy przed hydrolizą do stabilnych kwasów diaminopropionowych za pomocą reakcji z bis(trifluoroacetoksy)jodobenzenem (BTI).
3. Tyrozyna, treonina, metionina oraz seryna ulegają częściowej powolnej degradacji spowodowanej chlorowcowaniem, utlenianiem bądź tworzeniem estrów. Efektywną funkcję ochronną tyrozyny pełni dodatek fenolu (w ilości 0,1 %) do kwasu solnego zaś metioninę przed utlenieniem chroni dodatek 2-merkaptoetanolu ( w ilości 1%).
4. Wiązania peptydowe pomiędzy aminokwasami takimi jak Ala, Ile i Val są bardziej odporne na hydrolizę od pozostałych dlatego też białka lub peptydy zawierające takie bloki powinny być hydrolizowane dłużej, np. 48 godzin.

Poza tymi regułami należy pamiętać jeszcze o dwóch prawidłowościach, których zaobserwowanie może pomóc w diagnozowaniu błędów popełnionych podczas hydrolizy lub przygotowania próbki. Przede wszystkim nieproporcjonalnie niski w stosunku do oczekiwań poziom zarówno Asp jak i Glu świadczy o zanieczyszczeniu próbki jonami metali. Nieproporcjonalnie natomiast wysoki poziom reszt Gly, Ser oraz Ala świadczy o zanieczyszczeniu próbki kurzem, a więc używaniu długo składowanych w otwartym miejscu końcówek lub probówek, korzystaniu z wody stojącej w otwartym naczyniu itp. Bardzo dobrą metodą pozwalającą na rzetelną ocenę całego procesu analitycznego jest użycie podczas każdej analizy aminokwasowej białka kontrolnego (np. albuminy wołowej lub  $\beta$ -laktoglobuliny) i sprawdzenie, czy uzyskany po analizie skład aminokwasowy takiej próby kontrolnej został rzetelnie odwzorowany. Oprócz takiej kontroli jakościowej warto zastosować kontrolę ilościową, czyli dodatek do oznaczanego białka wzorca wewnętrznego np. nietypowego i zarazem łatwego w detekcji aminokwasu. Takim powszechnie stosowanym

wzorcem wewnętrznym jest norleucyna. Określenie jej odzysku po wszystkich operacjach analizy aminokwasowej pozwala na bardziej rzetelne obliczenia ilościowe.

Pomimo tego, że standardowa kwaśna hydroliza uważana jest za metodę zapewniającą najlepsze wyniki w analizie składu aminokwasowego białek i peptydów to jednak w wielu przypadkach nie można zaakceptować jej głównej wady w postaci braku możliwości oznaczenia tryptofanu i cysteiny. Właściwie więc można powiedzieć, że wszystkie alternatywne metody hydrolizy chemicznej zostały opracowane głównie z myślą o prawidłowym odzysku tych dwóch aminokwasów, a w szczególności tryptofanu. Zaczynając od prezentacji metody najprostszej należy zauważyć, że tryptofan dzięki swej budowie chemicznej i własnościom spektralnym jest związkiem, który można stosunkowo łatwo oznaczyć w białku lub peptydzie metodami spektrofotometrycznymi, a więc bez konieczności hydrolizy i stosowania technik analizy aminokwasowej. W celu uniknięcia fałszującego wpływu pofałdowania łańcucha polipeptydowego na widmo tryptofanu próbkę białka rozpuszcza się w stężonym roztworze chlorowodoru guanidyny lub mocznika powodującym rozwinięcie jego struktury. Następnie dokonuje się pomiaru widm absorbcyjnych takiego roztworu w ultrafiolecie i komputerowo oblicza się drugorzędowe pochodne widma. Odpowiednie przeliczenie stosunku wartości absorbancji w kolejnych minimach i maksimach pochodnych widma pozwala na dość precyzyjne wyliczenie zawartości tryptofanu oraz proporcji zawartości tego aminokwasu w stosunku do tyrozyny. Niestety wadą takiego oznaczenia jest mała czułość oraz wrażliwość na obecność ugrupowań chromoforowych w białkach. Rzetelniejsze i czulsze oznaczenia tryptofanu zapewniają tylko techniki analizy aminokwasowej. W praktyce do oznaczania tryptofanu stosuje się hydrolizę enzymatyczną białka lub taki rodzaj hydrolizy chemicznej, który nie powoduje rozkładu ugrupowania indolowego tego aminokwasu. Wyróżniamy trzy rodzaje metod hydrolizy chemicznej chroniącej tryptofan. Pierwsza to hydroliza alkaliczna z zastosowaniem stężonych roztworów NaOH, LiOH czy Ba(OH)<sub>2</sub>. Druga grupa obejmuje hydrolizę w tradycyjnym kwasie solnym wzbogaconym dodatkami takich odczynników jak kwas tioglikolowy, β-merkaptioetanol, etanoditiol czy tryptamina, natomiast trzecia grupa to hydroliza w zawierających siarkę kwasach organicznych do których zaliczamy kwas *p*-toluenosulfonowy, kwas metanosulfonowy oraz kwas merkaptioetanosulfonowy. Metody te zapewniają odzysk tryptofanu średnio w granicach od siedemdziesięciu do dziewięćdziesięciu kilku procent. Niestety mimo obfitości tych przepisów należy stanowczo zaznaczyć, że żaden z nich nie daje równoczesnej możliwości rzetelnego oznaczenia innych niż tryptofan aminokwasów. Po prostu skuteczna ochrona tryptofanu znacznie obniża odzysk pozostałych aminokwasów albo

też interferuje znacznie ze stosowanymi reakcjami detekcyjnymi. W sumie więc w przypadku konieczności rzetelnego wyznaczenia kompletnego składu aminokwasów danego białka należy przeprowadzić dwie hydrolizy: jedną klasyczną kwaśną i jedną alternatywną, przeznaczoną wyłącznie do oznaczenia tryptofanu.

Oznaczanie cysteiny w większości przypadków sprowadza się do przekształcenia cysteiny przed hydrolizą do jakiejś stabilnej pochodnej. Najprostszą taką metodą modyfikacji jest utlenienie cysteiny za pomocą kwasu nadmanganowego do trwałego kwasu cysteinowego, czyli przekształcenie ugrupowania  $-SH$  do stabilnej formy  $-SO_3^-$ . Pod działaniem kwasu nadmanganowego ulegają przekształceniu wolne reszty cysteiny danego białka i dodatkowo dochodzi do rozerwania i modyfikacji cysteiny czyli mostków disiarczkowych. Ze względu na niskie pH reakcji łańcuch polipeptydowy ulega znacznemu rozluźnieniu, kwas nadmanganowy ma łatwy dostęp do wszystkich cystein oraz mostków, zbędna jest więc uprzednia denaturacja i redukcja białka. W końcowym rezultacie otrzymujemy ilościowe i rzetelne oznaczenie wszystkich obecnych w danym białku reszt cysteinowych i tych wolnych i tych zaangażowanych w wiązania disiarczkowe. Ubocznym działaniem kwasu nadmanganowego jest ponadto ilościowe przekształcenie metioniny w sulfon. Ponieważ wspomniano poprzednio, że metionina podczas kwaśnej hydrolizy ulega powolnemu utlenieniu do trudno oznaczalnej mieszaniny sulfotlenków to taka konwersja do trwałego sulfonu metioniny może być traktowana jako dodatkowa zaleta traktowania kwasem nadmanganowym. Niestety zaleta ta jest niwelowana przez najpoważniejszą wadę utleniania białka tym kwasem, którą jest rozkład reszt zarówno tryptofanu jak i tyrozyny. Ponadto ze względu na silnie hydrofilowy charakter PTC-pochodnej kwasu cysteinowego utrudnione jest jej analizowanie za pomocą popularnej reakcji z PITC i późniejszemu rozdziałowi na RP-HPLC.

Inne metody konwersji cysteiny do trwałych pochodnych polegają na alkilacji jej grupy tiolowej i nie posiadają wymienionych wad użycia kwasu nadmanganowego. Niestety te metody konwersji muszą być poprzedzone dodatkowym etapem redukcji mostków disiarczkowych białka, zaś po procedurze redukcji i alkilacji konieczne jest jeszcze dodatkowo odsolenie próbki. Redukcję przeprowadza się ditiotreitiolem (DTT) lub 2-merkaptotetanolem w buforze denaturującym, ułatwiającym dostęp odczynnika redukującego do wszystkim mostków disiarczkowych upakowanego białka. Następnie alkiluje się uwolnione grupy  $-SH$ , przy czym należy pamiętać, że odczynnik alkilujący musi być dodany w znacznym nadmiarze molowym w stosunku do ilości cystein oraz dodanego odczynnika redukującego. Najczęściej stosowane odczynniki alkilujące to: jodoacetamid lub kwas

jodooctowy (pod wpływem ich działania tworzy się odpowiednio karboksyamidometylocysteina lub karboksymetylocysteina), 4-winylopirydyna tworzy pirydyloetylocysteinę, akrylamid – propionamidocysteinę, a z N-izopropylidoacetamid tworzy się N-izopropylkarboksyamidometylocysteina. Powstałe pochodne cysteiny są nie tylko stabilne podczas hydrolizy lecz dodatkowo ich czasy retencji, z najczęściej używanych do rozdzielania kolumn, nie kolidują z czasami retencji innych aminokwasów. Ponadto, ani redukcja próbki białka lub peptydu, ani też późniejsza alkilacja nie powoduje znaczących modyfikacji innych aminokwasów. Jak już wspomniano, jedyną wadą omawianej metody jest to, że po procesie redukcji oraz alkilacji próbka jest intensywnie zasolona. Ponieważ metody odsalania próbek białkowych lub peptydowych przed hydrolizą omówiono wcześniej, tutaj należy tylko przypomnieć, że mogą one polegać na zastosowaniu chromatografii RP HPLC, kolumniek SepPak C-18 bądź też na odsalaniu na membranach półprzepuszczalnych. W tym przypadku, ze względu na obecność odczynników denaturujących, nie stosuje się odsalania za pomocą precypitacji.

Na zakończenie omawiania metod uzyskiwania stabilnych podczas hydrolizy pochodnych cysteiny warto zaprezentować coraz częściej stosowaną bardzo wygodną metodę jednoczesnej redukcji oraz alkilacji białka prowadzoną w fazie gazowej. Metoda ta wykorzystuje fakt, że jeden z omówionych już odczynników alkilujących, 4-winylopirydyna, jest cieczą lotną. Do redukcji stosuje się również lotny odczynnik redukujący z grupy fosfin. Sama metoda redukcji i alkilacji w fazie gazowej bardzo przypomina omówione już rozwiązanie stosowane przy hydrolizie gazowej. Wysuszone na dnie próbki białko lub peptyd umieszcza się w większym zamkniętym naczyniu na dnie którego znajduje się mieszanina tributylfosfiny oraz 4-winylopirydyny. Naczynie zamyka się szczelnie, i po wypompowaniu powietrza umieszcza w temperaturze 60°C. W tych warunkach oba odczynniki w stanie gazowym redukują i zarazem alkilują grupy –SH, nie reagując ze sobą. Po ukończeniu reakcji próbkę suszy się i bezpośrednio poddaje hydrolizie w fazie gazowej bez konieczności odsalania. Ograniczeniem tej metody jest nietrwałość tributylfosfiny, wrażliwość na ślady tlenu lub wilgoci komplikująca przechowywanie tego odczynnika i dodatkowo jego silne właściwości trujące.

## 7.5. Interpretacja wyników analizy składu aminokwasowego

We wszystkich przedstawionych technikach stosowanych w analizie składu aminokwasowego wyniki ilościowe pochodzą z cyfrowej obróbki uzyskanych chromatogramów, elektrochromatogramów, bądź też widm masowych. Przed serią oznaczeń układ analityczny kalibruje się, rozdzielając zestaw standardów ilościowych poszczególnych aminokwasów. Na podstawie takich rozdziałów kalibracyjnych określa się indywidualny czas pojawiania się na chromatogramie danego, konkretnego aminokwasu oraz okno definiujące tolerancję tego czasu. Oczywiście im technika rozdziału jest bardziej precyzyjna i powtarzalna tym okno to jest mniejsze lecz jego definiowanie jest niezbędne, bowiem pojawienie się na chromatogramach badanych próbek szczytu umiejscowionego poza oknami zdefiniowanych wcześniej aminokwasów świadczy o obecności w próbce nieznanymi i nieskalibrowanymi substancjami. Na podstawie zintegrowanego pola powierzchni pod szczytami poszczególnych aminokwasów standardowych oraz na podstawie podanych przez operatora ich ilości określonych w molach, komputer wyznacza krzywe kalibracyjne, czyli określa zależność matematyczną między polem powierzchni szczytu danego aminokwasu a jego ilością. Na tym etapie kończy się kalibracja układu i można przystąpić do serii rozdziałów próbek badanych. Po każdym takim rozdziale program identyfikuje poszczególne aminokwasy próbki wykorzystując do tego zdefiniowane wcześniej okna czasowe, oblicza pole powierzchni pod każdym szczytem i na podstawie krzywych kalibracyjnych wylicza konkretne ilości oznaczanych związków. Programy sterujące analizą aminokwasową znacznie ułatwiają zarówno kalibrację jak i późniejsze obliczenia ilościowe. Zazwyczaj ingerencja operatora ogranicza się jedynie do określenia najbardziej optymalnych parametrów integracji chromatogramów, czyli po prostu do „nauczenia” komputera rozpoznawania szczytów aminokwasowych w taki sposób aby nie dochodziło do fałszywego interpretowania na przykład szumów linii podstawowej jako szczytów poddawanych integracji.

Konkretnym wynikiem, który otrzymuje się po skończonej analizie jest tabela zawierająca ilości poszczególnych aminokwasów w badanej próbce. W odniesieniu do analizy składu wolnych aminokwasów niebiałkowych, pochodzących na przykład z próbki moczu lub osocza krwi, uzyskane wielkości przelicza się uwzględniając objętość próbki wziętej do analizy i przedstawia najczęściej jako mikromole aminokwasów przypadające na litr badanego płynu fizjologicznego. Wynik taki pozwala na wyciągnięcie wniosków, czy przykładowo poddana analizie próbka moczu mieści się w zakresie norm fizjologicznych zdrowego człowieka.

Inaczej jest w przypadku, gdy uzyskany wynik ma definiować skład aminokwasowy białka lub peptydu. Wówczas rezultaty analizy można przedstawić na kilka sposobów liczbowych dostosowanych do warunków interpretacji. Najprostszy przypadek dotyczy wyników analizy aminokwasowej łańcucha polipeptydowego o znanej sekwencji. Wówczas uzyskane stężenia poszczególnych aminokwasów służą bezpośrednio do precyzyjnego obliczenia stężenia takiego białka lub peptydu. W przypadku próbek o nieznannej masie molowej lub też dla mieszanin kilku białek, najczęściej stosowanym sposobem przedstawiania wyników analizy składu aminokwasowego jest procent molowy. Określa się go w postaci procentowych ilości molowych poszczególnych aminokwasów w stosunku do sumy ilości moli wszystkich oznaczonych aminokwasów badanej próbki:

$$\text{procent molowy danego aminokwasu} = \frac{\text{oznaczona ilość moli tego aminokwasu}}{\text{całkowita ilość moli wszystkich oznaczonych aminokwasów}} \times 100\%$$

Taki procent molowy jest właśnie podstawowym parametrem używanym przy próbach identyfikacji białka na podstawie jego składu aminokwasowego. Program komputerowy przeszukuje bazę danych sekwencji poznanych białek, oblicza procenty molowe ich aminokwasów i wybiera te białka, których skład najlepiej pasuje do oznaczanego w naszej analizie. Ze względu na olbrzymią ilość potrzebnych obliczeń tego typu wyszukiwanie podobieństw jest możliwe tylko w dużych, wyposażonych w superkomputery centrach bioinformatycznych. Wiele centrów komputerowych za pośrednictwem internetu oferuje bezpłatny dostęp do serwisu przeszukiwań baz danych sekwencji (np. pod adresem <http://us.expasy.org/tools/aacomp/>). Korzystanie z takiego serwisu nie wymaga instalowania dodatkowego oprogramowania na komputerze użytkownika, cała procedura przeszukiwania jest bowiem realizowana przez serwer bazy danych za pośrednictwem przeglądarki internetowej. Oczywiście identyfikacja białka na podstawie jego składu aminokwasowego nie jest tym samym co bezpośrednia identyfikacja określana na podstawie sekwencji. Ze względu jednak na znacznie niższe koszty analizy aminokwasowej w porównaniu z sekwencjonowaniem może być ona bardzo użyteczna w wielu dziedzinach chemii białek.

## **7.6. Literatura**

### **7.6.1. Literatura źródłowa**

1. Jakubke, H.D., Jeschkeit, H. (1989) Aminokwasy, peptydy, białka. PWN, Warszawa.
2. Darbre A. (red.)(1986) Practical protein chemistry – A handbook. Wiley & Sons, Chichester.
3. Walker, J.M. (red.)(1996) The protein protocols handbook. Humana Press, Totowa.

### **7.6.2. Literatura uzupełniająca**

1. Ozols, J. (1990) Amino acid analysis. Methods in Enzymology 182, 581-601.
2. McClung, G., Frankenberger, W.T. (1988) Comparison of reverse-phase high performance liquid chromatographic methods for precolumn-derivatized amino acids. Journal of Liquid Chromatography. 11, 613-646.