



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

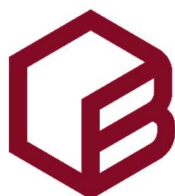


	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Projekt pt.: „STUDENCI HIPOKRATESA - kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej” w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, nr umowy: FERS.01.05-IP.08-0335/23-00

INSTRUKCJE DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z BIOCHEMII

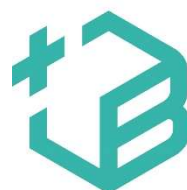
*dla kierunku lekarskiego
Politechniki Bydgoskiej
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich*



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
Wydział Technologii
i Inżynierii Chemicznej



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
Wydział Medyczny



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

AMINOKWASY, PEPTYDY, BIAŁKA



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
Wydział Technologii
i Inżynierii Chemicznej



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
Wydział Medyczny



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Materiał do przygotowania przez studenta na zajęcia

- wzory chemiczne aminokwasów, ich nazwy i skrót
- podział aminokwasów ze względu na grupę funkcyjną
- właściwości aminokwasów (fizyczne i chemiczne)
- aminokwasy endo- i egzogenne
- wiązanie peptydowe – charakterystyka i struktura (umiejętność stworzenia dipeptydu z poszczególnych aminokwasów)
- przykłady peptydów
- podział białek (proste, złożone, globularne, fibrylarne, kwaśne, zasadowe, obojętne)
- główne funkcje białek
- struktura I-, II-, III-, IV- rzędowa białka
- właściwości wiązania peptydowego
- motywy i domeny funkcjonalne białek
- właściwości białek (fizyczne i chemiczne)
- punkt izoelektryczny aminokwasów
- właściwości amfoteryczne
- techniki rozdziłu białek



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

1. Reakcja ninhydrynowa - wspólna dla wszystkich aminokwasów

Zasada:

Pod wpływem ninhydryny (wodzian triketohydrindenu) aminokwasy ulegają utlenieniu przez iminokwasy do amoniaku, dwutlenku węgla i aldehydu uboższego o jeden atom węgla. Ostatnim etapem reakcji jest kondensacja dwóch cząsteczek ninhydryny (utlenionej i zredukowanej) z amoniakiem. W wyniku powyższej reakcji powstaje kompleks o fioletowo-granatowym zabarwieniu. Natomiast prolina i hydroksyprolina dają produkt o żółtej barwie. Natężenie zabarwienia jest wprost proporcjonalne do zawartości azotu aminowego aminokwasów, co pozwala na analizę kolorymetryczną.

Wykonanie:

Do 0,5 ml rozcieńczonego, 5% roztworu aminokwasu (glicyny lub albuminy) dodać 0,5 ml 0,5% roztworu ninhydryny, a następnie ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez kilka minut do zauważenia zmian. Wykonać także próbę kontrolną, w której zamiast roztworu aminokwasu użyć 0,5 ml wody destylowanej. Zanotować obserwacje i wyjaśnić mechanizm.

Odczynniki:

- łaźnia wodna

- 5% roztwór glicyny

- 5% roztwór albuminy

- 0,5% ninhydryny

- woda destylowana

Sprzęt laboratoryjny:

- szklane probówki – 3szt.

- pipeta miarowa



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



2. Reakcje charakterystyczne dla poszczególnych aminokwasów

a. wykrywanie aminokwasów aromatycznych - próba ksantoproteinowa

Zasada:

Reakcja jest zależna od występowania aminokwasów zawierających pierścień benzenowy (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina). Dodatni wynik próby można uzyskać również w obecności związków zawierających pierścień aromatyczny (najtrudniej reakcji ulega fenyloalanina). Na skutek oddziaływania mieszaniny nitrującej (mieszanina kwasu azotowego (V) i stężonego kwasu siarkowego (VI)) pierścienie benzenowe ulegają reakcji nitrowania. Produkty reakcji ksantoproteinowej wykazują się żółtym zabarwieniem (aż do brązowej), które staje się bardziej intensywne po zakwaszeniu próby. W wyniku hydrolizy białka przez kwas azotowy osad może się rozpuścić, barwiąc roztwór na żółto, natomiast po alkalizacji barwa zmienia się na pomarańczową. Powyższa reakcja może przebiegać z różną szybkością i wydajnością, co zależy od warunków reakcji i budowy aminokwasu.

Wykonanie:

ZACHOWAĆ SZCZEGÓLNA OSTROŻNOŚĆ!

Do 1 ml roztworu **albuminy (lub jaja kurzego)** dodać 0,5 ml stężonego kwasu azotowego (V) i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez około 30 sekund. W miarę ogrzewania powstaje żółte zabarwienie, zawartość probówki ochłodzić w strumieniu zimnej wody oraz dodać kilka kropel 20% roztworu NaOH. Powtórzyć próbę z roztworem **żelatyny** i porównać wynik.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



b. wykrywanie tyrozyny

Zasada:

Jest to reakcja charakterystyczna dla monofenoli, zatem dodatni wynik próby można uzyskać wyłącznie w obecności tyrozyny. Związki organiczne tego rodzaju w reakcji z odczynnikiem Millona (mieszanina azotynów i azotanów rtęci w kwasie azotowym) dają czerwone zabarwienie roztworu. Jest to wynikiem oddziaływania jonów rtęciowych ze słabo kwaśną grupą fenolową tyrozyny.

Wykonanie:

Do 2 ml roztworu **albuminy** i do 2 ml roztworu **żelatyny** dodać po 0,5 ml/kilka kropli odczynnika Millona i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 30-60 sekund. Zanotować obserwacje, wyjaśnić mechanizm



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



c. wykrywanie aminokwasów siarkowych – próba cysteinowa

Zasada:

W środowisku zasadowym aminokwasy siarkowe pod wpływem podwyższonej temperatury ulegają rozpadowi, a powstały w wyniku tego anion siarczkowy w połączeniu z solami ołowiu (II) daje ciemnoszary nierozpuszczalny osad siarczku ołowiu (II). Obecna w białku cysteina i cystyna przekształca się wówczas w kwas pirogronowy. Ponadto produktem tej przemiany jest amoniak, siarka i jony siarczkowe. Metionina, która posiada w swoim łańcuchu bocznym grupę tiometylową nie daje pozytywnego wyniku dla tej próby.

Wykonanie:

Do 0,5 ml roztworu **albuminy** i do 0,5 ml roztworu **żelatyny** dodać po 0,5 ml 20% roztworu NaOH i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez minutę. Następnie, do obu probówek dodać po 1-2 kropli 20% roztworu octanu ołowiu (II). Po zagotowaniu zaobserwować zmianę zabarwienia roztworu. Zanotować wynik doświadczenia.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



d. wykrywanie tryptofanu

Zasada:

Reakcja aldehydowa jest próbą wykrywającą obecność rdzenia indolowego w cząsteczce aminokwasu. Grupa indolowa ulega kondensacji w obecności kwasu siarkowego z grupą aldehydową glioksalu tworząc purpurowy produkt reakcji. Dzięki tej reakcji możliwe jest wykrycie tryptofanu. Należy pamiętać, że w przypadku kwaśnych hydrolizatów białek i peptydów reakcja zawsze będzie ujemna, gdyż w czasie kwaśnej hydrolizy tryptofan ulega degradacji.

Wykonanie:

Do 1,0 ml roztworu **albuminy** i do 1,0 ml roztworu **żelatyny** dodać po 1,0 ml stężonego kwasu octowego (z dodatkiem kwasu glioksalowego), a następnie dodać ostrożnie, po ściance probówek, około 1 ml stężonego kwasu siarkowego (VI). Zaobserwować zmianę zabarwienia na pograniczu warstw roztworu. Zanotować wynik doświadczenia.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



3. Denaturacja białek

Zasada:

Proces denaturacji polega na zniszczeniu wiązań zapewniających stabilizację strukturze przestrzennej białka. Zaburzeniu podlega II-, III- i IV- rzędowa struktura białka.

Wytrącający się osad, zmętnienie, czy powstający biały pierścień zdenaturowanego białka świadczy o dodatnim wyniku reakcji.

a) Termiczna

Odmierzyć do probówki 1 ml roztworu białka jaja kurzego i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej. Zanotować obserwacje, wyjaśnić mechanizm.

b) Wytrącanie kwasem

Odmierzyć do probówki 1 ml roztworu białka jaja kurzego i dodać 1 ml kwasu trichlorooctowego. Zanotować obserwacje, wyjaśnić mechanizm



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



4. Wysalanie białka

Zasada:

Białka, ze względu na obecność grup polarnych, wiążą cząsteczki wody, dzięki czemu tworzy się płaszcz hydracyjny. Dodanie niektórych rodzajów soli do roztworu białka (np. siarczan magnezu lub amonu) powoduje jego wytrącenie z roztworu. Proces ten określa się mianem wysalania. Wysolone białko można ponownie rozpuścić w wodzie lub stosownym buforze, bez równoczesnej utraty jego właściwości.

Wykonanie:

Do kolby stożkowej na 100 ml odmierzyć 10 ml roztworu białka jaja kurzego, dodać taką samą objętość nasyconego roztworu siarczanu amonowego i wymieszać. Wytrącają się w tych warunkach globuliny. Mieszaninę przesączyć przez sączonek z bibuły, a przesącz zebrać do suchej kolby stożkowej. Do części przesączu dodać małymi porcjami, mieszając, sproszkowany siarczan amonowy (II), aż do nasycenia roztworu. Przesączyć około 1 ml roztworu przez sączonek z bibuły do probówki. Następnie dodać kroplę kwasu octowego i ogrzewać do wrzenia. Brak osadu świadczy o usunięciu białek z roztworu. Wyjaśnić reakcje.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



5. Wykrywanie wiązania peptydowego - próba biuretowa

Zasada:

Aminokwasy w peptydach i białkach są połączone ze sobą za pośrednictwem wiązania peptydowego. Nazwa reakcji wywodzi się od biuretu (związku powstającego w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek mocznika). Jest to reakcja barwna pozwalająca odróżnić pojedyncze aminokwasy od białek. Dzięki niej można wykryć obecność wiązania peptydowego w oligopeptydach (zawierających przynajmniej trzy aminokwasy, zatem dwa wiązania peptydowe) i białkach. Reakcja nie zachodzi w przypadku pojedynczych aminokwasów i dipeptydów. W środowisku zasadowym wiązanie peptydowe tworzy z jonami Cu^{2+} kompleks o fioletowej barwie, co jest wynikiem tautomeryzacji atomów w jego obrębie z utworzeniem formy $-\text{C}/\text{OH}=\text{N}-$ (grupa enolowa może wówczas dysocjować). Jon Cu^{2+} jest w stanie stworzyć dwa wiązania jonowe z tlenem dwóch grup enolowych oraz cztery wiązania koordynacyjne z atomami azotu. W środowisku zasadowym jony miedzi wytrącają się w postaci wodorotlenku, dlatego niezbędna jest obecność czynnika kompleksującego te jony. Nasilenie barwy jest uzależnione od liczby wiązań peptydowych obecnych w roztworze (co jest przydatne do ilościowego oznaczania białka), krótkie peptydy dają kompleks o barwie czerwono-fioletowej.

Wykonanie:

Do 1,0 ml roztworu albuminy dodać 0,5 ml 10% NaOH, a następnie kroplami dodawać roztwór 1% siarczanu (VI) miedzi (II). Płyn zmienia zabarwienie. Zanotować wynik doświadczenia i wytłumaczyć jego mechanizm.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



6. Ilościowe oznaczanie białka metodą biuretową

Zasada:

Reakcja ta polega na tworzeniu się z zawartą w makrocząsteczce tyrozyną związku o niebieskim zabarwieniu. Jest to podstawą kolorymetrycznego oznaczania białka. Jest to reakcja charakterystyczna dla tyrozyny, zatem wysycenie barwą jest uzależnione od ilości reszt tyrozyny w cząsteczce roztworu.

Do przygotowania krzywej wzorcowej należy dobrać odpowiednie białko. Najlepsze wyniki uzyskuje się, gdy krzywą wzorcową wykonuje się tym samym białkiem lub białkiem o zbliżonej budowie do tego, którego stężenie należy oznaczyć w próbie. Najdokładniejszy wynik można otrzymać stosując czysty preparat białkowy.

Wykonanie:

Do probówek 1-4 dodawać kolejno po 1 ml standardowych roztworów białka o stężeniach: 10, 20, 40 i 60 mg/ml. Do probówki 5-ej dodać 1 ml **próby badanej**, a do probówki 6-ej 1 ml H₂O (próba kontrolna). Następnie do każdej z tych probówek dodać po 4 ml **odczynnika biuretowego/ miedziowego** i dokładnie wymieszać. Roztwory zawierające białko przybierają barwę fioletową, której intensywność narasta w czasie, osiągając maksimum po upływie 20 minut. Po tym czasie odczytać absorbancję w poszczególnych próbach (probówki 1-5) przy długości fali 550 nm w stosunku do próby kontrolnej (probówka 6).

Sporządzić wykres kalibracyjny, uwzględniający zależność absorbancji od stężenia białka (na osi rzędnych oznaczyć absorbancję, na osi odciętych - stężenie białka) a następnie odczytać stężenie białka w próbie badanej.