



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską

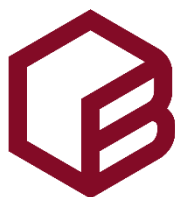


	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

*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



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską

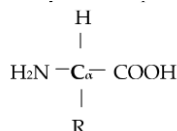


## ĆWICZENIE 1

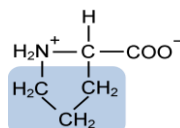
### AMINOKWASY, PEPTYDY, BIAŁKA

#### A m i n o k w a s y

Aminokwasy w swojej strukturze organicznej posiadają dwie grupy funkcyjne: aminową (NH<sub>2</sub>) i karboksylową (COOH). Wśród nich można wyróżnić związki o budowie alifatycznej, aromatycznej i heterocyklicznej. W skład białek wchodzi aminokwasy, których obie grupy funkcyjne (aminowa i karboksylowa) są połączone z atomem węgla α.



Prolina jest aminokwasem cyklicznym w którym alifatyczny łańcuch boczny łączy się zarówno z węglem α jak również z grupą aminową.



#### 1. Identyfikacja aminokwasów metodą bibułowej chromatografii

Chromatografia (gr. χρώμα (chrōma) = barwa + γράφω (graphō) = pisać) to jedna z metod rozdzielania mieszanin, w której proces rozdzielania odbywa się na granicy dwóch faz: fazy stacjonarnej (nośnika, adsorbentu) i fazy ruchomej (eluentu). Rozdział związków z badanej mieszaniny następuje na skutek różnego powinowactwa rozdzielanych substancji chemicznych do każdej z tych faz (fazy stacjonarnej lub ruchomej). W procesie tzw. rozwijania chromatogramu, czyli przepływu fazy ruchomej przez fazę stacjonarną rozdzielane substancje poruszają się z różną szybkością w zależności od stosunku ich powinowactwa do eluentu i nośnika. W chromatografii wykorzystywane są różne zjawiska fizykochemiczne (adsorpcja, podział substancji między dwie nie mieszające się cieczki, wymiana jonowa). W chromatografii bibułowej fazę stałą stanowi bibuła celulozowa a fazę ruchomą ciekły rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników.

Identyfikacji związków dokonuje się na podstawie charakterystycznej wartości R<sub>f</sub>, która jest wielkością stałą. Szybkość wędrówki poszczególnych związków jest charakterystyczna dla poszczególnych związków.

#### **Wykonanie:**

Na prostokątnej bibule ok 2 cm od dołu zaznaczyć ołówkiem linię startową oraz 4 punkty, na które nanieść przy pomocy mikropipetki 0,01 M roztwory następujących aminokwasów (po 10 kropli na jeden punkt): tyrozyny, tryptofanu, cysteiny oraz nieznanego aminokwasu. Średnica kropli musi być jak najmniejsza (po każdorazowym naniesieniu suszyć suszarką). Suchy pasek umieścić w komorze chromatograficznej, w której znajduje się roztwór układu rozwijającego (n-butanol-woda-kwas octowy lodowaty w stosunku 12:5:3). Rozwinięcie chromatografu trwa około 1 godziny. Po tym czasie wyjąć bibulę z komory i suszyć suszarką do całkowitego odparowania roztworu. Wysuszony chromatogram spryskać 1% roztworem ninhydryny (pod wyciągiem) i suszyć w suszarce w temperaturze 60-80°C. Aminokwasy występują na bibule w postaci fioletowo-niebieskich plam.

Dla każdego aminokwasu obliczyć współczynnik R<sub>f</sub> według wzoru:

$$R_f = \frac{\text{droga, która przebył badany aminokwas [cm]}}{\text{droga, którą przebył układ rozwijający [cm]}}$$



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



Po wywołaniu plam charakterystycznych dla danych aminokwasów obliczyć  $R_f$  dla trzech znanych aminokwasów i na podstawie tych wartości podać nazwę nieznanego aminokwasu

$R_f 1 =$  ———

$R_f 2 =$  ———

$R_f 3 =$  ———

$R_f x =$  ———

Nieznanym aminokwas (X) to:.....

## 2. Reakcje charakterystyczne na tyrozyne, tryptofan i cysteinę

### A. Reakcja Millona na tyrozyne

Wykrywanie tyrozyny przy użyciu odczynnika Millona (mieszanina jonów rtęci (I) i (II) oraz jonów azotanowych (III) i (V)), polega na powstaniu w środowisku stężonego kwasu azotowego (V) w temperaturze 100°C nitropochodnej tyrozyny, która z jonami rtęci (II) i rtęci (I) tworzy czerwony produkt. Reakcji ulegają również inne związki zawierające pierścień fenolowy.

#### Wykonanie

Do 0,5 ml roztworu białka dodać kilka kropli odczynnika Millona i ogrzewać w zlewce z gorącą wodą. Powstałe czerwone zabarwienie jest wynikiem reakcji jonów rtęciowych z nitrowaną tyrozyną. Odczynnik Millona zawiera jony rtęci (I) i (II) w kwasie azotowym (III) i (V).

#### Obserwacje:

#### Narysuj wzór tyrozyny:

*Tyrozyna – niezbędna do syntezy hormonów tarczycy (tyroksyny) i nadnerczy (adrenaliny i noradrenaliny), jest substratem w produkcji barwników organizmu – melanin oraz substancji zmniejszających ból – enkefalin. Tyrozyna zwiększa stężenie wielu neuroprzekaźników w organizmie, co jest szczególnie ważne dla osób żyjących w przewlekłym stresie, przemęczonych, starzejących się.*

### B. Reakcja Adamkiewicza- Hopkinsa na tryptofan

W wyniku reakcji, przebiegającej w silnie odwadniającym środowisku stężonego kwasu siarkowego (VI), powstaje barwny produkt reakcji. W probówkach zawierających aminokwasy z pierścieniem indolowym na granicy faz tworzy się fioletowy pierścień.

#### Wykonanie

Do 0,5 ml roztworu białka dodać 1 ml kwasu glioksalowego, zamieszać i dodać ostrożnie po ściankach próbówki około 1ml stężonego kwasu siarkowego.

Związki zawierające pierścień indolowy dają w środowisku kwaśnym z aldehydami barwne produkty kondensacji.

#### Obserwacje

#### Narysuj wzór tryptofanu

*Tryptofan – bierze udział w syntezie witaminy PP, czyli kwasu nikotynowego, w rozmnażaniu i laktacji, niezbędny do powstawania neuroprzekaźników (serotoniny i melatoniny), występuje w płytkach krwi,*



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



*blonie śluzowej przewodu pokarmowego, tkance nerwowej, poprawia działanie mózgu i układu nerwowego, działa antydepresyjnie, zmniejsza nadpobudliwość i napięcie.*

### **C. Reakcja cysteinowa i cystynowa**

Cystyna względnie cysteina w reakcji z wodorotlenkiem sodu przechodzi w siarczek sodu, który z octanem ołowiu (II) daje czarny PbS. Reakcja uwarunkowana jest obecnością siarki w cząsteczce białka. Cysteina i cystyna w środowisku silnie zasadowym pod wpływem temperatury ulegają deaminacji i powstają jony siarczkowe. Jony siarczkowe w obecności  $Pb^{2+}$  tworzą czarny osad PbS.

#### **Wykonanie**

Do 0,5 ml roztworu białka dodać 1 ml octanu ołowianego i 2 ml 20% NaOH. Po dłuższym gotowaniu roztwór przybiera barwę brunatną, a w końcu czarną.

#### **Obserwacje**

#### **Narysuj wzory cysteiny, cystyny i metioniny**

#### **Odpowiedz na pytanie**

Czy metionina daje pozytywny wynik tej reakcji? Wyjaśnij odpowiedź.

*Metionina – niezbędna do wzrostu, działa ochronnie na komórki wątroby, uczestniczy w syntezie cholicy, kreatyny, bierze udział w metabolizmie tłuszczów. Jest donorem siarki wykorzystywanej do syntezy przeciwutleniaczy*

*Cysteina – składnik glutationu (bardzo ważnego przeciwutleniacza), cystyny, substrat do produkcji tauryny. Jest niezbędna do wytwarzania białych krwinek, czyli budowania odporności organizmu. Spowalnia procesy starzenia się. Bierze udział w tworzeniu struktur skóry, włosów i paznokci*

### **D. Reakcja ksantoproteinowa**

Reakcja jest charakterystyczna dla aminokwasów aromatycznych i fenoli. Pod działaniem stężonego kwasu azotowego (V) pierścień benzenowy ulega nitrowaniu a powstałe żółte pochodne wielonitrowe dają w roztworze alkalicznym pomarańczowe aniony. Dodatnią próbę ksantoproteinową dają tyrozyna i tryptofan natomiast fenyloalanina wymaga do znitrowania jeszcze dodatku kwasu siarkowego (VI).

#### **Wykonanie**

Do 1 ml roztworu białka dodać 0,5 ml stężonego kwasu azotowego (V) i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez około 30 sekund. W miarę ogrzewania powstaje żółte zabarwienie. Po ostudzeniu i dodaniu 1 ml 20% NaOH żółte zabarwienie przechodzi w pomarańczowe, które pogłębia się po dodaniu kilku kropli 20% roztworu NaOH.

#### **Obserwacje**

#### **Narysuj wzory: tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny:**



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



## Białka

### Właściwości fizyko-chemiczne białek

Właściwości fizyko-chemiczne białek wynikają przede wszystkim z faktu, że białka są związkami wielkocząsteczkowymi o dużym powinowactwie do wody. Należą do grupy koloidów hydrofilowych, dlatego wiele cech białek jak pęcznienie, niemożność przechodzenia przez błony półprzepuszczalne, tworzenie koloidów glebowych, koagulacja czynnikami fizyczno-chemicznymi, duża lepkość roztworów i wiele innych świadczy o tym, że są one koloidami hydrofilnymi.

#### A. Dializa

Z uwagi na duży rozmiar cząsteczek związki wielkocząsteczkowe nie przenikają przez błony półprzepuszczalne, w przeciwieństwie do cząsteczek tworzących roztwory właściwe (sole mineralne, cukry, aminokwasy itp.). Stosując przegrodę z błony półprzepuszczalnej można oddzielić od siebie substancje drobno i wielocząsteczkowe. Proces ten nazywa się dializą, a jego szybkość zależy od rodzaju błony półprzepuszczalnej, charakteru rozdzielanych związków, różnicy stężeń związków dyfundujących po obu stronach błony, mieszania, temperatury.

#### Wykonanie

Do woreczka dializacyjnego wprowadzić pipetą 10 ml mleka. Woreczek zawiesić na bagietce opartej o krawędź zlewki o pojemności 250 ml wypełnionej wodą destylowaną. Poziom mleka w woreczku i wody w zlewce powinien być jednakowy. Dializę prowadzić przez około 2 godz. Po zakończeniu dializy pobrać po 1 ml mleka z woreczka oraz 1 ml płynu dializacyjnego i wykonać następujące reakcje:

- na obecność  $\text{Cl}^-$  - do prób dodać 10 ml 0,01 N  $\text{AgNO}_3$ ,
- na obecność  $\text{Ca}^{2+}$  - do prób dodać 10 ml szczawianu amonu,
- reakcję biuretową – do prób dodać kilka kropeł roztworu  $\text{CuSO}_4$ , a następnie zalkalizować stężoną zasadą sodową.

#### Opisać wyniki reakcji

- na obecność  $\text{Cl}^-$  w białku -
- na obecność  $\text{Cl}^-$  w płynie dializacyjnym -
- na obecność  $\text{Ca}^{2+}$  w białku -
- na obecność  $\text{Ca}^{2+}$  w płynie dializacyjnym -
- biuretowej w białku -
- biuretowej w płynie dializacyjnym -

Reakcja biuretowa jest reakcją barwną, którą dają wszystkie połączenia, posiadające co najmniej dwie grupy  $-\text{CO}-\text{NH}-$  Reakcję tę daje również biuret i nieliczne związki nie posiadające wiązań peptydowych, a zawierające ugrupowania  $(-\text{CS}-\text{NH}-)$  lub  $(=\text{CH}-\text{NH}-)$ . Z siarczanem (V) miedzi (III) w roztworze zasadowym biuret daje barwne związki kompleksowe. Reakcji tej nie dają aminokwasy i dipeptydy. Próba biuretowa jest odczynem grupowym na białka. Ujemny wynik reakcji eliminuje obecność białka.

#### Wnioski:

