



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

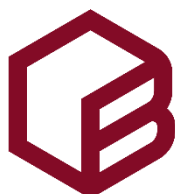


	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

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 2

AMINOKWASY, PEPTYDY, BIAŁKA

A m i n o k w a s y

1. Identyfikacja aminokwasów metodą niskonapięciowej elektroforezy bibułowej

Ruch cząstek, obdarzonych ładunkiem elektrycznym, względem fazy ciekłej (roztworu) w polu elektrycznym, wytworzonym przez różnicę potencjału, nazywa się elektroforezą. Zatem w roztworze koloidalnym, w którym są zanurzone elektrody i między nimi występuje różnica potencjału, ma miejsce ruch cząstek naładowanych w kierunku do elektrody o przeciwnym ładunku. Jeżeli cząstki koloidalne posiadają ładunek ujemny, wtedy wędrują do elektrody dodatniej (anody) i proces nazywa się anaforezą. Natomiast w przypadku cząstek naładowanych dodatnio ich ruch jest skierowany w stronę katody, elektrody ujemnej, a proces ten nazywa się kataforezą. Elektroforezę można wykorzystać do rozdzielania cząstek obdarzonych ładunkiem elektrycznym przy zastosowaniu pola elektrycznego. Szybkość przesuwania się cząstki zależy od wielkości spadku potencjału, natężenia prądu, pH środowiska, temperatury, przewodnictwa i lepkości roztworu. Kierunek ruchu cząsteczki zależy od jej ładunku (znak i wartość), rozmiarów (geometria), zdolności do dysocjacji oraz tworzenia kompleksów ze składnikami środowiska obdarzonymi ładunkiem elektrycznym.

W metodzie niskonapięciowej elektroforezy bibułowej aminokwasy i inne związki poddane działaniu różnicy potencjałów w roztworze, którym przesiąknięta jest bibuła migrują z różną szybkością w kierunku odpowiedniej elektrody. Przy pH niższym od swego punktu izoelektrycznego, cząsteczka aminokwasu ma sumaryczny ładunek dodatni, jest kationem i wędruje do katody (-), natomiast przy pH wyższym ma ładunek ujemny, jest anionem i wędruje do anody (+). Przesunięcie się cząstki od miejsca naniesienia określa się zwykle po wywołaniu elektroforegramu, np. w przypadku aminokwasów – stosuje się najczęściej reakcję ninhydrynową.

Wykonanie

Na pasku bibuły Whatman nr 1 zaznaczyć ołówkiem poprzeczną linię startu w połowie długości paska. Przeciwnie końce oznaczyć znakami + i -. Roztwór aminokwasów wzorcowych i otrzymany do identyfikacji nieznany aminokwas, nanieść mikropipetą w ilości kilku kropli na linii startu (dla każdego aminokwasu zaznaczyć na bibule tylko jeden punkt). Po każdorazowym nałożeniu, plamę wysuszyć. Do kuwet umieszczonych w aparacie wlać 0,066 M bufor fosforanowy o pH 6,0 tak, aby jego poziom sięgał powyżej elektrod.

Przygotowany pasek bibuły umieścić w aparacie zgodnie z oznaczeniem znaków elektrod.

Końce paska powinny być zanurzone w buforze, a jego pozostała część zwilżona ostrożnie tamponem waty nasyconym buforem.

Zamknąć komorę, włączyć zasilacz do sieci i ustawić napięcie 225 V. Po dwóch godzinach wyłączyć aparat, wyjąć elektroforegram i wysuszyć w gorącej suszarce.

Wysuszony pasek bibuły spryskać roztworem ninhydryny i ponownie umieścić w gorącej suszarce, wyjąć w momencie ukazania się na nim plam.

Porównać położenie plam aminokwasów wzorcowych z plamami uzyskanymi przez rozdział mieszaniny. Określić skład otrzymanego do identyfikacji roztworu.

Dołączyć do sprawozdania elektroforegram.

Reakcja z ninhydryną służy do jakościowego i ilościowego oznaczania wolnych aminokwasów. Podczas ogrzewania z ninhydryną w pH 5,0–5,5 aminokwasy ulegają tlenowej dezaminacji i dekarboksylacji. W czasie tej reakcji ninhydryna redukuje się i łączy z amoniakiem powstałym z rozkładu aminokwasu oraz drugą cząsteczką ninhydryny, tworząc kompleks o zabarwieniu fioletowo-niebieskim z maksimum absorpcji przy 570 nm.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



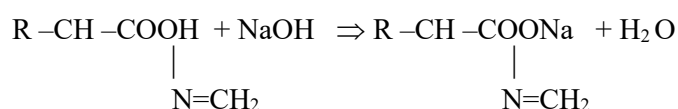
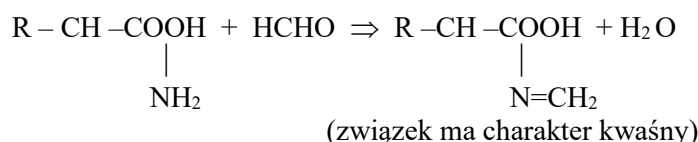
Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



2. Ilościowe oznaczanie aminokwasów metodą formolową Sörensena

Aminokwasy dzięki posiadaniu grupy karboksylowej i aminowej mają charakter amfoteryczny. Pod wpływem działania aldehydu mrówkowego blokowana zostaje grupa aminowa (powstaje metylenowa pochodna aminokwasu) a wolna grupa karboksylowa może być miareczkowana. Reakcja przebiega następująco:



Wykonanie

Odmierzyć 10 ml badanego roztworu aminokwasu (glicyna) do kolbki stożkowej, dodać parę kropli fenoloftaleiny i zobojętnić 0,1 N NaOH do różowego zabarwienia. Oddzielnie odmierzyć 20 ml 20% formaliny, którą również należy zobojętnić 0,1 N NaOH wobec fenoloftaleiny do różowego zabarwienia. Następnie zmieszać obydwie roztwory ze sobą. W wyniku tego roztwory odbarwią się. Odczyn staje się kwaśny. Odbarwiony roztwór miareczkować 0,1 N NaOH do wyraźnego czerwonego zabarwienia. Z ilości ml 0,1 N NaOH zużytej przy miareczkowaniu, już po zmieszaniu uprzednio zobojętnionych płynów, obliczyć ilość miligramów glicyny.

Z ilości ml 0,1 N NaOH zużytej przy miareczkowaniu, już po zmieszaniu uprzednio zobojętnionych płynów, obliczyć ilość miligramów glicyny.

Ilość aminokwasu (glicyna w mg) = ilość 0,1 N NaOH x 7,5 (milirównoważnik)

Ilość glicyny w badanej próbce (mg) =

3. Ciepłna denaturacja białek

Ogrzewanie roztworów białek powyżej temp. 40°C przyczynia się do ich denaturacji, ulega wtedy zniszczeniu struktura wtórna białek (drugo-, trzecio- i czwartorzędowa). Nie zmieniona pozostaje jedynie struktura pierwszorzędowa. W wyniku denaturacji obniża się rozpuszczalność, następuje wzrost lepkości i wzrost kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego.

Białka w zależności od składu aminokwasowego ulegają denaturacji już w temperaturze 40°C, inne dopiero po ogrzaniu do 100°C. Tylko nieliczne białka wytrzymują krótkie gotowanie, na przykład żelatyna czy rybonukleaza. W punkcie izoelektrycznym (pI) termicznie denaturowane białka wytrącają się z roztworu ponieważ ich ładunek elektryczny równy jest zero. W środowisku silnie kwaśnym stają się kationami natomiast w środowisku silnie zasadowym anionami.

Wykonanie

Do pięciu probówek nalewamy po 2 ml około 0,5% roztworu białka jaja kurzego. Pierwszą probówkę pozostawiamy bez zmian. Do pozostałych czterech probówek nalewamy następujących odczynników:



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



- do drugiej – 1 kroplę 1% kwasu octowego,
- do trzeciej – 0,5 ml 10% kwasu octowego,
- do czwartej – 0,5 ml 10% kwasu octowego i 3-4 krople 10% NaCl
- do piątej – 0,5 ml 10% NaOH.

Uzupełnij tabelę:

Probówka	Zawartość próbki	Obserwacje po zagotowaniu (osad)
1	2 ml około 0,5% roztworu białka jaja kurzego	
2	2 ml około 0,5% roztworu białka drugiej + 1 kropla 1% kwasu octowego	
3	2 ml około 0,5% roztworu białka + 0,5 ml 10% kwasu octowego	
4	2 ml około 0,5% roztworu białka = 0,5 ml 10% kwasu octowego i 3-4 krople 10% NaCl	
5	2 ml około 0,5% roztworu białka + 0,5 ml 10% NaOH	

Wnioski