



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

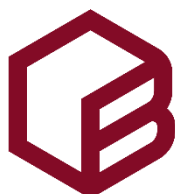


	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

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



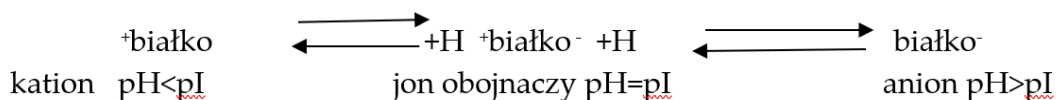
ĆWICZENIE 3

BIAŁKA

1. Fizyko-chemiczne właściwości białek

A. Amfoteryczny charakter białek

Podstawowym elementem strukturalnym białek jest łańcuch polipeptydowy zbudowany z cząsteczek aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniem peptydowym wytwarzającym się w reakcji grupy aminowej ($-NH_2$) jednego aminokwasu oraz karboksylowej ($-COOH$) drugiego aminokwasu. W cząsteczce białka grupami zdolnymi do jonizacji pozostają więc tylko grupy $-COOH$ aminokwasów dikarboksylowych (kwas asparaginowy, kwas glutaminowy), grupy $-NH_2$ aminokwasów zasadowych (arginina, lizyna, histydyna), nieznaczna ilość tych grup na końcach łańcuchów polipeptydowych oraz grupa $-OH$ tyrozyny, $-SH$ cysteiny, reszta imidazolowa histydyny oraz guanidynowa argininy. Dzięki temu białka posiadają charakter amfoteryczny. W roztworach wodnych występują w formie zjonizowanej. Stan elektryczny cząsteczki białka zależy więc od pH środowiska. W środowisku kwaśnym, na skutek nadmiaru jonów wodorowych, dysocjacja grup kwasowych cofa się, a cząsteczka białkowa jest kationem. Natomiast w środowisku zasadowym, gdy grupy zasadowe tracą ładunek elektryczny, cząsteczka białka jest anionem.



W odczynie środowiska (pH), w którym następuje zrównoważenie ładunków dodatnich i ujemnych w cząsteczce białka staje się ona jonem obojnym. Stężenie jonów wodorowych przy którym to następuje nazywa się punktem izoelektrycznym (pI). Wartość pI jest wielkością charakterystyczną dla danego białka i może przybierać różne wartości: pepsyna $< 1,1$; albumina jaja $4,6$; kazeina $4,7$; żelatyna $4,9$; laktoglobulina $5,2$; hemoglobina $6,8$; mioglobina $7,0$; protamina $12,0$. W punkcie tym wartość ładunku elektrycznego białka oraz jego przewodnictwo jest najmniejsze, ponadto białka wykazują również najmniejszą ruchliwość i w związku z tym wiele z nich ulega wówczas wytrąceniu lub też przejściu z postaci zolu w postać żelu. W punkcie izoelektrycznym białka cechuje też najmniejsza lepkość, zdolność pęcznienia i rozpuszczalność oraz wartość ciśnienia osmotycznego. Parametry te można wykorzystywać do identyfikacji i rozdzielania białek.

W środowisku o pH większym od punktu izoelektrycznego ($\text{pH} > \text{pI}$) białka stają się anionami i reagują z kationami, tworząc z nimi połączenia jonowe lub kompleksy. Powstające sole dysocjują w różnym stopniu, w zależności od jonu. W środowisku o pH poniżej punktu izoelektrycznego białka zdysocjowane w formie kationów wykazują zdolność do wiązania z anionami.

Wykonanie

1. Przygotować dwie próbki. Do jednej nalać 2 ml wody destylowanej, a do drugiej 2 ml 0,5% roztworu żelatyny. Do każdej z nich dodać po 3 krople zieleni bromokrezolowej i kroplami z zakraplacza 0,01 N HCl aż do uzyskania barwy żółtej (pH ok. 3,0). Policzyć krople HCl.
2. Do jednej próbki nalać 2 ml wody destylowanej, a do drugiej 2 ml 0,5% roztworu żelatyny. Użyć jako wskaźnika błękitu tymolowego i miareczkować z zakraplacza licząc krople 0,01 N NaOH do uzyskania barwy niebieskiej.

Liczba kropli HCl w zieleni bromokrezolowej w wodzie:



Liczba kropli HCl w zieleni bromokrezolowej w żelatynie:

Liczba kropli NaOH w błękitu tymolowego w wodzie:

Liczba kropli NaOH w błękitu tymolowego w żelatynie:

Porównaj wyniki z wykonanego doświadczenia i wyciągnij wnioski.

B. Strącanie białka kationami

Przygotować 9 probówek i podzielić na trzy szeregi. Do pierwszego szeregu odmierzyć po 2 ml roztworu albuminy o pH 4,7 (punkt izoelektryczny), do drugiego 2 ml albuminy o pH 8,0 (białko anionowe), a do trzeciego po 2 ml albuminy o pH 3,0 (białko kationowe). Do pierwszych probówek w każdym szeregu dodać kroplę 20% roztworu siarczanu (VI) miedzi (II), do następnych 20% siarczanu (VI) cynku (II) i do ostatnich 10% roztworu siarczanu (VI) żelaza (II). Ponieważ strącone osady rozpuszczają się w nadmiarze odczynnika dodać na początku po 1 kropli, a dopiero w razie potrzeby więcej.

A. Strącanie białka anionami

Kation białkowy daje z pewnymi anionami kwasowymi nierozpuszczalne sole. Powtórzyć ćwiczenie poprzednie używając zamiast kationów 1% roztwory żelazocyjanku potasu, kwasu pikrynowego i wolframianu sodu. W jakim pH strąca się białko anionami? Czy białko w punkcie izoelektrycznym reaguje z anionami i kationami?

Wyniki opisać w tabeli:

pH albumin	20% siarczan (VI) miedzi (II)	20% siarczan (VI) cynku (II)	20% siarczan (VI) żelaza (II)	1% żelazocyjanek potasu	1% kwas pikrynowy	1% wolframian sodu
4,7 - punkt izoelektryczny						
8,0 – białko anionowe						
3,0 - białko kationowe						

Odpowiedz na pytania?

W jakim pH strąca się białko anionami, a w jakim kationami?

Czy białko w punkcie izoelektrycznym reaguje z anionami i kationami? Uzasadnij odpowiedzi.

B. Strącanie białek

Próba Hellera

Wykonanie

Do 1 ml stężonego kwasu azotowego (V) wlać ostrożnie po ściankach probówki 1 ml roztworu białka tak, aby białko nie mieszało się z kwasem.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Na granicy zetknięcia się dwóch płynów powstaje biały krążek zdenaturowanego i skoagulowanego białka nierozpuszczalnego w nadmiarze kwasu. Niekiedy pierścień posiada żółte zabarwienie, co jest wynikiem reakcji ksantoproteinowej.

Stężony kwas solny i siarkowy (VI) denaturują białko, ale nie wytrącają go, w odróżnieniu od stężonego kwasu azotowego (V). Działanie stężonych kwasów powoduje rozerwanie wiązań jonowych i niektórych wodorowych.

Porównaj powyższą próbę Hellera z działaniem stężonego kwasu solnego.

Opisz wyniki obydwu reakcji.

Reakcja ksantoproteinowa uwarunkowana jest obecnością w cząsteczce białka aminokwasów zawierających pierścień aromatyczny (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina). Pod wpływem stężonego HNO_3 , zachodzi nitrowanie pierścienia benzenowego. W wyniku tej reakcji powstaje połączenie nitrowe o żółtej barwie. Dodatnią próbę ksantoproteinową dają również inne związki aromatyczne (fenol, benzen).

Wysalanie białek

Stężone roztwory soli obojętnych (siarczan (VI) amonu, sodu lub magnezu) wysalają białka z roztworu. Zjawisko to jest związane z odwodnieniem cząstki białka. Jony soli są o wiele bardziej przyciągane przez dipole wody aniżeli białka. Sole powodują, że białko traci płaszcz hydratacyjny i następuje obniżenie rozpuszczalności, w efekcie czego białko wypada z roztworu. Jest to proces odwracalny. Po obniżeniu stężenia soli (np. przez dodanie wody) można z powrotem rozpuścić wytrącone białko. Wysalanie nie powoduje denaturacji białka, po ponownym rozpuszczeniu wykazuje ono swoje rodzime właściwości.

Wykonanie

Do 2 ml rozcieńczonego mleka dodać stałego siarczanu amonu do całkowitego nasycenia. Wytrącony osad białka przesączyć. Potwierdzić w przesączu brak białka próbą Hellera.

Opisz zmiany jakie zachodzą pod wpływem soli i czy wykazano białko w przesączu.

Wyjaśnij jaki proces nastąpił i dlaczego?

C. Ilościowe oznaczanie białka reakcją biuretowa

Ilościowe oznaczanie białka reakcją biuretową

Metoda krzywej wzorcowej jako sposób oznaczenia ilości badanych składników polega na ustaleniu zależności pomiędzy stężeniem oznaczonej substancji a absorbancją (ekstynkcją). Przygotowuje się serię roztworów wzorcowych oznaczonej substancji o różnych, znanych stężeniach i dokonuje dla nich pomiaru absorbancji przy określonej długości fali. Od ich wartości odejmuje się wartość absorbancji „próby ślepej” (próba zerowa bez badanej substancji). Na podstawie wartości stężenia wzorcowych roztworów albuminy i ich absorbancji wykreśla się krzywą wzorcową.

Wykonanie



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Przygotować roztwory do krzywej wzorcowej, próby zerowej oraz próby badanej. W obecności białka pojawi się fioletowo-różowa barwa. Pomiaru wszystkich prób dokonywać wobec próby zerowej na spektrofotometrze Spekol przy długości fali 630nm. Krzywą wykreślić w zeszycie ćwiczeń.

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Przygotować 5 kolbek o pojemności 100cm³, do których kolejno nalać 1, 3, 5, 7 i 10 ml wzorcowego roztworu białka zawierającego 1mg albuminy/cm³ roztworu, uzupełnić do kreski wodą destylowaną. Roztwory wzorcowe zawierają kolejno 10, 30, 50, 70 i 100µg albuminy/ml. Następnie przygotować 10 probówek (oznaczenie wykonać w dwóch powtórzeniach), do których odmierzyć po 1cm³ roztworów wzorcowych (z pierwszej kolbki do dwóch probówek, z drugiej do następnych dwóch itd.), dodać 2 ml roztworu 6N NaOH (ostrożnie żrące!) oraz 0,5 ml 0,5% roztworu siarczanu miedziowego. Wymieszać i odstawić na pół godziny.

Próba zerowa

W próbie zerowej zamiast roztworu białka stosuje się 1ml wody destylowanej, pozostałe odczynniki bez zmian jak w próbie właściwej.

Wykonanie oznaczenia próby badanej

Do dwóch probówek odmierzyć po 1mlbadanego roztworu białka, dodać 2 ml roztworu 6N NaOH (ostrożnie żrące) oraz 0,5 ml 0,5% roztworu siarczanu miedziowego, wymieszać. Po pół godzinie mierzyć wobec próby zerowej na aparacie Spekol przy długości fali 630nm.

Na podstawie wyznaczonej krzywej wzorcowej obliczyć zawartość µg albuminy/ml w badanej próbie.

Wykres krzywej wzorcowej (papier milimetrowy)

D. Wykrywanie białka w ślinie metodą biuretową

W ślinie obecnych jest wiele rodzajów białek, w tym enzymy, takie jak amylaza ślinowa i lizozym, a także białka o działaniu ochronnym jak laktoferyna i immunoglobuliny. Występują w niej także mucyny, które nawilżają pokarm, oraz histatyny. Niektóre białka mogą być markerami konkretnych schorzeń. Na przykład, białko S100B może wskazywać na uszkodzenie mózgu, a inne białka obecne w ślinie mogą być markerami raka jamy ustnej, szpiczaka mnogiego, czy procesów autoimmunologicznych.

Wykonanie

Przygotować 2 probówki. Do pierwszej odmierzyć 1 ml śliny, natomiast do drugiej 1 ml wody destylowanej.

Do obu probówek dodać po 2 krople 10% roztworu NaOH oraz po 2 krople 1% roztworu CuSO₄.

Porównać zabarwienie roztworu w obu probówkach.

Wyniki zapisać w tabeli:

	Zabarwienie po dodaniu odczynników
ślina	
woda destylowana	

Wyciągnąć wnioski:



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

