

STANOVENÍ CELKOVÉ BÍLKOVINY, DEPROTEINACE

Úloha 1: Stanovení celkové bílkoviny biuretovou reakcí

Princip:

Biuretová reakce je reakce, při níž se dokazuje bílkovina pomocí směsi roztoků NaOH a CuSO₄. Bílkovina se při důkazu zbarví modrofialově. Biuretovou reakcí dokážeme peptidové vazby. Ty tvoří v alkalickém prostředí se solemi mědi charakteristicky barevný komplex. Reakci dávají obecně látky obsahující v molekule dvě skupiny –CO-NH₂, resp. –CO-NH-. Reakci poskytují tedy nejen bílkoviny, ale i peptidy.

Název reakce je odvozen od nejjednodušší sloučeniny, která poskytuje tuto reakci – biuret. Biuret vzniká zahřátím močoviny.



Roztoky a pomůcky:

biuretové činidlo (složení: síran měďnatý (36 mmol/l), vinan sodno-draselný (95 mol/l), hydroxid sodný (1,8 mol/l) a jodid draselný (90 mmol/l).

Pracovní roztok připravíme naředěním biuretového činidla s dest. vodou v poměru 1:2.

pístové mikropipety

zkumavky

stojánek na zkumavky

Postup:

Do zkumavek pipetujte podle tabulky:

	VZOREK	STANDARD	BLANK
Vzorek	40 μl	---	---
Standard	---	40 μl	---
Destilovaná voda	---	---	40 μl
Pracovní roztok	2000 μl	2000 μl	2000 μl

Nechte inkubovat při laboratorní teplotě 30 minut. Poté změřte absorbanci vzorku a standardu proti blanku (540 nm) a vypočítejte koncentraci celkové bílkoviny ve vzorku. Pro výpočet použijte znalost Lambert-Beerova zákona. Do závěru napište koncentraci bílkoviny v neznámém vzorku.

Výpočet:

$$c_{\text{vz}} = c_{\text{st}} \cdot \frac{A_{\text{vz}}}{A_{\text{st}}}$$

Závěr:



Úloha 2: Stanovení účinnosti deproteinační činidel

Deproteinace je klíčová operace při přípravě vzorků biologického materiálu k analýze. Bílkoviny interferují při řadě stanovení. Bílkoviny jsou ze vzorku odstraňovány denaturací s pomocí roztoků kyselin, organických rozpouštědel, roztoků anorganických solí nebo roztoků některých těžkých kovů. Denaturací rozumíme změny v prostorové struktuře bílkovin – neštěpí se peptidové vazby, ale narušují se nekovalentní vazby (vodíkové můstky, iontové vazby, hydrofobní interakce). Dochází k porušení globulárního tvaru bílkoviny – peptidové řetězce se rozvinou a „obnaží“ se tak hydrofobní skupiny, které byly původně skryté uvnitř globule. Účinnost deproteinační je vyšší za chladu.

Precipitace kyselinou:

Principem je tvorba nerozpustné soli s kationickou (NH_3^+) formou bílkovin. Nerozpustnou sůl oddělíme od supernatantu centrifugací.

Používají se nejčastěji: kyselina sulfosalicylová, metafosforečná, trichloroctová, chloristá, fosfowolframová, molybdenová. K denaturaci se používají 5-20% roztoky uvedených kyselin.

Precipitace organickým rozpouštědlem:

Principem je snížení polaridy vodného prostředí a tudíž i snížení rozpustnosti bílkovin ve vodně-organickém prostředí.

Některá organická rozpouštědla (alkohol, aceton, ether atd.) působí jako dehydratační činidla. Dehydratace je pak provázena i ztrátou náboje, čímž se stabilita ještě více sníží a bílkoviny z roztoku vypadnou.

Používají se nejčastěji: methanol, ethanol, acetonitril. Tedy rozpouštědla mísitelná s vodou. (Jako deproteinační činidlo lze použít též aceton. Avšak jeho využití je limitováno vzhledem k výrazné absorpenci při vlnových délkách pod 330 nm, která může rušit UV-detekci analytu.)

Precipitace solemi:

Principem je neutralizace náboje bílkovin, které se v roztoku udržují tím, že se jejich shodně nabitě částice navzájem odpuzují. Neutralizací náboje dochází tedy k agregaci.

Používají se nejčastěji soli alkalických kovů, kovů alkalických zemin a amonné soli ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , MgSO_4 atd). Dále mohou být bílkoviny odstraněny i přidávkem měďnatých či zinečnatých solí v alkalickém prostředí. (Mechanismus srážení je opačný než při deproteinační kyselinami – reakce s anionickou formou molekuly bílkoviny.)

Roztoky a pomůcky:

deproteinační činidla

biuretové činidlo

pístové mikropipety

mikrozkumavky

zkumavky



Postup:

Do mikroskopavky napipetujte 200 μ l vzorku a 200 μ l deproteinačního činidla. Centrifugujte 10 min při 4°C (15000 ot/min). V supernatantu stanovte pomocí biuretové reakce (viz. úloha 1) množství bílkoviny.

Vypočítejte účinnost jednotlivých deproteinačních činidel a do závěru zhodnoťte, které deproteinační činidlo je nejvíce a které je nejméně účinné.

Závěr: