

**INSTRUMENTÁLNĚ NENÁROČNÉ EXPERIMENTY
NA PODPORU VÝUKY CHEMIE
PŘÍRODNÍCH LÁTEK A BIOCHEMIE**

**Václav Martínek
a kol.**



Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

2007

ELEKTROFORESA V AGAROSOVÉM GELU - separace proteinů, barviv a nukleových kyselin

Proteinová nativní elektroforesa

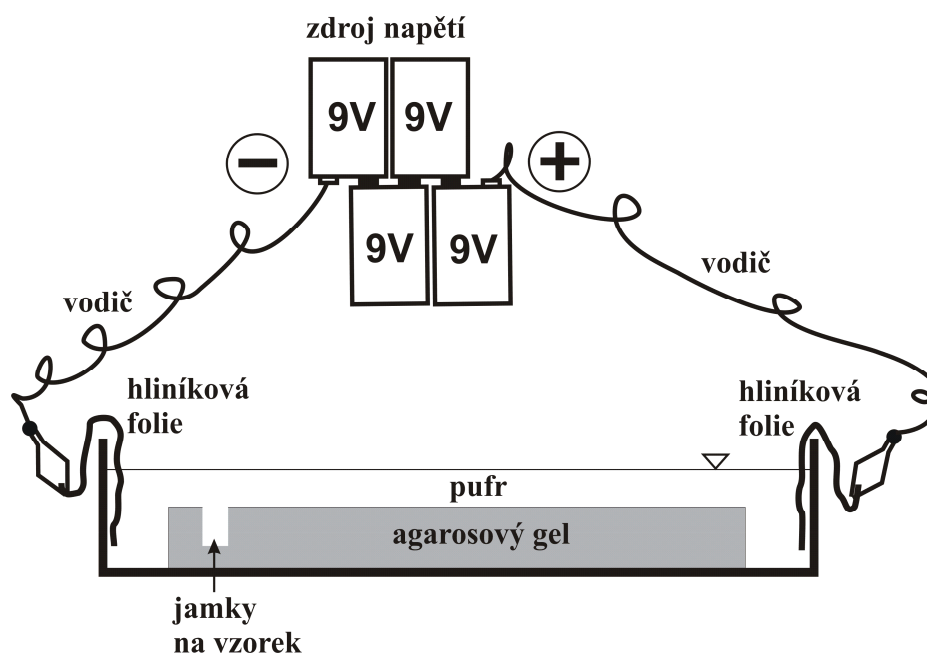
Princip: Elektroforesa v agarosovém gelu lze použít k identifikaci, separaci a purifikaci molekul nesoucích náboj. Tyto molekuly jsou v gelu děleny podle velikosti jejich náboje (migrace k anodě nebo katodě, přičemž velikost náboje určuje rychlost) a velikosti (gel vlastně působí jako síto).

Úkoly: Pomocí elektroforézy rozdělte a identifikujte proteiny vaječného bílku

Chemikálie: Vzorek proteinu: vaječný bílek, sušené odtučněné mléko, hovězí sérový albumin (BSA), lysozym; agarosa (či potravinářský agar (Jeho chemické složení i vlastnosti jsou podobné jako u agarosy avšak polysacharid agaru je modifikován sulfátovými skupinami a znečištěn pektinovými látkami a solemi což negativně ovlivní rozlišení.)), 0,1 % roztok NaHCO_3 , sacharosa

- barvicí lázeň Coomassie Brilliant Blue R 250 (2g Coomassie Brilliant Blue R 250 v 1 litru 50% ethanolu s 10% kys. octovou) nebo 0,1% bromfenolová modř
- odbarvovací lázeň (50% ethanol s 10% kys. octovou)

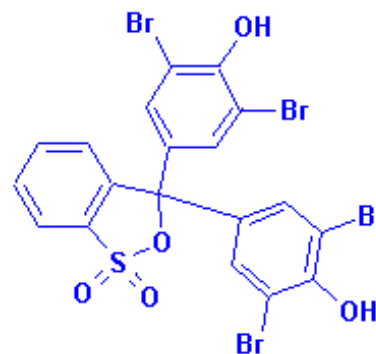
Pomůcky: nevodivá nádoba cca 5 x 10 cm na gel nejlépe průhledná bezbarvá (např. plastová krabička na mýdlo, krabička na potraviny), materiál na výrobu hřebene (např. voskovaný papír či cca 2 mm plastový tácek ...), materiál na elektrody: silný alobal (grilovací tácky), tuha do versatilky, uhlíková elektroda ze suchých článků nebo ocelový drát, 2 kabely různých barev s „krokosvorkami“, baterie R9 (9 V) – na 1 gel 4 až 6 baterií spojených do série, pro manipulaci s malým množstvím kapalin (malá injekční stříkačka (inzulínka), tenká slámka, dutá tyčka od lízátka, kapátko), mikrovlnná trouba nebo plynový kahan + síťka, zkumavky, kapátko, rukavice.



Postup:

- jako elektrodový pufr použijeme 0,1 % roztok NaHCO_3 (na jednu elektroforesu stačí cca 200 ml)
- z něj připravíme krátkým zahřátím v mikrovlnce (2 min na 500 W) cca 50 ml 1% agarosy **POZOR:** vroucí agar pění a může vzkypt!!
- necháme ji zchladnout na asi 60°C (lze na něm krátce udržet ruku), pak jej lze nalít do vaničky, hřeben umístíme doprostřed (některé proteiny jsou za použitého pH nabitě kladně jiné záporně, budou se tedy pohybovat na obě strany) a dáme gel ztuhnout do chladničky

- vzorkový pufr připravíme také z 0,1 % NaHCO₃, přidáme cca 20% objemu sacharosy pro zvýšení hustoty a trochu bromfenolové modři pro usnadnění nanášení
- na špičku lžičky (cca 0,2 mg) vzorkových proteinů dle Tabulky 1. rozpustíme ve 0,1 ml vzorkového pufru; bílek 10x naředíme vzorkovým pufrem, a vše opatrně promícháme
- u ztuhlého gelu odřízneme konce a zalijeme ho cca 50 ml elektrodového pufru a pak opatrně vytáhneme hřeben
- do jamek nanese pomocí inzulínky vzorky tak, aby se nedostali mimo ně a zapojíme stejnosměrný proud (6 x 9 V)

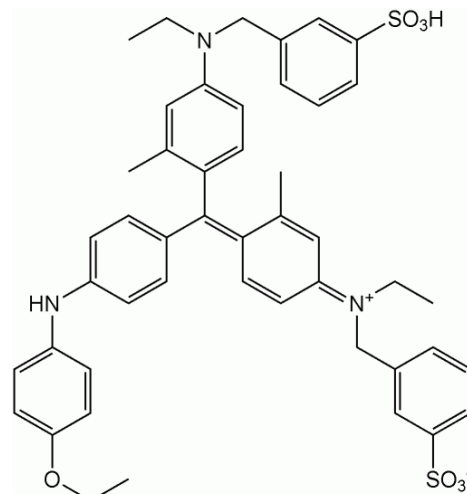


Bromfenolová modř

Tabulka 1.

Protein	zdroj	Molekulová hmotnost	Isoelektrický bod (pI)
Lysozym	kur domácí -vejce	14 100 g/mol	10,7
Ovalbumin	kur domácí -vejce	43 500 g/mol	4,6
Sérový albumin (BSA)	tur domácí	67 000 g/mol	4,9
Bílek	kur domácí -vejce	směs proteinů	

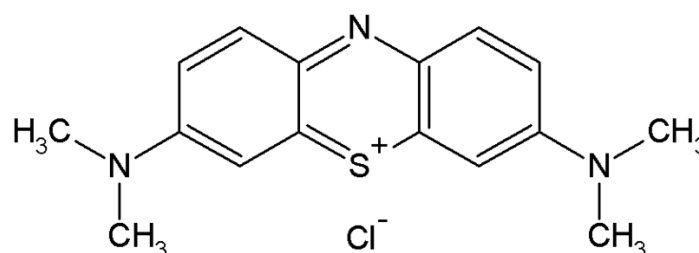
- elektroforesu ukončíme odpojením proudu, když modrá zóna doputuje aspoň do 1/2 vzdálenosti ke kraji gelu,
- gel v rukavicích vyndáme, označíme jednu stranu odříznutím růžku a přeneseme na 15 minut do kádinky s barvicí lázní (2g Coomassie Brilliant Blue R 250 v 1 litru 50% ethanolu s 10% kys. octovou)
- gel odbarvíme pomocí odbarvovací lázně (50% ethanol s 10% kys. octovou)



Modifikace: elektroforesa organických barviv

Postup: Místo vzorků proteinů nanese směs či samotná barviva rozpuštěná ve vzorkovém pufru. Migrace barviv je patrná již během elektroforesy, gel tudíž není nutno barvit ani odbarvovat.

Indigotin E132, Azorubin E122



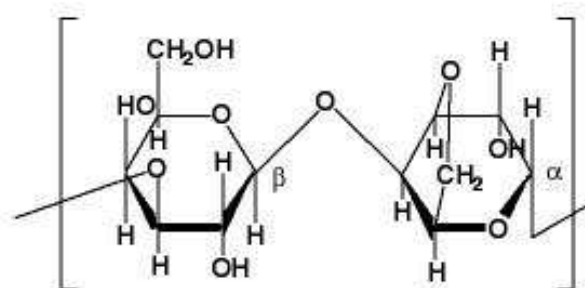
Methylenová modř

Doprovodné experimenty:

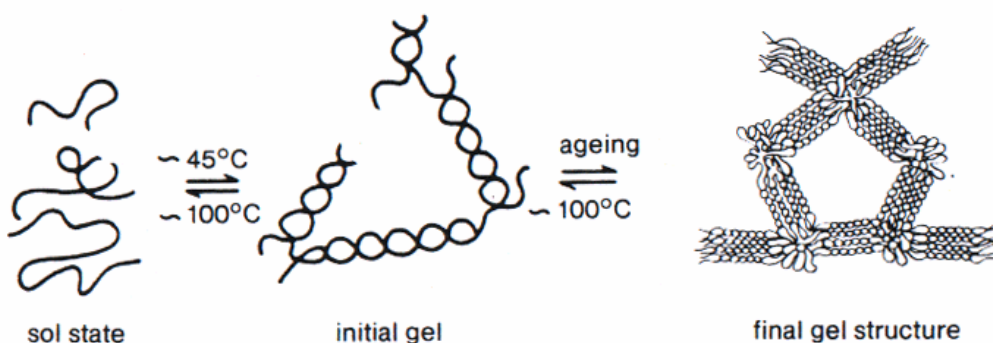
A. Pozorování tuhnutí gelu pomocí rozptylu světla (Tyndallův jev)

Pomocí laserového ukazovátka i pouhým okem sledujeme intenzitu rozptylu světla během tuhnutí gelu.

- gel je po vytažení z mikrovlnky téměř čirý, rozptyluje světlo jen minimálně = malé částice
- při 60°C je 1% agalosa ještě tekutá (sol), ale již zřetelně rozptyluje světlo = větší ale stále ještě izolované částice

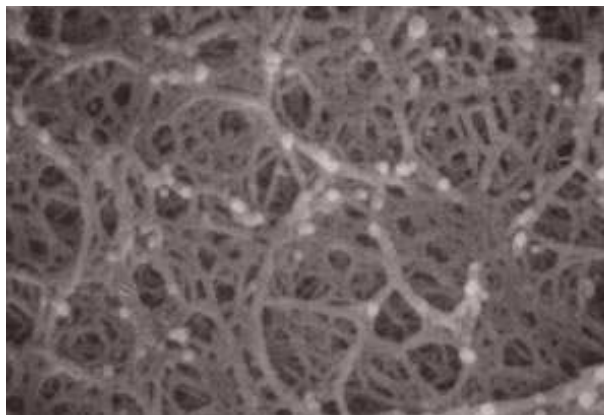


D-galaktosa 3,6-anhydro L-galaktosa



- ztuhlý gel zřetelně opalizuje a silně rozptyluje světlo laseru = částice se pomocí H-vazeb navzájem propojili do 3D sítě - stav gel

SEM photo of a 1% LE Agarose gel at 22kX magnification.



B. Sledování změn pH během elektroforesy

Pomocí pH papírku změřte pH v katodovém a anodovém prostoru hned na začátku elektroforesy a pak vždy po 10 minutách. Jak se mění pH a proč?

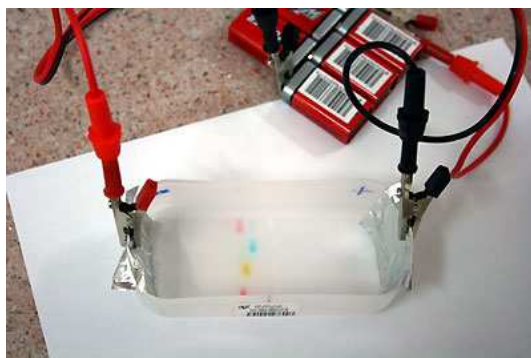
Mořská řasa z níž je agar a také agarosa získávána:



Gracilaria



Elektroforéza: příprava gelu, nanášení vzorku a zapojení



Elektroforéza: rozdělení barviv

BÍLKOVINY - vlastnosti a důkazy peptidu a proteinů

Chemikálie a pomůcky: 10% roztok NaOH, 10% $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, popř. 10% AgNO_3 , konc. HNO_3 , 5% roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pevný $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, močovina, 10x zředěný vaječný bílek (v 0,5% NaCl), libovolný suchý (či lépe lyofilisovaný) protein, potravinářská želatina, sušené mléko, světlý nízkotučný sýr (Eidam 30%), bílé peří, světlé (nejlépe šedivé) vlasy, světlá surová kůže, suspenze droždí, ethanolový extrakt z pšeničné mouky, suspenze vařených fazolí, laserové ukazovátko.

Roztoky proteinů: Ověření koloidní povahy roztoku proteinu.

Asi 10 ml dostatečně koncentrovaného roztoku proteinu (např. 10x zředěný vaječný bílek v 0,5% NaCl) nalijeme do malé kádinky (50 ml) a stejný objem vody či 0,5% NaCl do další kádinky. Kádinky postavte na bílý podklad (list papíru). Oběma roztoky pak nechte vodorovně procházet laserový paprsek a pozorujte roztok shora. !!! **POZOR NA OČI !!!** Koloidní roztok rozptyluje světlo takže lze zřetelně pozorovat celou dráhu paprsku v roztoku.

Denaturace proteinů:

a) reverzibilní: *Přítomnost některých iontů narušuje solvatační obal proteinu a ten pak začíná agregovat (srážet se bez porušení vnitřního prostorového uspořádání polypeptidového řetězce).*

Do roztoku bílkoviny ve zkumavce přidejte pevný $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (až 40% objemu), vznik zákalu signalizuje denaturaci (vysolení) proteinu. Polovinu tohoto roztoku odlijte a zřeďte ho vodou 1:1, protein se rozpustí a roztok se opět vyjasní.



Sraženina bílkoviny v přítomnosti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, rozpuštění po zředění vodou

b) irreverzibilní Dochází ke změně vnitřního prostorového uspořádání polypeptidového řetězce bílkoviny spojeného s nevratnou agregací bílkoviny:

- *Varem:* Zkumavku s roztokem bílkoviny povařte a pozorujte vznikající zákal.
- *Solemi těžkých kovů:* k roztoku proteinu předejte vždy několik kapek 10% $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ nebo AgNO_3 a promíchejte.
- *Organickými rozpouštědly:* k roztoku proteinu předejte stejný objem acetonu.

Úkol: Tepelným rozkladem močoviny připravte biuret.

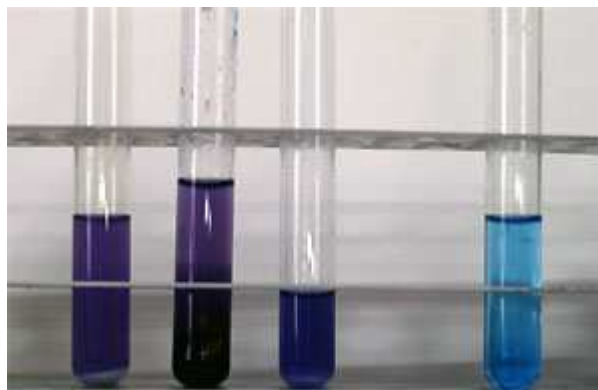
Příprava biuretu: Ve suchá zkumavce roztavíme cca 1 g močoviny a zahříváme při cca 300 – 350 °C. Ukončení vývoje plynu následované ztuhnutím taveniny signalizuje ukončení reakce, v ústí zkumavky se usazuje přesublimovaný biuret. Narozdíl od močoviny obsahuje biuret amidovou vazbu a tvoří červenofialový komplex s Cu^{2+} v alkalickém prostředí.



Biuretový test: - nejobecnější kvalitativní i kvantitativní test na bílkoviny. Připravte si 3 zkumavky, do jedné zkumavky nakapejte 10 kapek roztoku bílkoviny, do druhé roztok biuretu z předchozí úlohy a do třetí 10 kapek vody. Do všech pak ještě přidejte 10 kapek vody, 10 kapek 10% NaOH a 1 kapku 5% roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Porovnejte zbarvení!

Jiné provedení: K 1 ml roztoku bílku, želatiny či roztoku jiné bílkoviny přidáme 4 kapky 10% NaOH a potom kapku Fehlingova roztoku A nebo 5% roztoku CuSO_4 . Objeví se charakteristické červenofialové zbarvení. V nepřítomnosti peptidu, bílkoviny získáme zelenavý až modrý roztok či sraženinu.

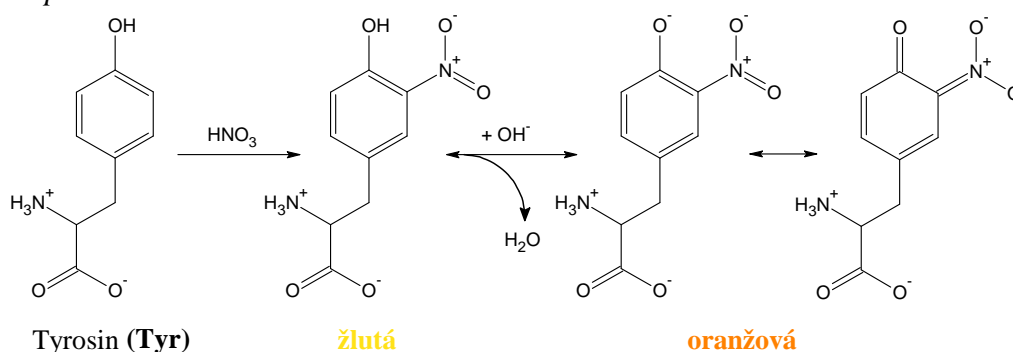
Pozn: Při reakci vzniká měďnatý komplex zahrnující NH a CO skupiny v amidických vazbách peptidu nebo proteinu, takže je vlastně důkazem přítomnosti peptidové vazby.



Bílkoviny – biuretová reakce (droždí, fazole, mouka, kontrolní vzorek)

Xanthoproteinový test: testuje se přítomnost specifických aminokyselin tyrosinu a tryptofanu (popř. fenylalaninu) a to buď volných či vázaných v proteinu. Do zkumavek přidáme po 10-i kapkách roztoku bílkovin (vaječného bílku, mléka ...) a nakapeme k nim 5 kapek konc. HNO_3 , necháme ohřát v mikrovlnce na cca 90°C a porovnáme změnu barvy oproti kontrole bez HNO_3 . Poté ještě přidáme 20 kapek 10% NaOH , aby byla veškerá kyselina zneutralizována a roztok zalkalizován. Barevná změna je nejlépe patrná u bílkovin s vysokým obsahem tyrosinu.

Modifikace pro nerozpustné bílkoviny: na plátek vařeného bílku, vlasy, kousek bílého peří, plátek sýra, masa či jiný světlý materiál, který chcete otestovat na bílkovinu nakapejte několik kapek konc. kyseliny dusičné, nechte chvíli stát, pak kyselinu odsajte a na skvrnu nakapejte 10% roztok NaOH . Obsahuje-li vzorek bílkovinu, měli by se v místě kam jste nakapali konc. HNO_3 vytvořit žluté skvrny, které v alkalickém prostředí zoranžoví. *!!!Pozor může dávat také pozitivní reakci, která přetrvává dosti dlouho!!!*



Popis: Působením kyseliny dusičné dojde k nitraci benzenových kruhů aromatických aminokyselin, především tyrosinu. Vzniklé nitrofenoly jsou žlutě zbarveny, v alkalickém prostředí je zbarvení výraznější. Slabou reakci dávají některé bílkoviny s nízkým obsahem tyrosinu (např. kolagen).



Xanthoproteinová reakce: vařený bílek, peří, šunkový salám

Doprovodné experimenty:**Izolace kaseinu z mléka**

Kasein, hlavní bílkovinná složka mléka, je v mléce obsažen ve formě vápenato-draselné soli. Okyselením minerální kyselinou se převede na volnou kyselinu, jejíž izoelektrický bod je při pH 4,7. Kasein se sráží nejlépe při pH o trochu nižším. Při dalším poklesu pH se začnou projevovat bazické vlastnosti aminoskupin a kasein znovu přechází do roztoku jako bazická složka soli silné kyseliny.

Chemikálie: ethanol, 10% HCl, jemný písek nebo křemenný prach, molybdenová soluce (7,5 g molybdenanu amonného rozpustíme za tepla v 50 ml destilované vody a přidáme 50 ml HNO₃ zředěné 1:1).

Pomůcky: odsávací baňka, filtrační kruh, nálevka, filtrační papír (vata), Büchnerova nálevka, vodní vývěva, nůžky, zkumavky, pinzeta.

Vzorek: nízkotučné mléko (max. 0,5% tuku).

Postup izolace: 250 ml nízkotučného mléka (max. 0,5% tuku) zfiltrujeme přes vatu (ve stopce nálevky) pro odstranění větších kousků tuku. Pomalu přikapáváme 10% roztok HCl, dokud se nepřestane vylučovat vločkovitá sraženina a pH neklesne po 5 (pokles pH kontrolujeme pomocí kousků univerzálních indikátorových papírků). Vyvarujte se nadbytku kyseliny (viz princip úlohy). Sražený kasein zfiltrujeme pomocí Büchnerovy nálevky. Neředitelný čirý filtrát odlijte pro další analýzu. Vyšší čistoty preparátu dosáhnete rozmícháním sraženého kaseinu s destilovanou vodou a opětovným zfiltrováním. Nakonec kasein propláchněte ethanolom a usušte jej třeba na hodinovém sklíčku či Petriho misce.

Analýza složek mléka**1. Ve filtrátu po vysrážení kaseinu dokažte přítomnost laktózy.**

Hlavním zásobním sacharidem mléka je laktóza, ta při izolaci kaseinu zůstane rozpuštěná ve filtrátu. A jelikož laktóza je redukujícím disacharidem lze ji dokázat pomocí Benediktova (nebo Fehlingova) činidla.

2. Ve filtrátu po vysrážení kaseinu dokažte přítomnost fosforečnanů.

Fosfor je v mléce obsažen ve značném množství. Jednak vázaný na proteiny (kasein je fosfoprotein) dále pak jako fosforečnanové aniony (H₂PO₄⁻ a HPO₄²⁻). Volné fosforečnanové aniony lze prokázat reakcí s molybdenovou solucí, která poskytuje těžkou žlutou sraženinu.

3. Sraženinu tvoří především kasein a lze ji přímo použít na xanthoproteinový test pro nerozpustné bílkoviny. Nebo jej lze znovu rozpustit v bazickém prostředí a vzniklý roztok použít pro důkazy proteinů v roztocích.

ŠKODLIVÉ LÁTKY V CIGARETOVÉM DÝMU

Cílem pokusu je dokázat přítomnost některých z řady škodlivých látek v cigaretovém dýmu.

Pomůcky a chemikálie:

Schiffovo činidlo, NaCl, vata, 5% roztok KMnO₄

Zkumavka s bočním vývodem, stojan, svorky, držáky, kádinka, gumové hadice, skleněná trubička zahnutá + vrtaná zátka, rovná skleněná trubička, vata, balónek či injekční stříkačka, cigareta.

Postup:

Tři zkumavky s bočním vývodem připevníme ke stojanu pomocí svorky. Do 1. nalijeme do třetiny výšky Schiffovo činidlo a do 2. roztok KMnO₄. Zahnutou skleněnou trubičku se zátkou nasadíme na zkumavku tak, aby trubička zasahovala co nejhluběji do reagenčního roztoku. Druhý konec trubičky připojíme krátkou hadičkou k rovné skleněné trubičce, která je naplněná malým množstvím chloridu sodného (nebo jiného absorbentu např. cigaretového filtru) a z obou stran uzavřená malým kouskem vaty. Na volný konec skleněné trubičky pomocí krátké hadičky připojíme cigaretu. Na boční vývod zkumavky připojíme balónek nebo větší injekční stříkačku. Cigaretu zapálíme a pomocí balónku (stříkačky) probubláváme jednotlivými činidly cigaretový dým.

Pozorování:

Pozorujeme žloutnutí až hnědnutí použitého absorbentu - chloridu sodného. Po jeho rozpuštění v minimálním množství vody můžeme spatřit na dně kádinky kapičky kondenzátu - dehtu.

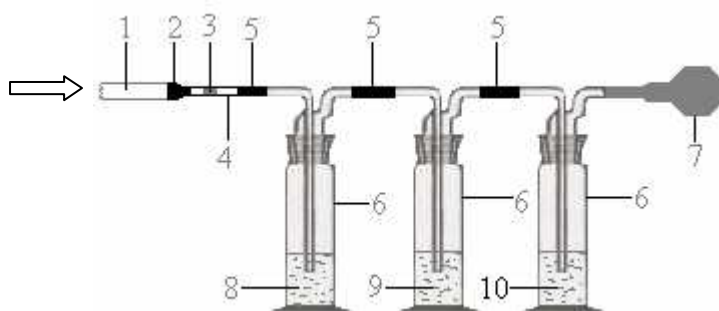
Variace:

Jestliže použijeme nasycený roztok síranu železnatého, hnědé až černé zbarvení roztoku ukazuje přítomnost oxidů dusíku.

Výsledky:

Reakce použitých činidel prokazují přítomnost dehtu (aromatické polykondenzované uhlovodíky), aldehydů a dalších redukujících látek v cigaretovém dýmu. Většina těchto látek vzniká až při spalování tabáku a není zachycena filtrem.

!!! Cigaretový kouř obsahuje řadu pro člověka toxických látek, proto experiment provádíme v digestoři !!!

Nákres:

1. cigareta bez filtru
2. náustek
3. vata
4. skleněná trubička
5. spojovací hadička
6. promývačka
7. balónek
8. Schiffovo činidlo
9. trinitrofenol : roztok $\text{Na}_2\text{CO}_3 = 1:1$
10. roztok KMnO_4

Látky přítomné v cigaretovém dýmu dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC)

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol38/volume38.pdf>

Acetaldehyde Acetone Acrolein Acrylonitrile and methyl acrylate Ammonia Benzene Benzo[a]pyrene Bicyclohexyl Crotonaldehyde Cyclopentane Cyclohexane Ethylamine	Dimethylamine Formaldehyde Furfural Hydrazine Hydrogen cyanide Methylamine Methyl chloride Methylpyrazines and 2,5-dimethylpyrazine 2-, 3- and 4-Methylpyridines 1-Methylpyrrolidine Nicotine	Nitric oxide Nitrogen dioxide 2-Nitropropane N-Nitrosamines PAH Propionaldehyde Pyridine Pyrrolidine Tar (=dehet) Trimethylamine Urethane Vinyl chloride
--	--	---



Důkaz karbonylových sloučenin (v první zkumavce oranžový dinitrofenylhydrazin či fialové Schiffovo činidlo) a redukujících látek (v druhé zkumavce hnědý oxid manganický) v cigaretovém dýmu