

ĆWICZENIE NR 2

BIAŁKA I PEPTYDY W KOSMETOLOGII

I Analiza TLC aminokwasów

Chromatografię cienkowarstwową należy wykonać na gotowych płytkach aluminiowych pokrytych warstwą żelu krzemionkowego (Silicagel 60 F254) o grubości 0,2 mm firmy Merck. Droga migracji ok 8 cm.

Należy zastosować następujący układ rozwijający : nbutanol: kwas octowy: woda (4:1:1)

1. Do trzech probówek typu eppendorf wsyp kilka ziarenek aminokwasów wzorcowych A, B oraz C następnie rozpuść w 200 μ l metanolu (w każdej probówce inny aminokwas). Próbką A-glicyna; próbką B-tryptofan; próbką C-histydyna
2. Za pomocą kapilary/tipsa nanieś aminokwasy wzorcowe na zaznaczoną wcześniej linię startu płytki (ok. 5 μ l próbki).
3. Obok aminokwasów wzorcowych nanieś próbkę X, którą otrzymałeś od asystenta.
4. Rozwiń przygotowaną płytkę w kolumnie chromatograficznej. Pamiętaj aby brzeg płytki był delikatnie zanurzony w układzie rozwijającym. Zastosuj układ nbutanol: kwas octowy: woda (4:1:1).
5. Po zakończonym rozdziale wywołaj płytkę 0,3% roztworem ninhydryny i odpowiedz na pytanie : jaki aminokwas/y był/y w próbce X?

II. Wyznaczanie stężenia białka metodą Bradforda.

1. Przygotuj 5 probówek (P1, P2, P3, P4, P5).
2. Do każdej probówki dodaj 2 ml odczynnika Bradforda oraz odpowiednio :

P1- próba ślepa (bez białka)

P2 - 3 μ l BSA (2mg/ml)

P3 - 6 μ l BSA (2mg/ml)

P4 – 9 μ l BSA (2mg/ml)

P5 - 12 μ l BSA (2mg/ml)

Zmierz OD₅₉₅ badanych próbek oraz w programie Excel wykreśl krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenia białka.

3. Zmierz absorbancję próbki X, którą otrzymasz od asystenta oraz odczytaj jej stężenie z krzywej kalibracyjnej