

Ćwiczenie nr 2 - Aminokwasy, peptydy, białka

- I. **Chromatografia cienkowarstwowa aminokwasów**
- II. **Oznaczanie stężenia białka metodą Bradforda**

Celem ćwiczenia jest:

- Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) wybranych aminokwasów
- Zapoznanie się z metodą pozwalającą na ilościowe oznaczenie zawartości białka w roztworze (metoda Bradforda)

Wprowadzenie

Wykrywanie aminokwasów metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Chromatografia jest metodą rozdzielania, w której składniki mieszaniny ulegają rozdzielaniu pomiędzy dwie fazy: fazę nieruchomą (stacjonarną) oraz fazę ruchomą. Fazą stacjonarną w przypadku chromatografii cienkowarstwowej jest **żel**, zaś fazą ruchomą ciecz, zwana **solwentem**. Przy stosowaniu chromatografii cienkowarstwowej rozdzielanie mieszanin zachodzi na cienkich warstwach żelu pokrywającego płytkę. Przeważnie wykorzystuje się żele dekstranowe i poliakrylamidowe. Można też stosować pochodne dekstranowe, agarozowe dekstranowo-poliakrylamidowe, jak również poliakrylamidowo-agarozowe. Żele są substancjami stałymi, nierozpuszczalnymi w wodzie, stąd przed użyciem do chromatografii muszą być odpowiednio przygotowane. Są one zawieszane w buforze o określonej wartości pH i pozostawiane do spęcznienia.

Część doświadczalna

- I. **Chromatografia cienkowarstwowa wybranych aminokwasów**

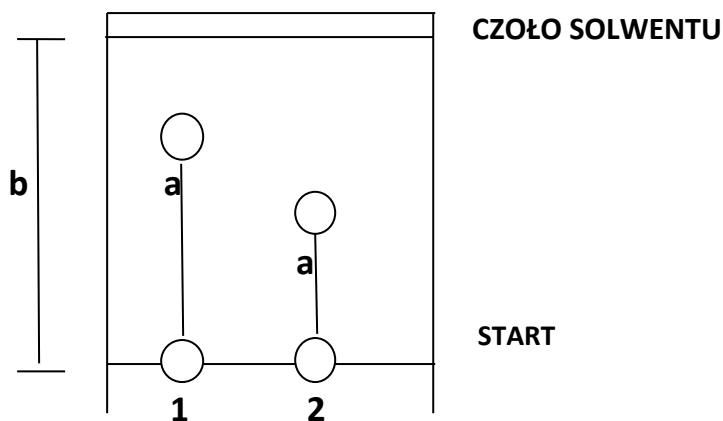
Zasada metody:

Rozdzielane aminokwasy identyfikuje się na podstawie **współczynnika podziału (R_f)**. Jest on wielkością stałą charakterystyczną dla określonego aminokwasu w danych warunkach rozdzielania, czyli może służyć do jego identyfikacji.

Wartość współczynnika R_f dla danego aminokwasu oblicza się, dzieląc odległość, którą przebył ten związek, przez długość drogi samego rozpuszczalnika (solwentu) zgodnie ze wzorem:

$$R_f = a/b$$

R_f = odległość od środka plamy aminokwasu od miejsca startu (a) / odległość czoła solwenta od miejsca startu (b)



Procedura:

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

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 200µl metanolu (w każdej probówce inny aminokwas).

Próbka A-glicyna

Próbka B-tryptofan

Próbka C-histydyna

2. Za pomocą kapilary/tipsa nanieś aminokwasy wzorcowe na zaznaczoną wcześniej linie startu płytki (ok. 5µl 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?

Wyniki zanotuj w sprawozdaniu

II. Oznaczenie białka metodą Bradforda

Zasada metody

W metodzie tej wykorzystuje się zdolność wiązania barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250 z białkiem za pomocą wiązań jonowych i hydrofobowych. Z barwnikiem głównie reagują reszty Arg, w minimalnym stopniu reszty His, Lys, Tyr, Trp, Phe. Błękit brylantowy Coomassie G-250 w środowisku kwasowym ma brunatne zabarwienie, które po reakcji z białkiem zmienia się na błękitne. Wiąże się z tym zmiana maksimum pochłaniania z 465 nm na 595 nm. Natężenie barwy jest proporcjonalne do zawartości białka w roztworze.

Procedura:

A. Sporządzenie krzywej kalibracyjnej dla białka albuminy:

1. Przygotować wodny roztwór albuminy o stężeniu 2 mg/mL.
2. Przygotować 5 próbek, opisać je kolejno 1-5.
3. Do każdej próbki dodać po 1 ml odczynnika Bradforda.
4. Przygotować roztwory, które posłużą do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej, w tym celu do opisanych próbek z odczynnikiem Bradforda dodać, odpowiednio:

1- próba ślepa (bez albuminy)

2 – 3 μ l r-r albuminy

3 - 6 μ l r-r albuminy

4 - 9 μ l r-r albuminy

5 - 12 μ l r-r albuminy

Sporządź krzywą wzorcową z wykorzystaniem arkusza kalkulacyjnego programu Excel.

5. Próbkę z odczynnikiem Bradforda należy inkubować przez 10 min w temperaturze pokojowej, następnie dokonać pomiaru absorbancji z wykorzystaniem spektrofotometru przy długości fali 595 nm.
6. Oznaczyć zawartość białka w lizacie komórkowym (nadsącz). W tym celu przygotuj próbkę nr 6, dodaj do niej 1 ml odczynnika Bradforda oraz 1 μ l lizatu białkowego. *Obliczenia zanotuj w sprawozdaniu.*
7. Przygotuj próbkę do rozdzielania elektroforetycznego w tym celu, na podstawie wyznaczonej krzywej kalibracyjnej oblicz ile μ l lizatu komórkowego należy nanieść na studzienkę w żelu poliakrylamidowym, żeby uzyskać ilość białka równą 40 μ g. *Obliczenia zanotuj w sprawozdaniu.*
8. Przygotuj próbkę do nałożenia na studzienkę, w tym celu dodaj do próbki bufor obciążający (Sample buffer) w stosunku 1:1.