

Základní reakce funkčních skupin v organické chemii. Vlastnosti bílkovin. Elektroforéza.

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Jan Pláteník, Martin Leníček, Lucie Muchová










2024/2025

OBSAH

Úloha 1 – Elektroforesa proteinů séra v 0,5% agarose	3
Úloha 2 – Základní organické reakce.....	4
2.1 Oxidace alkoholů.....	4
2.2 Azokopulační reakce fenolů.....	4
2.3 Reakce karbonylové skupiny	5
2.4 Esterifikace.....	6
Úloha 3 – Reverzibilní srážení proteinů.....	6
3.1 Srážení vaječného proteinu chloridem sodným a jeho opětné rozpuštění	7
Úloha 4 – Srážení proteinů spojené s denaturací.....	7
4.1 Srážení solemi těžkých kovů.....	7
4.2 Srážení minerálními kyselinami.....	7
4.3 Srážení organickými kyselinami	7
4.4 Srážení bílkovin vysokou teplotou (varem)	8

Úloha 1 – Elektroforeza proteinů séra v 0,5% agarose

Reagencie:

1. Agarosa pro elektroforezu
2. Elektroforetický pufr: barbital sodný 5,5 g/l a kyselina citrónová 0,25 g/l, pH 8,7-9,0

3. Vzorky sérových bílkovin vhodně naředěné a obsahující bromfenolovou modř a 25 % glycerolu
4. Fixační/odbarvovací roztok: kyselina octová-metanol 1:9

5. Barvicí roztok: 0,5 % amidočern 10B v kyselině octové-metanolu 1:9


6. Elektroforetický zdroj
7. Horizontální elektroforetická vana
8. Misky na fixaci, barvení a odbarvování

UPOZORNĚNÍ: Elektrické napětí a proud, jaké se používají při elektroforese, jsou pro způsobení závažného úrazu elektrickým proudem více než dostatečné !!!

Dbejte nezbytné opatrnosti, především zabraňte rozlití kapalin v okolí elektroforetické vany pod proudem. Před jakoukoliv manipulací s vanou je vždy nezbytné nejdříve vypnout elektroforetický zdroj!

Postup (demonstrace):

1. Do Erlenmeyerovy baňky s 0,25 g agarosy přidáme 50 ml elektroforetického pufru. Toto množství agarosy je na dva gely.
2. V mikrovlnné troubě směs zahřejeme až k varu a do úplného rozpuštění (Pozor aby vařící směs nepřetekla). Počkáme až zchladne asi na 60 °C (dá se udržet v ruce).
3. Sestavíme elektroforetickou vanu na odlévání: vnitřní plastová část napříč, s gumovým těsněním. Do vnitřní části nalijeme přibližně 25 ml rozpuštěné agarosy a do krajních drážek usadíme jeden hřeben.
4. Necháme tuhnout nejméně hodinu. Během této doby s vanou nehýbat.
5. Elektroforetický pufr a vany s odlitými agarosovými gely necháme před vlastní elektroforézou vychladit v lednici.
6. Přestavíme vanu na elektroforézu: vyjmeme vnitřní plastovou část se ztuhlou agarosou, odstraníme gumová těsnění a vrátíme do vany otočené o 90 ° tak, aby jamky byly nad barevným pruhem na dně vany.
7. Přelijeme gel 250 ml vychlazeného pufru, necháme gel ekvilibrovat asi 5 minut a velmi opatrně odstraníme hřeben (jamky se nesmí poškodit).
8. Aplikace vzorků do jamek: pod hladinu pufru, pipetou se žlutou špičkou, 10 µl na jamku.

9. Zavřeme vanu a připojíme ke zdroji. Nastavíme 100 V a necháme elektroforézu běžet dokud bromfenolová modř nedosáhne asi 0,5 cm od okraje gelu (trvá asi 30 minut).

10. Vypneme zdroj, odpojíme vanu od zdroje a vyjmeme plastovou část s gelem.

Kroky 11. až 13. provádět nebudete. Pokračujte krokem 14., kde obdržíte gel k vyhodnocení.

11. Gel sesuneme z plastové podložky do fixačního roztoku. Fixace 3 x 5 minut, pokaždé v čerstvé porci fixačního roztoku. Použitý fixační roztok je lépe opatrně odsát než slít (gel se snadno mechanicky poškodí).

12. Barvení v roztoku amidočerni asi 30 minut.

13. Odbarvování v odbarvovacím roztoku asi 1-2 hodiny (sledovat postup odbarvení). Po odbarvení uchováváme v destilované vodě při 4 °C.

14. Vizuální vyhodnocení výsledného elektroforeogramu.

Úloha 2 – Základní organické reakce




2.1 Oxidace alkoholů

Reagencie:

1. Manganistan draselný (nasycený roztok)



2. Vzorky (pod označením A, B, C) jsou v pořadí:

metanol , 2-propanol , tert-butanol 

Postup:

Do 4 označených zkumavek nalijte asi 1 ml vody, vzorku A, B či C. Do každé zkumavky přidejte asi 4 kapky nasyceného roztoku manganistanu draselného a jemně promíchejte. Pozorujte zbarvení roztoků.

2.2 Azokopulační reakce fenolů

Reagencie:

1. Kyselina sulfanilová (čínidlo diazo I) 5 g ve 100 ml 0,6 mol/l HCl



2. Dusitan sodný (čínidlo diazo II) 5 g ve 100 ml dest. Vody



3. β -naftol 2 g ve 100 ml etanolu






















Postup:

K 1 ml kys. sulfanilové (diazo I.) přidejte asi 5 kapek dusitanu sodného (diazo II). Opatrně přikapávejte roztok β -naftolu a pozorujte vznikající zbarvení.

2.3 Reakce karbonylové skupiny

Reagencie:

1. Hydroxid sodný (2 mol/l) 
2. Nitroprusid sodný 
3. Fehling I (síran měďnatý 70 g/l)  
4. Fehling II (hydroxid sodný 250 g/l, vinan draselnosodný 350 g/l) 
5. Dusičnan stříbrný (20 g/l)  
6. Vodný roztok amoniaku (200 g/l)   
7. Aceton  
8. Formaldehyd    
9. Kyselina octová (0,2 mol/l) 
10. Kyselina mravenčí 
11. Schiffovo činidlo (fuchsin odbarvený oxidem siřičitým) 

Postup:

- **Legalova zkouška**

Rozpusťte několik krystalů nitroprusidu sodného ve vodě. Připravte si dvě zkumavky, jednu s 0,5 ml acetonu a druhou s 0,5 ml kyseliny octové. Do každé přidejte několik (2–3) kapek připraveného nitroprusidového činidla a zalkalizujte postupným přikapáváním roztoku NaOH. Pozorujte vzniklé zbarvení.

- **Fehlingova zkouška**

Ve zkumavce smíchejte Fehlingův roztok I a II v poměru asi 1:1 (dohromady 4 ml). Rozdělte do dvou zkumavek, přičemž do první přidejte několik kapek formaldehydu a do druhé několik kapek kyseliny octové. Zahřejte ve vodní lázni a pozorujte zbarvení.

- **Tollensova zkouška**

Připravte Tollensovo činidlo:

Ve zkumavce smíchejte přibližně 3 ml dusičnanu stříbrného a 3 ml hydroxidu sodného. Vyloučí se oxid stříbrný. Poté přikapávejte roztok amoniaku, dokud se oxid stříbrný téměř úplně nerozpustí (malý zbytek není na závadu).


Do 3 zkumavek odlijte po cca 2 ml Tollensova činidla. Do první přidejte pár kapek formaldehydu, do druhé pár kapek kyseliny mravenčí a do třetí pár kapek vody. Opatrne zahřejte ve vodní lázni. Pozorujte zbarvení.

- **Schiffova zkouška**

K 1 ml Schiffova činidla přidejte kapku formaldehydu nebo kyseliny octové a pozorujte zbarvení.

2.4 Esterifikace

Reagencie:

1. Kyselina benzoová 
2. Kyselina salicylová  
3. Kyselina sírová 
4. Metanol  
5. Etanol 




Postup:

V této úloze připravíte buď etylester kyseliny benzoové nebo metylester kyseliny salicylové. Podle toho si vyberte příslušné reagencie.

Do zkumavky nasypejte cca 0,5 g kyseliny benzoové (salicylové), přidejte asi 1,5 ml etanolu (metanolu) a promíchejte. Opatrně (!) přidejte asi 10 kapek koncentrované kyseliny sírové a zkumavku dejte na 10 minut do horké lázně. Úspěšný průběh reakce poznáte snadno čichem – oba estery mají velmi výraznou vůni, vzdáleně připomínající mátu (zejména metylester kyseliny salicylové, dominantní složku ústních vod, si nespletete). Celou reakční směs nalijte do kádinky s malým množstvím studené vody z kohoutku, ve které se vysrážejí bílé krystaly esteru.

Úloha 3 – Reverzibilní srážení proteinů

Reagencie:

1. Roztok vaječné bílkoviny
2. Krystalický chlorid sodný, s odměrkou
3. Kyselina octová 12 g·l⁻¹ (ze základní sady)  
4. Hydroxid sodný 2 mol·l⁻¹ (ze základní sady) 

Postup:



3.1 Srážení vaječného proteinu chloridem sodným a jeho opětné rozpuštění

K asi 2 ml vaječné bílkoviny ve zkumavce přidejte tři odměrky chloridu sodného a 5 kapek zředěné kyseliny octové a protřepejte. Objeví se bílá sraženina proteinu.

V dalším kroku se pokuste dokázat, že precipitace proteinu je reversibilní: přidejte asi 2 ml deionizované vody ze stříčky a několik kapek hydroxidu sodného. Uzavřete parafilmem, důkladně protřepejte a počkejte, až vyprchají bubliny a opadne pěna. Je nyní roztok vaječné bílkoviny opět čirý?

Úloha 4 – Srážení proteinů spojené s denaturací

Reagencie:

1. Roztok vaječné bílkoviny
2. octan olovnatý $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 
3. Koncentrovaná kyselina dusičná 
4. Kyselina sulfosalicylová (2-hydroxy-5-sulfobenzoová) $200 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 
5. Kyselina octová $12 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (ze základní sady) 
6. Kyselina octová $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 

Postup:

4.1 Srážení solemi těžkých kovů

Do zkumavky odlijte asi 1 ml roztoku vaječné bílkoviny. Přidejte 1 kapku octanu olovnatého a pozorujte, zdali se proteiny srážejí.

Přidáním nadbytku octanu olovnatého zkuste precipitované bílkoviny zase rozpustit.

4.2 Srážení minerálními kyselinami

1 ml koncentrované kyseliny dusičné ve zkumavce se opatrně (kapátkem, po stěně zkumavky) převrství roztokem vaječné bílkoviny tak, aby se oba roztoky nesměšly. Srážení proteinů se projeví jako bílý prsteneček na rozhraní obou roztoků.

4.3 Srážení organickými kyselinami

Do zkumavky dejte 1–2 ml vaječné bílkoviny. Přidejte několik kapek kyseliny sulfosalicylové a pozorujte, zdali se proteiny srážejí.

4.4 Srážení bílkovin vysokou teplotou (varem)

1. Do tří dlouhých zkumavek odlijte asi po 2 ml vaječné bílkoviny. První zkumavka bude sloužit jako kontrola. Do druhé zkumavky přidejte jednu kapku kyseliny octové (12 g/l) (ze základní sady) a do třetí zkumavky přidejte přibližně 0,5 ml octové kyseliny (100 g/l).
2. Všechny tři zkumavky zahřejte ve vodní lázni k varu.
3. Sledujte srážení proteinů. Očekává se, že ve druhé zkumavce je mírně kyselé pH blíže isoelektrickému bodu vaječné bílkoviny a protein by se měl srážet rychleji než v kontrolní zkumavce. Naopak ve třetí zkumavce, kde je pH výrazně kyselé, se dá očekávat, že protein i po denaturaci zůstane ionizovaný a nebude se srážet.
4. Srovnajte průběh srážení v jednotlivých zkumavkách.