

DENATURACE PROTEINŮ

praktické cvičení

Jméno, třída, datum:

Téma: Proteiny a enzymy

Úlohy:

1. Denaturace proteinů vaječného bílku acetonem.
2. Vysolování proteinů vaječného bílku síranem amonným.
3. Tepelná denaturace enzymu amylasy.

Pomůcky: kádinky, zkumavky, kapátka, skleněná tyčinka, navažovací lodička, nálevka, smotek vaty, odměrný válec, vejce, laboratorní lžička, mikrovlnná trouba (případně kahan), držák na zkumavky, kousek alobalu, destilovaná voda

Chemikálie: 1% roztok NaCl, aceton, nasycený roztok $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 % roztok škrobu, roztok jódu (I_2) v KI

Zadání 1. a 2. úlohy v případě, že by ji učitel chtěl formulovat jako problémovou úlohu: Pokuste se navrhnout takový experiment, v němž prokážete rozdíl mezi denaturací a vysolováním. Vaším úkolem je ukázat, že vysolování je proces vratný na rozdíl od denaturace, která je nevratná. K dispozici máte vaječný bílek, 1% roztok NaCl, aceton a nasycený roztok $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nezapomeňte, že proteiny jsou citlivé na změny prostředí, proto se v laboratoři snažíme nahradit jejich přirozené prostředí např. slabým roztokem NaCl.

1. Denaturace proteinů vaječného bílku acetonem.

Teoretický úvod (doplňte chybějící výrazy): Denaturace je proces, při kterém proteiny (ale i např. nukleové kyseliny) ztrácejí své prostorové uspořádání, ztrácejí svoji konformaci. Při denaturaci se narušují prvky, i kvartérní struktury proteinu. Důležité je, že vazba se neštěpí, takže základní polypeptidový řetězec zůstává zachován. V důsledku rozpadu prostorového uspořádání přestává protein plnit svoji funkci v organismu. Denaturační činidla jsou látky nebo podmínky, které denaturaci způsobují. Patří mezi ně např.: teplota, vysoké nebo naopak příliš nízké, přítomnost solí těžkých, močovina a další látky. My budeme denaturovat proteiny vaječného bílku, mezi nimiž převládá ovalbumin.

Postup:

- a) Připravte si roztok vaječného bílku v 1% roztoku NaCl. Vajíčko rozklepněte a žloutek vylijte do výlevky. Bílek smíchejte v kádince s 1% roztokem NaCl v poměru 1:2 (bílek : roztok NaCl). Vzniklý roztok přefiltrujte přes smotek vaty do čisté kádinky. Slabý roztok NaCl používáme proto, abychom navodili fyziologické podmínky. S tímto roztokem budete pracovat v této a v následující úloze.
- b) Připravte si dvě zkumavky. Jedna bude sloužit jako kontrola (označte si ji např. písmenem *k*), ve druhé provedete samotný pokus. Do obou zkumavek kápněte kapátkem 1 ml roztoku vaječného bílku.
- c) Do malé kádinky si odlijte cca 5 ml acetonu. S acetonem pracujte opatrně, nejlépe v digestoři. Je to hořlavina, jeho výpary dráždí sliznici a se vzduchem tvoří výbušnou směs.
- d) Do kontrolní zkumavky s roztokem vaječného bílku přikápněte 1 ml destilované vody. Do druhé kápněte 1 ml acetonu a zamíchejte. Pozorujte změny.
- e) Na závěr přidávejte postupně do obou zkumavek destilovanou vodu (vždy po 1 ml). Pozorujte změny.

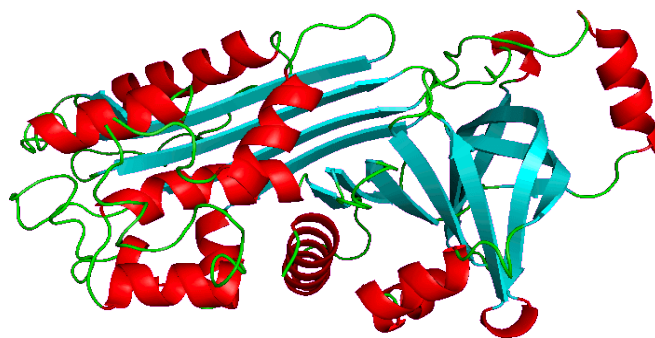
Pozorování:

1. roztoky po přidání acetonu / destilované vody:

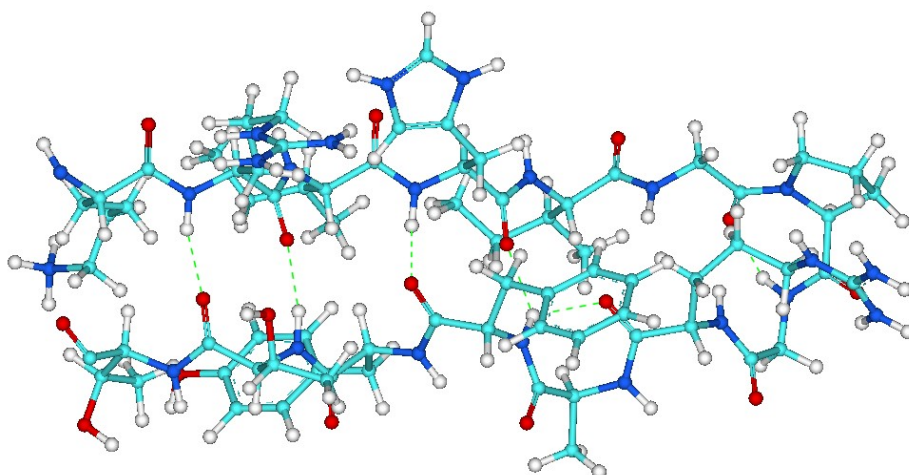
2. roztoky po dalším přidávání destilované vody:

Kontrolní otázky:

1. Vyberte správné tvrzení. Denaturace proteinů acetonem je vratný / nevratný proces. Důkazem je fakt, že v nadbytku vody se sraženina ve zkumavce nerozpustila / rozpustila.
2. Na obrázku ovalbuminu (hlavního proteinu vaječného bílku) označte struktury, které se narušují při denaturaci.



3. Na obrázku části polypeptidu označte vazby, které se při denaturaci štěpí a které zůstávají zachovány (min 2 př.). Přerušované čáry znázorňují vodíkové můstky.



4. Vyberte správné tvrzení. Aceton ($\begin{matrix} \text{H}_3\text{C} \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{H}_3\text{C} \end{matrix}$) je hydrofilní / hydrofobní rozpouštědlo.

Závěr:

2. Vysolování proteinů vaječného bílku síranem amonným.

Teoretický úvod (doplňte chybějící výrazy): Vratná denaturace, neboli, vlastně není denaturací. Proteiny při ní neztrácejí své prostorové uspořádání, svoji nativní konformaci. Jsou pouze vysráženy z roztoku v důsledku přidání některých, např. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ty totiž v roztoku disociují na, které jsou solvatovány (obalovány) přítomnými molekulami vody. Nakonec nezbude žádná voda pro rozpouštění (solvatování) proteinu, jehož molekuly se proto shlukují k sobě a tvoří sraženinu. Po přidání vody se však sraženina Vysolování je tedy proces.

Postup:

- a) Stejně jako v předchozí úloze si připravte 2 zkumavky. Jedna bude sloužit jako kontrola (označte si ji

- např. písmenem *k*), ve druhé provedete samotný pokus. Do obou zkumavek kápněte kapátkem 1 ml roztoku vaječného bílku (smíchaného s 1% roztokem NaCl).
- Do malé kádinky nalijte nasycený roztok $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
 - Do jedné zkumavky s roztokem vaječného bílku přidejte 1 ml nasyceného roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a zamíchejte. Do druhé (té kontrolní) přidejte 1 ml destilované vody. Pozorujte změny.
 - Na závěr přidávejte postupně do obou zkumavek destilovanou vodu (vždy po 1 ml). Promíchejte a pozorujte změny.

Pozorování:

- roztoky po přidání $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / destilované vody:

- roztoky po dalším přidávání destilované vody:

Kontrolní otázky:

- Na jaké ionty disociuje v roztoku síran amonný?
- Vyberte správné tvrzení:
 - Sraženina se v nadbytku vody rozpustila, protože v roztoku bylo dostatek molekul vody jak pro síran, tak pro molekuly proteinu.
 - Sraženina se v nadbytku vody rozpustila, protože jsme ji rozředili vodou. Molekuly proteinu ale zůstaly denaturované a nefunkční.
 - Při vysolování vzniká sraženina molekul proteinu, které přitom ztrácejí svoje prostorové uspořádání a funkci.
 - Vysolování je nevratný proces, kterým izolujeme z roztoku molekuly proteinu přidáním anorganické soli.

Závěr:

Zadání 3. úlohy v případě, že by ji učitel chtěl formulovat jako problémovou úlohu: Navrhněte jednoduchý experiment, v němž ověříte, jaký účinek může mít na činnost proteinů zvýšená teplota. K dispozici máte destilovanou vodu, zdroj tepla (mikrovlnou troubu, kahan, ...), 0,2% roztok škrobu, roztok jódu (I_2 v KI, ten používáme k důkazu přítomnosti škrobu). Protein si musíte obstarat sami. Nezapomeňte, že v lidském těle je mnoho enzymů (proteinů), které štěpí sacharidy. Uvědomte si, kde štěpení sacharidů začíná. Pokus naplánujte tak, abyste mohli srovnat funkci proteinu ovlivněného zvýšenou teplotou a proteinu pracujícího za normální teploty.

3. Tepelná denaturace slinné amylasy.

Teoretický úvod (doplňte chybějící výrazy): Enzymy jsou biokatalyzátory, látky ovlivňující chemické děje v živých organismech. Amylasy jsou enzymy štěpící polysacharidy. V polysacharidech štěpí vazbu, vznikají přitom kratší oligosacharidy. V lidských slinách se nachází amylasa zvaná Zahajuje trávení a dalších polysacharidů, ve kterém pokračují další amylasy v Přítomnost škrobu dokazuje modré zbarvení po přidání roztoku jódu (I_2).

Postup:

- Připravte si roztok svých slin. Vypláchněte si ústa destilovanou vodou a směs vyplivněte do kádinky. Poté ji přefiltrujte přes smotek vaty.
- Polovinu roztoku slin nalijte do zkumavky, zakryjte kouskem alobalu a dejte na několik minut povařit do mikrovlnné trouby. Nemáte-li k dispozici mikrovlnnou troubu opatrně povařte směs nad kahanem. Zkumavku při tom uchyt'ete do držáku! Nezapomeňte si zkumavku s povařenými slinami označit (např. písmenem *d*).
- Připravte si 3 zkumavky, označte je čísly 1, 2, 3. Do všech tří kápněte po 2 ml 0,2 % roztoku škrobu.
- Do první zkumavky přidejte dvě kapky (300 μ l) roztoku slin, který jste nevařili. Do druhé zkumavky dejte stejné množství povařených slin. Do třetí zkumavky pak dvě kapky destilované vody.
- Všechny tři zkumavky ponořte do kádinky s teplou vodou asi na 20 min. (Čekání můžete vyplnit vypracováním úloh z tohoto pracovního listu).
- Po 20 minutách vyjměte zkumavky, a do každé kápněte po kapce roztoku I_2 . Pozorujte změny.

Pozorování:

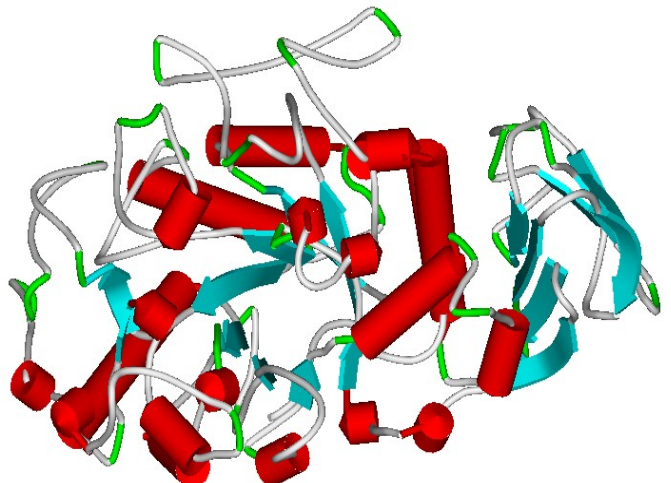
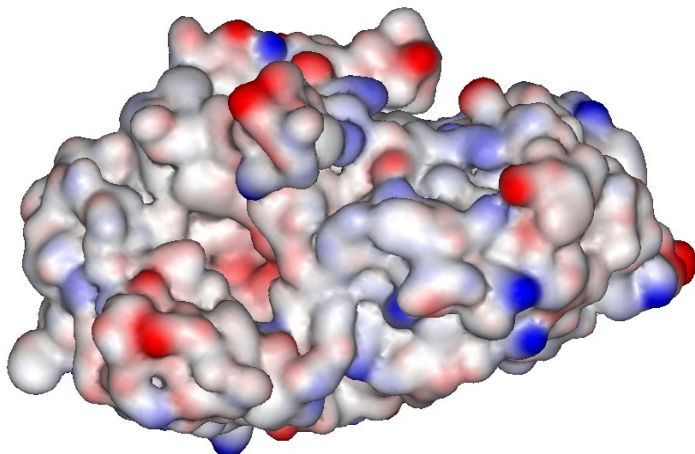
zkumavka č. 1

zkumavka č. 2

zkumavka č. 3

Kontrolní otázky:

1. Vyberte správné tvrzení. Tepelná denaturace je vratný / nevratný proces.
 2. Pokuste se vymyslet, jaký význam mělo zahřívání zkumavek. Jaká teplota by byla pro tento pokus ideální?
 3. Vyhledejte v literatuře nebo na internetu, proč tvoří jód modré zbarvení se škrobem a s kratšími oligosacharidy nikoliv.
 4. Čím je způsobeno žluté zbarvení roztoku ve 2. zkumavce?
 5. Prohlédněte si obrázek ptyalinu. Pokuste se odhadnout, kde by mohlo být aktivní centrum tohoto enzymu. Co je to aktivní centrum enzymu?
- Na prvním obrázku je znázorněn povrch enzymu amylasy tak, aby se do všech skulin dostaly molekuly rozpouštědla. Druhý obrázek je schematickým znázorněním molekuly amylasy.



6. K čemu slouží třetí zkumavka?

Závěr: