

Лабораторна робота №2 ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ

Мета роботи: провести реакції зворотного та незворотного осадження білка (висолювання та денатурацію відповідно); визначити ізоелектричну точку білка (желатину).

Практичне значення роботи: осадження білків методом висолювання використовують для розділення білкових фракцій при одержанні очищених білків, для розділення альбумінів і глобулінів, визначення їх співвідношення у сироватці крові. Осадження білків методом денатурації білків використовується для осадження білків у біологічному матеріалі з подальшим визначенням у ньому небілкових і низькомолекулярних речовин. За допомогою ізоелектричної точки індивідуальних білків можна підібрати умови для осадження їх з біологічних рідин, що містять суміш різних білків.

Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, пробіркотримач, піпетки, сухе пальне, сірники; дистильована вода, 1%-й розчин яєчного білка або концентрований розчин яєчного білка, розчин сульфату амонію, хлоридна кислота; 1%-й розчин желатину; 0,1 моль/л, 1 моль/л розчини оцтової кислоти, 0,1 моль/л розчин натрій ацетату, 96%-й етиловий спирт або 95 %-й ацетон.

Дослід 1. Зворотне осадження білків – висолювання

Принцип реакції. Реакція висолювання зумовлена дегідратацією макромолекул білка з одночасною нейтралізацією його електричного заряду.

При додаванні солей лужних і лужноземельних металів $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , NaCl , MgSO_4 до розчину білка відбувається дегідратація білкових часток, і білки випадають в осад. *При додаванні води до цього розчину гідратаційна оболонка білкових часток відновлюється, осад розчиняється.*

Хід роботи. До 1 мл нерозведеного яєчного білка або концентрованого розчину яєчного білка додають 1 мл розчину амоній сульфату. Рідину збовтують і спостерігають незначне помутніння. Доливають 1 мл води – *помутніння зникає*. Висолювання – зворотний процес осадження білків.

Дослід 2. Незворотне осадження білків – денатурація

Принцип реакції. Осаджуються білки з розчинів солями важких металів (купрум сульфат, плюмбум ацетат), мінеральними й органічними кислотами, кип'ятінням. При незворотному осадженні порушується гідратаційна оболонка й заряд білка. *При додаванні води до розчину гідратаційна оболонка білкових часток не відновлюється, осад не розчиняється.*

Хід роботи.

а) осадження білків солями важких металів. У дві пробірки наливають по 1 мл концентрованого розчину яєчного білка, в 1-у пробірку додають декілька крапель розчину купрум сульфату, в 2-у пробірку – розчин плюмбум ацетату;

б) осадження білків неорганічними кислотами. У дві пробірки наливають по 1 мл кислот: у 1-у пробірку – нітратну кислоту, в 2-у пробірку – хлоридну кислоту. Потім у кожен обережно по стінці доливають рівний об'єм концентрованої розчину яєчного білка;

в) осадження білків при нагріванні. У пробірку наливають 1 мл концентрованої розчину яєчного білка та кип'ятять.

!!! Доливають 1 мл води в усі пробірки – *осад не зникає*. Денатурація – незворотний процес осадження білків.

Результати дослідів 1-2 запишіть у таблицю 2 за аналогією:

Таблиця 2

Властивості білків

№ п/п	Назва дослідів	Реактиви, які використують	Зміни, що відбуваються під час реакції	Зміни після додавання води	Висновок
1	2	3	4	5	6
1	Зворотне осадження білків – висолування	1) 1 мл нерозведеного яєчного білка; 2) 1 мл розчину амоній сульфату; збовтують	Слабке помутніння	Помутніння зникає	Висолування – зворотний процес осадження білків

Дослід 3. Визначення ізоелектричної точки білка (желатину)

Принцип реакції. Визначення ізоелектричної точки білків ґрунтується на здатності білків легко осаджуватися під дією осаджувачів, що викликають дегідратацію білків, при значенні рН середовища, яке відповідає їх ізоелектричній точці.

Ізоелектрична точка (ІЕТ) – значення рН, при якому білок має сумарний нульовий заряд, тобто є електронейтральним.

Хід роботи. У 6 пробірок поміщають відповідну кількість (мл) дистильованої води, розчинів оцтової кислоти (0,1 моль/л або 1 моль/л), натрій ацетату (0,1 моль/л) та желатину (таблиця 3).

Таблиця 3

Схема визначення ізоелектричної точки білка (желатину)

№ пробірки	Вода (мл)	CH ₃ COOH (0,1 моль/л) (мл)	CH ₃ COOH (1 моль/л) (мл)	CH ₃ COONa (0,1 моль/л) (мл)	Розчин желатину (1%-й)	Спирт або ацетон (мл)	pH середовища	Зміни, що спостерігають*
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	3,8	0,2	–	2,0	2,0	2,0	5,6	
2	3,5	0,5	–	2,0	2,0	2,0	5,3	
3	3,2	–	0,8	2,0	2,0	2,0	5,0	
4	3,0	1,0	–	2,0	2,0	2,0	4,7	
5	2,0	2,0	–	2,0	2,0	2,0	4,4	
6	–	4,0	–	2,0	2,0	2,0	4,1	

Примітка. * – «–» – помутніння відсутнє; «+» – слабе помутніння; «++» – середнє помутніння; «+++» – максимальне помутніння

Вміст кожної пробірки перемішують. Потім у всі пробірки повільно по стінці доливають по 2 мл спирту (або ацетону).

Через 30 хв. визначають ізоелектричну точку. Вона буде відповідати значенню pH у пробірці з максимальним ступенем помутніння.

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

✍ Завдання для домашнього виконання

- Охарактеризуйте прості (протеїни) та складні (протеїди) білки. Наведіть приклади білків та укажіть їх біологічну роль.
- Опишіть етапи виділення білка з біологічного об'єкта (матеріалу).

? Питання для самоконтролю

- Охарактеризуйте первинну, вторинну, третинну, четвертинну структуру білків. Перелічіть характерні для них типи зв'язків. Наведіть приклади білків.
- Наведіть класифікацію білків і перелічіть їх функції.
- Охарактеризуйте фізико-хімічні властивості білків (висолювання білка, денатурація білка, ізоелектрична точка білка).