

Лабораторне заняття № 7.

РЕАКЦІЇ ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ.

При вивченні теми необхідно знати фізико-хімічні властивості білків, зворотні і незворотні реакції осадження білків.

Для осадження білка необхідно позбавити його факторів, що утримують його в розчині. Білки під впливом зміни рН, підвищення температури, опромінення хвилями різних довжин, радіоактивного випромінювання, а також ряду хімічних речовин (органічних розчинників, важких металів та ін.) зазнають високих змін у просторовій нативній структурі молекули. У результаті цих змін білок втрачає здатність розчинятися у звичайних для нього розчинниках (вода, солеві розчини та ін.), втрачає свої гідрофільні властивості і набуває гідрофобних. Всі ці зміни входять у поняття денатурації. Пептидні зв'язки у білках при денатурації не гідролізуються.

Фактично процес денатурації білка зводиться до руйнування нативної вторинної і третинної структури, що, як правило, призводить до втрати ним біологічних властивостей.

Реакції осадження білків можна розділити на дві групи:

1) незворотні реакції осадження, при яких білки зазнають глибоких змін і не можуть бути знову розчинені. Наступає денатурація білка. До незворотніх реакцій відносяться осадження білка солями важких металів, алкалоїдними реактивами, мінеральними й органічними кислотами, високою температурою.

2) зворотні реакції осадження, при яких осаджені білки не зазнають глибоких змін і тому одержані осадки білків можуть бути розчинені у воді або іншому розчиннику. Молекула білка при цьому зберігає свої властивості і не піддається денатурації.

До зворотніх реакцій слід віднести осадження білків органічними розчинниками (спиртом чи ацетоном) і висолування білків (осадження під впливом концентрованих розчинів нейтральних солей: MnCl_2 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та ін.)

Контрольні запитання.

1. Колоїдні властивості білків та їх розчинів.
2. Фізико-хімічні властивості білків.
3. Денатурація білків і фактори, які їх викликають.
4. Зворотні і незворотні реакції осадження білків.

Завдання на самостійну підготовку:

1. До яких дисперсних систем відносяться білкові розчини?
2. Від чого залежить стійкість колоїдних білкових розчинів?
3. Від чого залежить розчинність білка? Які фактори стабілізують білок в розчині?

4. Що таке гідроліз білка і які види гідролізу Ви знаєте?
5. Що називається амфотерністю білка?
6. Як ведуть себе амінокислоти і білки у водному розчині і в присутності залишкукислоти або лугу?
7. Що таке ізоелектрична точка білка?
8. Що називається ізоелектричним станом білка? Якими властивостями володіє білоку цьому стані?
9. Яка залежність існує між амінокислотним складом білка і його ізоелектричноюточкою?
10. Чи впливає зміна рН розчину на просторову структуру білка? Чому?
11. Що таке денатурація білка? Які агенти, що денатурують білки, вам відомі?
12. Що відбувається з білками при кип'ятінні?
13. Які загальні механізми осадження білків із розчинів і чому білки найкращеосаджуються в ізоелектричній точці?
14. Чи можна осадити білки спиртом?
15. Як діють солі важких металів на білки?
16. Що таке висолювання білків?
17. Чому при отруєнні солями важких металів дають яєчний білок або молоко?

Рекомендована література:

1. Биохимия. Учебник для институтов физической культуры под ред. Н.Н.Яковлева. М,ФиС 1974. С. 59-64.
2. Яковлев Н.Н., Орещенко Н.И., Чаговец Н.Р. Руководство к практическим занятиям пообщей биохимии и биохимии спорта. М., ФиС, 1973. С18-20, 26-27.
3. Ермолаев М.В. Биологическая химия. М., Медицина, 1983. С. 25-40.
4. Василенко Ю.К. Биологическая химия. М., Высшая школа, 1978. С. 42-70.
5. Збарский Б.И., Иванов И.И., Мардашов С.Р. Биологическая химия. М., Медицина,1972. С. 10-24.
6. Савицький І.В. Біологічна хімія. Київ, Вища школа, 1982. С. 115-120.
7. Добрьшина ВИ. Биологическая химия. М., Медицина, 1976. С. 7-12.
8. Ленинджер А. Биохимия. М., Мир, 1974. С. 150-174.
9. Ф.Ф.Боечко. "Біологічна хімія". Посібник для студентів педагогічних інститутів. Київ,"Вища школа", 1989.

Наочні посібники:

Таблиці:

1. Хімічні властивості білка.

2. Білки - амфотерні сполуки.
3. Денатурація білка.
4. Амінокислоти, що входять до складу білків та їх будова.
5. Типи зв'язків, що стабілізують білкову молекулу. Реактиви:
6. Яечний білок, 1% розчин.
7. Амоній сірчаноокислий, насичений розчин і порошок.
8. Спирт етиловий.
9. Оцтова кислота, 3% і 5% розчини.
10. їдкий натрій, 10% розчин.
11. Мідь сірчаноокисла, 5% розчин.
12. Свинець оцтовокислий, 0,5% розчин. і
13. Соляна кислота, концентрована.
14. Сірчана кислота, концентрована.
15. Азотна кислота, концентрована.
16. Трихлороцтова кислота, 10% розчин.
17. Сульфосалцилова кислота, 5% розчин.
18. Калій залізосинеродистий, 5% розчин.
19. Пікринова кислота.

Обладнання:

1. Пробірки звичайні.
2. Піпетки на 5 мл.
3. Лійки.
4. Фільтрувальний папір.
5. Газовий пальник.
6. Тримачі для пробірок.
7. Олівець для скла.

ХІД РОБОТИ.

1. Висолювання білків сірчанокислим амонієм.

У пробірку наливають 5 мл 1% розчину яєчного білка і додають рівний об'єм насиченого розчину сірчанокислового амонію, досягаючи, відповідно, 5%-ного насичення білка сіллю. При цьому випадає осад глобулінів, який усувають фільтруванням. До фільтрату додають потовчений порошок сірчанокислового амонію до насичення; утвориться осад альбумінів.

Осадження білків солями є зворотнім процесом: при додаванні води білки знову розчиняються. У водному розчині білків їх частинки заряджені і гідратовані, що зумовлює стійкість білкових розчинів. При високій концентрації солей, іони яких також гідратовані, відбувається руйнування водних оболонок білкових молекул і знімається заряд білкової молекули іонами солей, що на ній адсорбуються. У результаті цих двох процесів білкові розчини втрачають стійкість, частинки білка злипаються одна з одною і випадають в осад.

Сульфат амонію має різко виражену висолюючу здатність і осаджує білки в нейтральному середовищі, а ще краще - у слабкокислому.

2. Осадження білка водовіднімаючими агентами.

У пробірку, що містить 10-15 крапель 1%-ного розчину білка, додають таку ж*-або більшу кількість етилового спирту. При перемішуванні спостерігають випадання білка в осад внаслідок дегідратації білкових молекул.: Якщо частину вмісту пробірки відлити і розвести водою, осад знову розчиниться.

3. Осадження білків високою температурою.

У 4 пробірки наливають по 10-15 крапель 10%-ного розчину яєчного білка. У другу і третю пробірки додають відповідно 1 і 10-15 крапель 3%-ої оцтової кислоти, а в четверту - 1 краплину 10%-ного розчину їдкового натрію. Потім усі пробірки нагрівають до кипіння. Спостерігають, у котрій пробірці відбувається осаження білка і з якою швидкістю.

Випадання білків в осад при нагріванні - згортання - характерне майже для всіх білків (виняток складає желатин). Особливо легко і повніше відбувається осаження білків у слабкокислому середовищі, біля ізоелектричної точки. У нейтральному і сильно-кислому середовищах осаження білків відбувається значно гірше, а в лужному середовищі зовсім не настає.

1. Осаження білків солями важких металів. У дві пробірки наливають по 10-15 крапель 1%-ного розчину яєчного білка. Краплями додають у пробірку відповідно

5%-ний розчин сірчаної кислоти міді і 0,5%-ний розчин оцтової кислоти свинцю.
Спостерігають утворення осадів.

Солі важких металів (Н₂S, А₂S, Си, РЬ і ін.) викликають незворотне осадження білків, утворюючи з ними нерозчинні у воді сполуки.

5. Осадження білків мінеральними кислотами,

У три пробірки наливають по 5-6 крапель концентрованих кислот: соляної, сірчаної й азотної. Нахиливши пробірки, в кожен обережно наливають по стінці рівний об'єм 1%-ного розчину білка. На стику двох шарів рідини утворюється осад білка.

Концентровані мінеральні кислоти викликають осадження білків. Це пов'язано як з дегідратацією білкових молекул, так і з денатурацією білка.

6. Осадження білків органічними кислотами.

У дві пробірки наливають по 5-6 крапель 1%-ного розчину білка і додають у кожену

відповідно рівний об'єм 10%-ної трихлороцтової і 5%-ної сульфосаліцилової кислот. При перемішуванні в обох пробірках утворюється осад.

Сульфосаліцилова і трихлороцтова кислоти є надчутливими і специфічними реактивами на білок.

Трихлороцтова кислота осаджує тільки білки і не осаджує продукти розпаду білка.

7. Осадження білків алкалоїдними реактивами.

Танін, пікринова кислота, жовта кров'яна сіль та інші алкалоїди утворюють з білками в кислому середовищі нерозчинні сполуки.

У пробірку наливають 10 крапель 1%-ного розчину яєчного білка, підкислюють 1-2 краплями 10%-ного розчину оцтової кислоти і додають 2-3 краплі 5%-ного розчину пікринової кислоти. Білок випадає в осад.

Механізм осадження білків алкалоїдними реактивами пов'язаний з утворенням нерозчинних солеподібних сполук з основними азотистими групами білка. У цій сполуці білок виступає катіоном, а алкалоїдний реактив - аніоном.