

Denaturace a vysolování proteinů

Tato laboratorní práce je zaměřena na objasnění principu denaturace a vysolování proteinů. Na základě vlastních experimentů studenti rozhodnou, zda je vaření vaječného bílku a srážení mléčné bílkoviny kaseinu kyselinou denaturace nebo vysolování, zda se jedná o procesy vratné nebo nevratné. S pomocí modelu polypeptidového řetězce složeného do určitého prostorového uspořádání, hydrofobního písku a pokusů s denaturací a vysolováním vaječného bílku se studenti pokusí popsat a vysvětlit princip těchto dvou procesů.

Tato práce je zahrnuta do trojice laboratorních prací (*Hydrofobní "magický" písek* – práce zabývající se slabými vazebnými interakcemi; *Jak získávají proteiny své prostorové uspořádání?* – skládání proteinů; *Denaturace a vysolování proteinů*) a v ideálním případě by měla být poslední z těchto tří prací. Lze ji však se studenty provést i v případě, že předchozí dvě laboratorní práce neabsolvovali. V tom případě by jim však hydrofobní písek a model proteinu při práci moc nepomohl a je zbytečné jim je dávat. Bez znalostí slabých vazebných interakcí a alespoň základních informací o struktuře proteinů se však studenti při této laboratorní práci neobejdou.

Téma: Denaturace a vysolování proteinů

Zařazení do RVP: obor Chemie – Biochemie

Úroveň: 3. nebo 4. ročník čtyřleté SŠ

Organizační forma výuky: LP

Doba trvání: 1VH

Cíl: Student vysvětlí princip denaturace a vysolování proteinů. Popíše, které vazby se narušují při denaturaci, jak probíhá vysolování.

Pomůcky (pro jednu pracovní skupinu):

kádinky (alespoň 3ks), zkumavky (min. 2ks), skleněná tyčinka, laboratorní lžička, vata, nálevka, model proteinu *mini toobers*, hydrofobní písek, vajíčko

Chemikálie:

roztok NaCl (1%), nasycený roztok $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, aceton, destilovaná voda

Pomůcky pro demonstrační pokusy:

vajíčko, mléko, citron, kahan, 2 velké Petriho misky, skleněná tyčinka, pánvička s troškou oleje

Motivační úvod hodiny:

Tuto laboratorní práci zahájí učitel dvěma demonstračními pokusy. Nejdříve vezme vejce, vyklepne jej do Petriho misky a položí studentům následující dotazy:

- Z jakých částí se vejce skládá? Jaké je chemické složení těchto částí?
- K čemu slouží žloutek, k čemu slouží bílek?

Poté vezme pánvičku s olejem, nahřeje ji nad kahanem, nalije do ní vejce a usmaží jej. Položí další dotaz:

- Myslíte, že teď ještě může žloutek plnit svoji funkci? A co bílek?

Pak učitel nalije do druhé Petriho misky trochu mléka. Pomalu k němu přikapává šťávu z citronu. Studenti pozorují vznik sráženiny. Učitel se zeptá:

- Co se, podle vás, v mléku sráží?
- Jaká je příčina srážení mléčné bílkoviny kaseinu?

Učitel vysvětlí studentům, že existují dva významné procesy, kterými je možné proteiny srážet. Denaturace a vysolování. Denaturace je, na rozdíl od vysolování, proces nevratný. Cílem jejich dnešní práce bude rozhodnout, zda v úvodu hodiny viděli denaturaci nebo vysolování, zda byly tyto procesy vratné nebo nevratné a také vysvětlit, jak tyto procesy probíhají, objasnit jejich podstatu. Svoje tvrzení budou muset podložit svými experimenty.

Otázky: Jaké jsou rozdíly mezi denaturací a vysolováním? Jak tyto procesy probíhají, co se při nich s proteiny stane?

Co budou mít studenti pro svoji práci k dispozici:

1. Pro svoji samostatnou laboratorní činnost dostanou studenti kromě vajíčka, které si přinesou, 1% roztok NaCl (s označením *fyziologický roztok*), nasycený roztok $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, aceton a pokud možno destilovanou vodu. K tomu patříčné laboratorní nádobí (viz pomůcky) a smotek vaty.
2. Další pomůckou budou modely proteinu s nimiž studenti pracovali v předchozí laboratorní práci (mini toobers). Modely by měly být složeny tak, aby postranní řetězce aminokyselin v podobě barevných napínáček správně interagovaly (viz LP Skládání proteinů, nebo např. internetová stránka: http://www.3dmoleculardesigns.com/15_Tacks-Teacher_Notes.pdf).
3. Studentům by mohl posloužit při jejich bádání i hydrofobní písek, který se ve vodě po přidání acetonu chová trochu podobně jako proteiny při denaturaci. Hydrofobní prostředí jej "rozpuští", takže je najednou smáčivý. Dojde k narušení hydrofobních interakcí mezi jednotlivými zrnky písku. Narušení hydrofobních interakcí v molekule proteinu je jeden ze závěrů, ke kterým by studenti při vysvětlování denaturace měli dospět.
4. Doprovodné texty *Jak pracovat s proteiny* a *Elektrostatické interakce*.
5. Studenti by také měli použít svoje pracovní listy a poznámky z laboratorní práce *Hydrofobní "magický" písek a skládání proteinů – Jak získávají proteiny své prostorové uspořádání?*.

Praktická část LP:

- Prvním krokem by mělo být převedení proteinů vaječného bílku do 1% roztoku NaCl. Pokud mají studenti na laboratorní práci málo času, bylo by vhodné, aby jim učitel poskytl hotový roztok vaječného bílku. Pokud je času dost, měli by k tomuto kroku dojít studenti sami. Studenti nedostanou k této laboratorní práci žádný postup, návod, jak mají pracovat. Kromě pracovního listu jim však můžeme dát k dispozici odbornou literaturu nebo různé texty. Pro tuto část úlohy je určen text *Jak pracovat s proteiny*.
- Při další činnosti by měli studenti postupovat samostatně, pouze s návodnými otázkami a úkoly v pracovním listu. Učitel v této fázi vyučovacího procesu slouží jako kontrola, aby si studenti v laboratoři nějak neublížili, také jako konzultant, když studenti potřebují poradit se svým postupem, s interpretací výsledků atd.. Neměl by práci studentů řídit a příliš ovlivňovat. Pokud však uvidí, že se jejich práce nechýlí k žádnému výsledku, může jim pomoci různými návodnými otázkami.
- Po určitém čase, cca po 15 minutách (záleží na tom, jak jsou studenti daleko, kolik mají ještě času do konce hodiny), učitel samostatnou práci ukončí. Vytvoří dvojice z pracovních skupin s tím, že jedna pracovní skupina z dvojice bude mít za úkol předvést té druhé vše, co zjistila o denaturaci, druhá bude prezentovat vše o vysolování. Každá skupina ukáže té druhé nějaký experiment a podá své vysvětlení, jak daný proces probíhá. Druhá skupina pak bude mít za úkol porovnat jejich práci se svojí vlastní a zhodnotit ji. Obě skupiny by se měly shodnout na nějakém společném závěru, vybrat jeden experiment pro denaturaci a jeden pro vysolování, který by mohly ukázat před celou třídou.
- Na závěr vybere učitel dvě nebo více skupin (podle zbývajících času), které budou své výsledky prezentovat před třídou. Ostatní by měli dostat prostor pro své postřehy a komentáře.
- V úplném závěru hodiny by měl učitel, nebo některý ze studentů, shrnout hlavní principy denaturace a vysolování a rozdíly mezi těmito dvěma procesy. Studenti mohou navrhnout různá denaturační činidla – účinek tepla a extrémního pH viděli v úvodu hodiny, možná je napadne i něco dalšího.

Vysvětlení principu vysolování by mohlo činit studentům potíže. Pro usnadnění slouží text *Elektrostatické interakce*.

Všichni studenti by měli v závěrech svých pracovních listů uvést, že denaturace je proces nevratný, při němž se narušují slabé vazebné interakce v molekulách proteinů, ale základní řetězec zůstává zachován. Vysolování je naopak proces vratný, dochází pouze k tomu, že vodu v roztoku vyváží molekuly soli a na rozpouštění proteinu už žádná voda nezbude.

Jak pracovat s proteiny

Proteiny, které chceme zkoumat, je vhodné nejprve převést do roztoku. Měli bychom proto vědět, zda jsou rozpustné ve vodě nebo ne. Globulární, neboli kulovité, proteiny bývají rozpustné ve vodě, zatímco proteiny fibrilární, vláknité, nikoliv.

V čem proteiny rozpouštět? Určitě není vhodná destilovaná voda. Proteiny jsou velmi citlivé na změny vnějšího prostředí. Nejstabilnější bývají při neutrálním pH a fyziologické iontové síle (té odpovídá iontová síla fyziologického roztoku - 1% NaCl).

Získáváme-li protein z rostlinného nebo živočišného materiálu, měli bychom se také zbavit různých nečistot a neproteinových složek daného materiálu (případně jiných, třeba nerozpustných proteinů). Toho je možné dosáhnout různými metodami. Chceme-li získat proteiny z buněčného materiálu, musíme nejdřív buňky mechanicky rozrušit. Poté můžeme využít centrifugaci, kdy se nám různé části buněk usazují na dně zkumavky podle své hmotnosti. Další metodou vhodnou pro čištění materiálu a oddělení nerozpustných částí je filtrace. Roztok daného organického materiálu však musíme nejprve řádně protřepat, aby se náš protein rozpustil a nezachytil na filtru. Podle povahy organického materiálu vybíráme různé filtry – ne všechno je vhodné filtrovat přes filtrační papír, někdy stačí třeba smotek vaty.

Ve výsledku bychom měli získat čirý roztok našeho proteinu, se kterým se nám už bude dobře pracovat.

Následující tabulka uvádí některé příklady proteinů rozpustných a nerozpustných ve vodě.

proteiny rozpustné ve vodě	proteiny nerozpustné ve vodě
albuminy krevního séra	kolagen
fibrinogen	keratin
ovalbumin	fibroin
hemoglobin	elastin
imunoglobuliny	fibrin

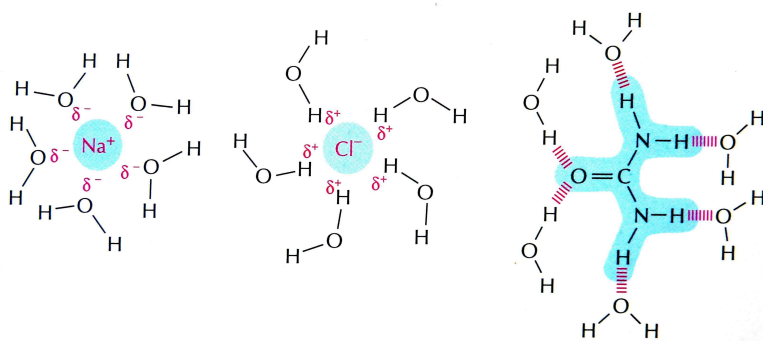
Text č. 2:

Elektrostatické interakce

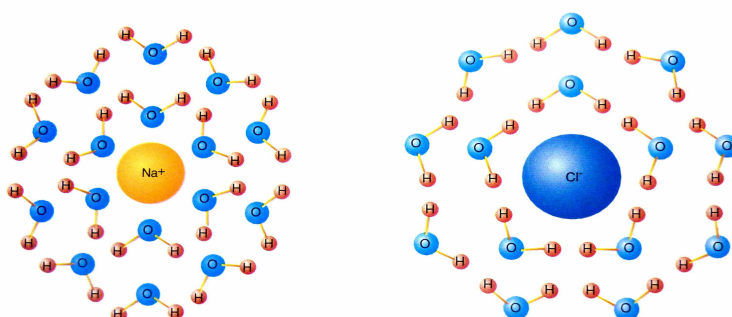
Opačně nabité částice jsou vzájemně přitahovány tzv. elektrostatickými interakcemi. Tyto vazby patří do skupiny slabých vazebných interakcí a jsou velmi důležité pro stabilizaci a správnou funkci biomolekul.

Mezi elektrostatické interakce řadíme také hydrataci iontů ve vodném prostředí. Voda, jakožto polární rozpouštědlo, je přitahována jak ke kladně tak k záporně nabitým iontům. Kolem těchto částic vytváří tzv. solvatační obal (anglicky solvent znamená rozpouštědlo; viz obrázky). Voda tak vlastně zmenšuje přitažlivé síly mezi záporně a kladně nabitými ionty a tím iontové sloučeniny rozpouští.

Zvláštní význam má hydratace iontů v nasycených roztocích různých iontů, kde voda solvatuje, tedy vlastně rozpouští, přednostně ty nejrozpustnější ionty. Ostatní, původně rozpustné, se pak mohou z roztoku vysrážet.



Interakce, které může voda tvořit s rozpouštěnými látkami.



solvatace iontů