

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Název: Stanovení proteinů biuretovou metodou

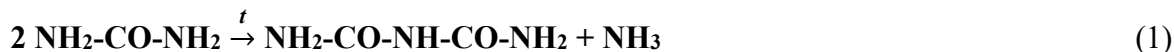
Návod na práci

Zadání: Stanovte koncentraci BSA v předloženém vzorku v g/l.

Teorie

Bílkoviny poskytují reakci s měďnatými ionty v alkalickém prostředí fialově zbarvený komplex. Komplexní sloučenina vzniká koordinační vazbou mezi centrálním iontem – měďnatým kationtem a volnými elektronovými páry na dusíku v peptidových vazbách.

Reakci obecně poskytují látky obsahující v molekule dvě skupiny $-\text{CO}-\text{NH}_2$, resp. $-\text{CO}-\text{NH}-$. Reakci poskytují tedy nejen bílkoviny, ale také peptidy. Název reakce je odvozen od nejjednodušší sloučeniny, která tuto reakci poskytuje, biuretu. Biuret vzniká zahřátím močoviny, kdy dochází k deaminaci.



Pomůcky: kádinky, odměrné sklo, zkumavky, stojan na zkumavky, automatické pipety, spektrometr, kyvety, váhy, vortex, psací potřeby, kalkulačka, chemické tabulky

Chemikálie: BSA (hovězí sérový albumin), síran měďnatý pentahydrát, vinan sodno-draselný, jodid draselný, hydroxid sodný

Postup

1. Přečtěte si rizikové věty a bezpečnostní upozornění pro práci s chemikáliemi. Noste ochranné brýle a rukavice!
2. Nejprve si přečtěte celý postup. Vizualizujte postup: načrtněte každý přístroj a zapište si množství látek, zapište si kroky oddělené například šipkami.

Příprava roztoků

1. Připravte 100 ml standardního roztoku albuminu o hmotnostní koncentraci 10 g/l.
2. Ze zásobního roztoku albuminu připravte kalibrační roztoky 1; 2; 4; 6 a 8 g/l ve 25 ml odměrných baňkách.
3. Připravte Biuretovo činidlo rozpuštěním 0,75 g pentahydrátu síranu měďnatého a 3 g vinanu sodno-draselného ve 250 ml deionizované vody. Potom přidejte 150 ml 10% roztoku hydroxidu draselného a doplňte objem na 500 ml. Potom přidejte 0,5 g jodidu draselného.

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Příprava kalibračních roztoků a vzorků pro měření

1. Připravte a označte sedm zkumavek:
 - do první zkumavky napipetujte 2 ml deionizované vody (slepý vzorek),
 - napipetujte 2 ml připravených kalibračních roztoků do zkumavek 2 – 6,
 - do zkumavky 7 napipetujte 2 ml neznámého vzorku albuminu.
2. Přidejte 4 ml Biuretového činidla do všech zkumavek. Zkumavky promíchejte na vortexu a nechte reagovat 30 minut.
3. Změřte absorbanci všech připravených kalibračních roztoků a vzorku nápoje oproti slepému pokusu při 520 nm. Každý roztok odměřte alespoň třikrát.

Zpracování naměřených údajů

1. Z experimentálně získaných hodnot absorbance sestrojte kalibrační křivku $A = f(c_m)$, vynesete rovnici regresní přímky a hodnotu koeficientu spolehlivosti R^2 .
2. Z kalibrační křivky nebo regresní rovnice vypočítejte hmotnostní koncentraci BSA v neznámém vzorku, vyjádřete ji v g/l.

Nakládání s chemickými látkami

Chemikálie	Forma	H-věty	P-věty
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Pevná	H302, H319, H315, H410	P273, P302 + P352, P305 + P351 + P338
Vínan sodno-draselný	Pevná	---	---
KI	Pevná	H372	P270
NaOH	Pevná	H314, H290	P280, P310, P305 + P351 + P338
BSA	Pevná	H290, H315, H319, H335	---

Zdroje rizik a vyhodnocení závažnosti rizika

Při dodržení všech zásad pro práci s chemikáliemi a používání osobních ochranných pracovních prostředků (rukavice, brýle, plášť) nehrozí žádné riziko.

Způsob nakládání s odpady

Chemikálie likvidujeme v určených sběrných nádobách.

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Opatření k omezení rizik

Používání osobních ochranných prostředků (brýle, rukavice, plášť).

Literatura

1. Sedlák, E. et al.: *Praktické cvičenia z biochémie*. 1. vyd. Košice, 2020. 154 p. ISBN 978-80-8152-902-3.

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Co-funded by the
Erasmus+ Programme
of the European Union

Pracovní list

Výpočty pro přípravu roztoků

1. Vypočítejte hmotnost albuminu potřebného pro přípravu 100 ml standardního roztoku o hmotnostní koncentraci 10 g/l.
2. Vypočítejte hmotnost NaOH potřebného pro přípravu 150 ml 10% roztoku.
3. Vypočítejte objem, který je třeba odebrat ze zásobního roztoku albuminu pro přípravu 25 ml kalibračních roztoků o hmotnostní koncentraci 1; 2; 4; 6 a 8 g/l.

Experimentální údaje

1. Zaznamenejte absorbanci kalibračních roztoků.

c_m [g/l]	A	A (průměr)
0		
1		
2		
4		
6		
8		

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



2. Zaznamenejte absorbanci neznámého vzorku albuminu.

Vzorek	A	A (průměr)
vzorek albuminu		

Výpočty

1. Z experimentálních údajů absorbance sestrojte kalibrační křivku $A = f(c_m)$, vynesete rovnici regresní přímky a hodnotu koeficientu spolehlivosti R^2 .

Rovnice regresní přímky:

$$y = \dots\dots x + \dots\dots$$

Hodnota koeficientu spolehlivosti:

$$R^2 = \dots\dots\dots$$

2. Z kalibrační křivky nebo regresní rovnice vypočítejte hmotnostní koncentraci BSA.
 $c(\text{BSA}) = \dots\dots\dots \text{g/l}$

Otázky

1. Vysvětlete princip stanovení proteinů Biuretovou reakcí.
2. Charakterizujte spektrometrii jako analytickou metodu.
3. Napište Lambertův-Beerův zákon, vysvětlete i symboly v matematickém zápisu a uveďte i jednotky pro dané veličiny.
4. Charakterizujte albumin, popište jeho základní vlastnosti a využití.

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



5. Vysvětlete, proč měďnaté kationty v alkalickém prostředí vytvářejí fialový komplex právě s proteiny a peptidy a ne s jinými látkami?

6. Porovnejte Biuretovu metodu s jinou metodou pro stanovení bílkovin (např. Lowryho metoda, Bradfordova metoda). Jaké jsou výhody a nevýhody jednotlivých metod?

7. Uveďte, proč je alkalické prostředí nezbytné pro průběh Biuretové reakce? Jak by se změnil výsledek experimentu, kdyby bylo prostředí neutrální nebo kyselé. Zdůvodněte svou odpověď chemicky.

8. Najděte, jaké látky by mohly interferovat s Biuretovou reakcí a ovlivnit výsledek stanovení proteinů? Jak byste tyto rušivé vlivy eliminovali nebo minimalizovali?

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Závěr

Shrňte stručně cíl experimentu, hlavní výsledky a porovnejte je s očekávanými hodnotami.

Prohlášení o vyloučení odpovědnosti

Financováno Evropskou unií. Vyjádřené názory a postoje jsou názory a prohlášeními autora(ů) a nemusí nutně odrážet názory a stanoviska Evropské unie nebo Slovenské akademické asociace pro mezinárodní spolupráci, Národní agentury programu Erasmus+ pro vzdělávání a odbornou přípravu. Evropská unie ani organizace udělující grant za ně nepřebírají žádnou odpovědnost.