

## Názov: Stanovenie proteínov biuretovou metódou

### Návod na prácu

**Zadanie:** Stanovte koncentráciu BSA v predloženej vzorke v g/l.

### Teória

Proteíny poskytujú reakciu s meďnatými iónmi v alkalickom prostredí fialovo sfarbený komplex. Komplexná zlúčenina vzniká koordinačnou väzbou medzi centrálnym iónom – meďnatým kationom a voľnými elektrónovými párami na dusíku v peptidových väzbách.

Reakciu všeobecne poskytujú látky obsahujúce v molekule dve skupiny  $-\text{CO}-\text{NH}_2$ , resp.  $-\text{CO}-\text{NH}-$ . Reakciu poskytujú teda nie len proteíny, ale aj peptidy. Názov reakcie je odvodený od najjednoduchšej zlúčeniny, ktorá túto reakciu poskytuje, biuretu. Biuret vzniká zahriatím močoviny, kedy dochádza k deaminácii.



**Pomôcky:** kadičky, odmerné sklo, skúmavky, stojan na skúmavky, automatické pipety, spektrometer, kyvety, váhy, vortex, písacie potreby, kalkulačka, chemické tabuľky

**Chemikálie:** BSA (hovädzí sérový albumín), síran meďnatý pentahydrát, vínan sodno-draselný, jodid draselný, hydroxid sodný

### Postup

1. Prečítajte si rizikové vety a bezpečnostné upozornenia pre prácu s chemikáliami. Noste ochranné okuliare a rukavice!
2. Najprv si prečítajte celý postup. Vizualizujte postup: načrtnite každý prístroj a zapíšte si množstvá látok, zapíšte si kroky oddelené napríklad šípkami.

#### *Príprava roztokov*

1. Pripravte 100 ml štandardného roztoku albumínu s hmotnostnou koncentráciou 10 g/l.
2. Zo zásobného roztoku albumínu pripravte kalibračné roztoky 1; 2; 4; 6 a 8 g/l v 25 ml odmerných bankách.
3. Pripravte Biuretovo činidlo rozpustením 0,75 g pentahydrátu síranu meďnatého a 3 g vínanu sodno-draselného v 250 ml deionizovanej vody. Potom pridajte 150 ml 10 % roztoku hydroxidu draselného a doplňte objem na 500 ml. Potom pridajte 0,5 g jodidu draselného.

### Príprava kalibračných roztokov a vzoriek na meranie

1. Pripravte a označte sedem skúmaviek:
  - do prvej skúmavky napipetujte 2 ml deionizovanej vody (slepá vzorka),
  - napipetujte 2 ml pripravených kalibračných roztokov do skúmaviek 2 – 6,
  - do skúmavky 7 napipetujte 2 ml neznámej vzorky albumínu.
2. Pridajte 4 ml Biuretového činidla do všetkých skúmaviek. Skúmavky premiešajte na vortexe a nechajte reagovať 30 minút.
3. Zmerajte absorbanciu všetkých pripravených kalibračných roztokov a vzorky nápoja oproti slepému pokusu pri 520 nm. Každý roztok odmerajte aspoň trikrát.

### Spracovanie nameraných údajov

1. Z experimentálne získaných hodnôt absorbancie zostrojte kalibračnú krivku  $A = f(c_m)$ , vynesť rovnicu regresnej priamky a hodnotu koeficientu spoľahlivosti  $R^2$ .
2. Z kalibračnej krivky alebo regresnej rovnice vypočítajte hmotnostnú koncentráciu BSA v neznámej vzorke, vyjadrite ju v g/l.

### Nakladanie s chemickými látkami

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

### Zdroje rizík a vyhodnotenie závažnosti rizika

Pri dodržaní všetkých zásad pre prácu s chemikáliami a používaní osobných ochranných pracovných prostriedkov (rukavice, okuliare, plášť) nehrozí žiadne riziko.

### Spôsob nakladania s odpadmi

Chemikálie likvidujeme v určených zberných nádobách.

**Názov projektu:** Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
**Akronym:** ChemIQSoc  
**Číslo projektu:** 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



### **Opatrenia k obmedzeniu rizika**

Používanie osobných ochranných prostriedkov (okuliare, rukavice, plášť).

### **Literatúra**

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

## Pracovný list

### Výpočty na prípravu roztokov

1. Vypočítajte hmotnosť albumínu potrebného na prípravu 100 ml štandardného roztoku s hmotnostnou koncentráciou 10 g/l.
2. Vypočítajte hmotnosť NaOH potrebného na prípravu 150 ml 10% roztoku.
3. Vypočítajte objem, ktorý je potrebné odobrať zo zásobného roztoku albumínu na prípravu 25 ml kalibračných roztokov s hmotnostnou koncentráciou 1; 2; 4; 6 a 8 g/l.

### Experimentálne údaje

1. Zaznamenajte absorbanciu kalibračných roztokov.

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

Názov projektu: Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
Akronym: ChemIQSoc  
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



2. Zaznamenajte absorbanciu neznámej vzorky albumínu.

Vzorka	A	A (priemer)
vzorka albumínu		

### Výpočty

1. Z experimentálnych údajov absorbancie zostrojte kalibračnú krivku  $A = f(c_m)$ , vynesť rovnicu regresnej priamky a hodnotu koeficientu spoľahlivosti  $R^2$ .

Rovnica regresnej priamky:

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

Hodnota koeficientu spoľahlivosti:

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

2. Z kalibračnej krivky alebo regresnej rovnice vypočítajte hmotnostnú koncentráciu BSA.  
 $c(\text{BSA}) = \dots\dots\dots \text{g/l}$

### Otázky

1. Vysvetlite princíp stanovenia proteínov Biuretovou reakciou.
2. Charakterizujte spektrometriu ako analytickú metódu.
3. Napíšte Lambertov-Beerov zákon, vysvetlite aj symboly v matematickom zápise a uveďte aj jednotky pre dané veličiny.
4. Charakterizujte albumín, popíšte jeho základné vlastnosti a využitie.

**Názov projektu:** Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
**Akronym:** ChemIQSoc  
**Číslo projektu:** 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



5. Vysvetlite, prečo meďnaté katióny v alkalickom prostredí vytvárajú fialový komplex práve s proteínmi a peptidmi a nie s inými látkami?
  
6. Porovnajte Biuretovu metódu s inou metódou na stanovenie bielkovín (napr. Lowryho metóda, Bradfordova metóda). Aké sú výhody a nevýhody jednotlivých metód?
  
7. Uved'te, prečo je alkalické prostredie nevyhnutné na priebeh Biuretovej reakcie? Ako by sa zmenil výsledok experimentu, keby bolo prostredie neutrálne alebo kyslé? Zdôvodnite svoju odpoveď chemicky.
  
8. Nájdite, aké látky by mohli interferovať s Biuretovou reakciou a ovplyvniť výsledok stanovenia proteínov? Ako by ste tieto rušivé vplyvy eliminovali alebo minimalizovali?

**Názov projektu:** Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
**Akronym:** ChemIQSoc  
**Číslo projektu:** 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



## **Záver**

Zhrňte stručne cieľ práce a experimentálne výsledky. Zhodnot'te presnosť merania, identifikujte možné chyby a navrhните spôsoby ich eliminácie.

## **Vyhlásenie o vylúčení zodpovednosti**

Financované Európskou úniou. Vyjadrené názory a postoje sú názormi a vyhláseniami autora(-ov) a nemusia nevyhnutne odrážať názory a stanoviská Európskej únie alebo Slovenskej akademickej asociácie pre medzinárodnú spoluprácu, Národnej agentúry programu Erasmus+ pre vzdelávanie a odbornú prípravu. Európska únia ani organizácia udeľujúca grant za ne nepreberajú žiadnu zodpovednosť.