

# **ĆWICZENIE 1. Aminokwasy – struktura, właściwości i funkcje**

## *I. Reakcje wspólne dla wszystkich aminokwasów*

### **Zadanie 1. Reakcja grupy aminowej z ninhydriną.**

#### *Odczynniki:*

- 1% r-r glicyny
- 1% r-r proliny
- 0,1 % r-r ninhydryny w 50% etanolu

#### *Wykonanie:*

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-r glicyny
- b. do drugiej 1 ml 1% r-r proliny

Do każdej probówki dodać 2-3 krople 0,1% r-ru ninhydryny. Następnie wymieszać i ogrzać. Zaobserwować pojawienie się zabarwienia. Porównać wynik w obu probówkach.

### **Zadanie 2. Reakcja grupy aminowej z kwasem azotowym (III) – reakcja Van Slyke'a**

#### *Odczynniki:*

- 0,5% r-r glicyny
- 10% r-r NaNO<sub>2</sub>
- 2M r-r CH<sub>3</sub>COOH

#### *Wykonanie:*

Do probówki zawierającej 1 ml 10% r-ru azotynu sodu dodać 2 ml 2M r-ru kwasu octowego i 0,5 ml 0,5% r-ru glicyny. Wydzielają się pęcherzyki gazu.

## *II. Reakcje specyficzne dla poszczególnych aminokwasów*

### **Zadanie 3. Reakcja ksantoproteinowa z aminokwasami aromatycznymi**

#### *Odczynniki:*

- 1% r-r tyrozyny
- 3% r-r białka jaja kurzego
- stęż. HNO<sub>3</sub>
- 30% r-r NaOH

#### *Wykonanie:*

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-ru tyrozyny
- b. do drugiej 1 ml 3% r-r białka jaja kurzego

Do każdej probówki dodać 0,5 ml stęż. kwasu azotowego i ogrzewać przez 30 sekund. Wytrąca się żółty osad. Próbę oziębic i dodać 2 ml 30% r-r NaOH. Następuje zmiana barwy na pomarańczową **uwaga: reakcja silnie egzotermiczna.**

**Zadanie 4. Wykrywanie pierścienia indolowego w tryptofanie – r. Adamkiewicza - Hopkinsa**

*Odczynniki:*

- 1% r-r tryptofanu
- 3% r-r białka jaja kurzego
- kwas glioksalowy
- stęż. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

*Wykonanie*

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-ru tryptofanu
- b. drugiej 1 ml 3% r-r białka jaja kurzego

Do każdej probówki dodać 4-5 kropli kwasu glioksalowego. Po wymieszaniu ostrożnie (po ściankach probówki) dodać 1 ml stęż. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pojawienie się fioletowego pierścienia na pograniczu obu warstw oznacza dodatni wynik na obecność tryptofanu.

**Zadanie 5. Reakcja cystynowa (cystyna i cysteina)**

*Odczynniki:*

- 1% r-r metioniny
- 3% r-r białka
- 1% r-r octanu ołowiawego
- 30% NaOH

*Wykonanie:*

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-ru metioniny
- b. do drugiej 1 ml 3% r-r białka jaja kurzego

Do każdej probówki dodać 0,5 ml octanu ołowiawego i 2 ml 30% NaOH. Wstawić do łaźni wrzącej. Zaobserwować pojawienie się ciemno zabarwionego osadu. Porównać wynik w obu probówkach.

**Zadanie 6. Wykrywanie argininy – reakcja Sakaguchi**

*Odczynniki:*

- 1% roztwór argininy (lub wodny roztwór białka jaja kurzego)
- 30% NaOH
- 1% α-naftol w etanolu
- 5% chloran (I) sodu [ NaClO ]

*Wykonanie:*

Do 1 ml 1% roztworu argininy (lub roztworu białka jaja kurzego) dodać 0,2 ml 30% NaOH, 2 krople 1% etanolowego roztworu α-naftolu. Całość wymieszać, a następnie dodać 4-5 kropli 5% chloranu (I) sodu.

**Zadanie 7. Rozpuszczalność aminokwasów w wodzie**

*Odczynniki:*

- glicyna *in subst.*
- tyrozyna *in subst.*
- 30% r-r NaOH
- stęż. HCl

*Wykonanie:*

1/ Rozpuszczalność glicyny w wodzie:

Do probówki wsypać szczyptę glicyny i dodać 2-3 ml wody. Zawartość probówki dobrze wymieszać.

2/ Rozpuszczalność tyrozyny w wodzie:

Do dwóch probówek wsypać szczyptę tyrozyny i dodać 2-3 ml wody. Wymieszać. Do jednej z probówek dodać po kropli stęż. HCl, do drugiej - po kropli 30% NaOH.

## **ĆWICZENIE 2. Aminokwasy – rozdział, identyfikacja**

### **Zadanie 1. Rozdział i identyfikacja aminokwasów metodą chromatografii cienkowarstwowej**

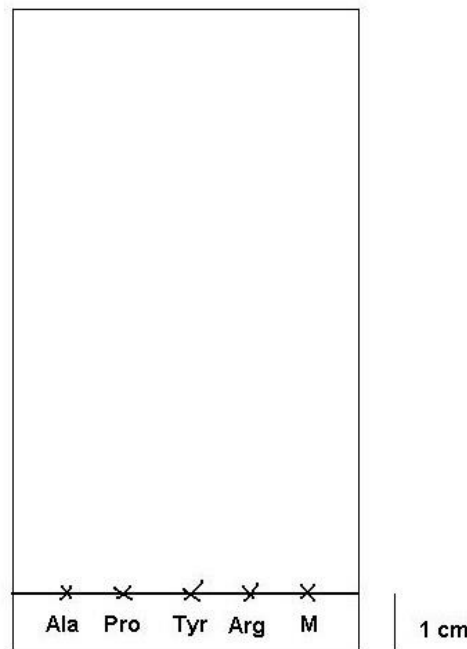
*Odczynniki i materiały:*

- Eluent o składzie: n-butanol : kwas octowy : woda destylowana, w proporcjach objętościowych 60:10:12
- 0,01M roztwory alaniny, proliny, tyrozyny, argininy w 0,1M HCl oraz mieszanina tychże aminokwasów
- odczynnik ninhydrynowy (1% ninhydryna w etanolu)
- płytki chromatograficzne powleczone żelem krzemionkowym
- komory do chromatografii cienkowarstwowej
- suszarka
- ołówek i linijka
- kapilary do nanoszenia aminokwasów na płytki chromatograficzne, wykonane z dwu końcówek do pipet automatycznych

*Wykonanie:*

**Uwaga!** Płytkę chromatograficzną chwytamy jedynie za jej krawędzie, unikając dotykania żelu krzemionkowego palcami !!!

Na płytce powleczonej żelem krzemionkowym zaznaczyć punkty nanoszenia aminokwasów poprzez delikatne narysowanie ołówkiem (!) poziomej linii w odległości 1 cm od dolnego brzegu płytki i pięciu równoodalonych krzyżyków (patrz rysunek poniżej).



Następnie nanieść po 1-2  $\mu\text{l}$  każdego z roztworów aminokwasów za pomocą kapilar, poprzez delikatne dotknięcie ujścia kapilary do powierzchni żelu krzemionkowego. Średnica widocznych, wilgotnych plamek nanoszonych roztworów nie powinna przekraczać 2 mm. Miejsca startu wysuszyć suszarką.

Do komory chromatograficznej wlać eluent w takiej ilości, która nie spowoduje zakrycia linii startu po umieszczeniu w komorze płytki chromatograficznej. Przygotowaną płytkę chromatograficzną umieścić ostrożnie w komorze, zanurzając równo dolną krawędź płytki w eluencie. Komorę szczelnie zamknąć i nie poruszać jej aż do zakończenia procesu chromatograficznego.

Po upływie ok. 40 min wydobyć płytkę chromatograficzną z komory i po położeniu jej na stole natychmiast delikatnie narysować ołówkiem (!) linię odzwierciedlającą miejsce, do którego zawędrowało czoło eluentu (granica pomiędzy wilgotną a suchą powierzchnią żelu krzemionkowego na płytce).

Płytkę wysuszyć suszarką, spryskać odczynnikiem ninhydrynowym a następnie umieścić w cieplarni w temp. 60 C na ok. 10 min. w celu szybkiego wywołania barwnej reakcji aminokwasów z ninhydriną. Po wywołaniu chromatogramu wybarwione pasma aminokwasów obrysować i zaznaczyć punktami środek geometryczny pasm. Linijką zmierzyć (z dokładnością do milimetra):

1) odległości na jakie zawędrowały chromatografowane aminokwasy od linii startu

2) odległość na jaką zawędrowało czoło eluentu w trakcie chromatografii

Wyznaczyć współczynniki retencji  $R_f$  (*retention factor*) dla wszystkich czterech aminokwasów według wzoru:

$$R_f = \frac{\text{odległość substancji badanej od startu}}{\text{odległość czoła rozpuszczalnika od startu}}$$

## Zadanie 2. Identyfikacja nieznanymi aminokwasów

Odczynniki:

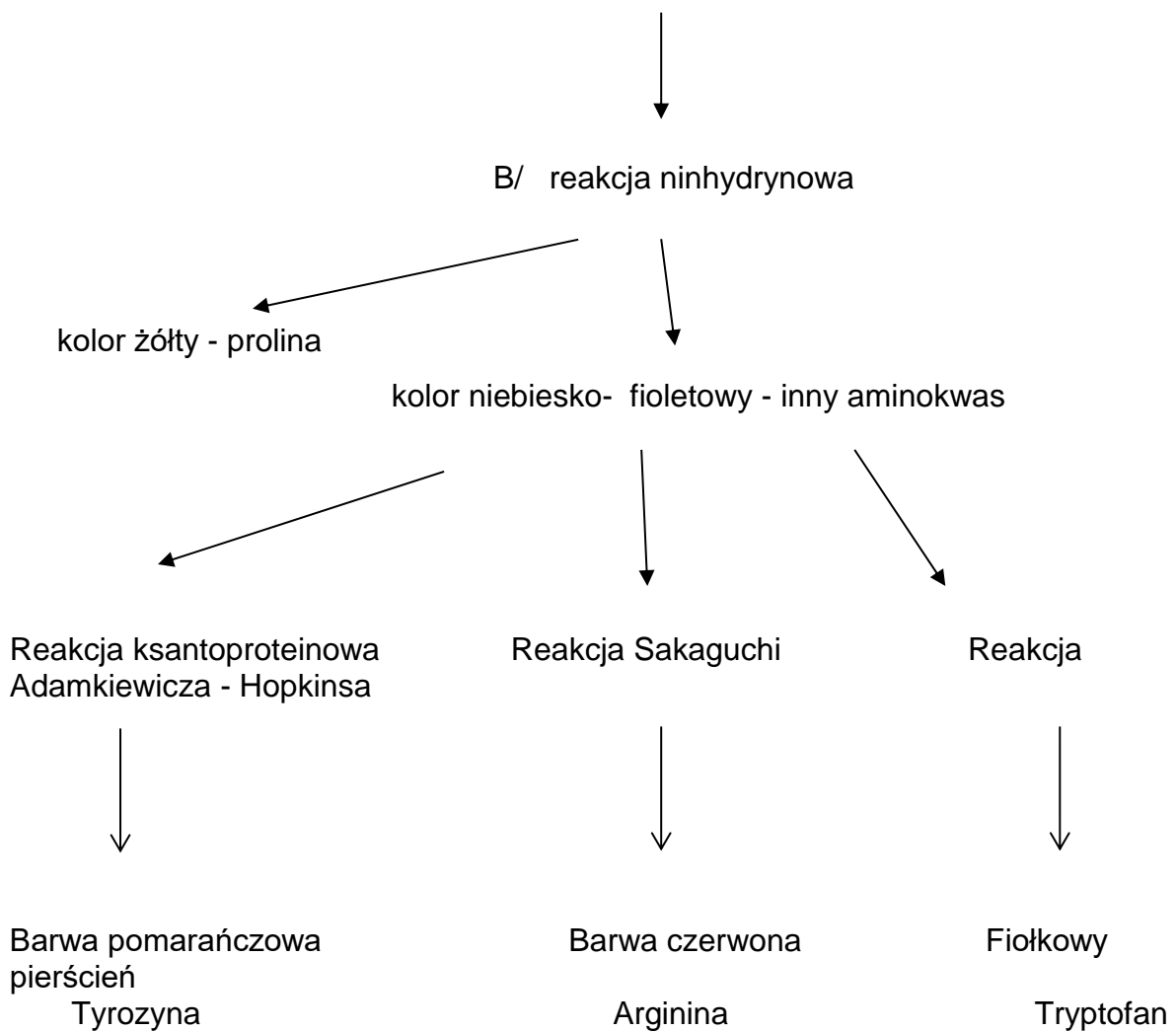
- r-ry wzorcowe aminokwasów i białka
- r-ry badane aminokwasów
- odczynniki dotychczas używane przy reakcjach charakterystycznych

Wykonanie:

Wykorzystując dotychczasowe odczynniki i znane reakcje należy zidentyfikować poszczególne aminokwasy w próbach badanych

### Wykrywanie aminokwasu

A/ reakcja z kwasem azotowym – wydzielanie pęcherzyków – obecność grup aminowej



## **ĆWICZENIE 3. Białka - struktura, właściwości i funkcje.**

### **Zadanie 1. Wykrywanie białek – reakcja biuretowa**

Odczynniki:

- 10% r-r NaOH
- 1% r-r CuSO<sub>4</sub>
- mocznik krystaliczny *in subst.*
- 0,5% r-r glicyny
- 0,5% r-r glicylo-glicyny
- 3% r-r białka jaja kurzego

Wykonanie:

#### **1/ Reakcja biuretowa Piotrowskiego (na wiązania peptydowe)**

Do próbki odmierzyć 1 ml r-ru glicyny, dodać 1 ml 10% NaOH i 4-5 kropli 1% CuSO<sub>4</sub>. Unikać nadmiaru r-ru CuSO<sub>4</sub>. Reakcja jest dodatnia, gdy pojawi się czerwono-fioletowe zabarwienie.

#### **2/ Reakcja biuretowa peptydu i białka**

Do osobnych probówek odmierzyć po 1 ml roztworów: glicylo-glicyny i białka jaja kurzego, dodać po 1 ml 10% NaOH i 4-5 kropli 1% r-ru CuSO<sub>4</sub>. Zaobserwować wynik w obu probówkach.

#### **3/ Odczyn biuretowy mocznika**

Nad małym płomieniem gazowym stopić w suchej próbce kilka kryształków mocznika. Stopiony mocznik po pewnym czasie krzepnie. Po ostudzeniu próbki otrzymany biuret rozpuścić w 1 ml 10% NaOH i dodać 4-5 kropli 1% r-ru CuSO<sub>4</sub>.

### **Zadanie 2. Wykazanie amfoterycznego charakteru białek**

Odczynniki:

- 1% r-r żelatyny
- woda dest.
- r-r błękitu tymolowego (wskaźnik)
- 0,1 M r-r NaOH
- 0,1 M r-r HCl

Wykonanie:

Do dwóch probówek wlać po 5 ml wody dest. i 1 kroplę błękitu tymolowego. Następnie:

- a. do pierwszej próbki dodać kroplami 0,1 M r-ru NaOH, aż do uzyskania zabarwienia lekko niebieskiego (pH 9,6),
- b. do drugiej próbki dodać 0,1 M r-r HCl, aż do uzyskania zabarwienia lekko czerwonego (pH 1,3). Unikać nadmiaru odczynników.

Do obu probówek wkraplać ostrożnie roztwór albuminy, aż płyn stanie się lekko żółty (pH 2,8-8,0).

### **Zadanie 3. Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazeiny**

*Odczynniki:*

- 0,5% r-r kazeiny w 0,1 M octanie sodu
- 1 M r-r  $\text{CH}_3\text{COOH}$

*Wykonanie:*

Przygotować 9 suchych probówek o poj. 15 ml. Do pierwszej odmierzyć 3,2 ml kwasu octowego i 6,8 ml wody dest., zawartość dobrze wymieszać. Do następnych 8 probówek odmierzyć 5 ml wody dest. Po dokładnym wymieszaniu zawartości w probówce 1 przenieść z niej 5 ml r-ru do drugiej probówki, a z tej po wymieszaniu, 5 ml przenieść do 3-ej itd., aż do 9-tej, z której po wymieszaniu 5 ml r-ru należy wylać, (aby po wykonaniu wszystkich rozcieńczeń objętość roztworów była jednakowa).

Wykonanie pomiaru

Do wszystkich probówek z przygotowanymi roztworami kwasu octowego dodać po 1 ml r-ru kazeiny, dobrze wymieszać i odstawić na 30 min.

Po upływie 30 min. odnotować:

- a. stopień zmętnienia r-ru w każdej probówce ( -, +, ++, +++ - różne stopnie zmętnienia),
- b. wartość pH poszczególnych r-rów - pobrać r-r z probówki i nakropić na papierek wskaźnikowy,
- c. wartość pHi kazeiny.

## **ĆWICZENIE 4. Wysalanie i denaturacja białek. Metody separacji białek.**

### **Zadanie 1. Filtracja żelowa**

*Odczynniki:*

- Sephadex G-50
- Roztwór badany (błękit dekstrynowy 2000, mioglobina, chromian potasu) w 0,9% NaCl.
- Roztwór eluujący (0,9% NaCl).

*Wykonanie:*

Nanoszenie próby na kolumnę: na powierzchnię żelu nanieść 1 ml próby badanej i pozwolić wsiąknąć próbce pod ciśnieniem grawitacyjnym w górną warstwę żelu.

Po naniesieniu próby badanej na kolumnę połączyć kolumnę ze zbiornikiem zawierającym eluent (0,9% NaCl) i prowadzić elucję z szybkością ok. 2 ml/min., zbierając do kolejnych probówek frakcje po 4 ml. Kontynuować zbieranie frakcji aż do pełnego wyeluwowania ostatniego składnika r-ru badanego.

Regeneracja kolumny: po ukończeniu frakcjonowania kolumnę przygotować do następnych rozdzielów, przepuszczając przez nią eluent w ilości odpowiadającej 2-3-krotnej objętości całkowitej kolumny.

## **Zadanie 2. Denaturacja białek**

Odczynniki:

- 1% r-r białka
- stęż.  $\text{HNO}_3$
- stęż.  $\text{HCl}$
- stęż.  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 96% etanol
- 1% r-r (wodny)  $\text{FeCl}_3$
- 1% r-r  $\text{CuSO}_4$
- 1%  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
- 10% r-r TCA
- 5% r-r  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- nasycony r-r kwasu pikrynowego
- 0,1 M r-r  $\text{AgNO}_3$

Wykonanie:

### 1/ Denaturacja cieplna białek

2 ml r-ru białka ogrzać w probówce do wrzenia, tworzy się biały osad wytrąconego białka.

### 2/ Denaturacja białka stężonymi kwasami nieorganicznymi

#### a. Stężonym $\text{HNO}_3$ (próba Hellera)

Do probówki odmierzyć 2 ml stęż.  $\text{HNO}_3$  i ostrożnie po ściance probówki dodawać kroplami r-r białka jaja kurzego. Białko powinno nawarstwiać się na roztwór kwasu. Na granicy zetknięcia się obu cieczy powstaje pierścień zdenaturowanego białka.

#### b. Stężonym $\text{HCl}$ i $\text{H}_2\text{SO}_4$

Do 2 probówek dodać po 1 ml r-ru białka jaja kurzego. Następnie wlewać po ściance:

- do pierwszej 1 ml stęż.  $\text{HCl}$
- do drugiej 1 ml stęż.  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Na podstawie przeprowadzonych prób porównać, w której probówce następuje wytrącanie osadu. Do probówki zawierającej r-r białka i stęż.  $\text{HCl}$  dodać kolejne 3 ml stęż.  $\text{HCl}$  i zaobserwować wynik.

### 3/ Denaturacja białka etanolem

Do 2 probówek zawierających po 2 ml etanolu dodać po 0,5 ml roztworu białka. Zawartość pierwszej probówki rozcieńczyć wodą dest. do 10 ml i wytrząsnąć.

### 4/ Strącanie białka za pomocą anionów

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. 2 ml r-ru białka jaja kurzego i 2 ml 10% r-r TCA,
- b. 2 ml r-ru białka jaja kurzego i 0,5 ml 5% r-ru  $\text{CH}_3\text{COOH}$  oraz 2 ml nasyconego r-ru kwasu pikrynowego.

Wymieszać. Zaobserwować wynik. Dodatni wynik reakcji to: wytrącenie się osadu, zmętnienie lub powstanie białego pierścienia.

### 5/ Strącanie białka za pomocą kationów



Do 2 probówek zawierających po 1 ml roztworu białka i 4-5 kropli 1M NaOH:

- a. do 1 ml roztworu białka dodać 4-5 kropli 0,1 M r-ru  $\text{AgNO}_3$
- b. do 1 ml r-ru białka dodać 4-5 kropli 1%  $\text{FeCl}_3$
- c. do 1 ml r-ru białka dodać 4-5 kropli 1%  $\text{CuSO}_4$
- d. do 1 ml r-ru białka dodać 4-5 kropli 1%  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

Wymieszać. Zaobserwować wynik. Dodatni wynik reakcji to: wytrącenie się osadu, zmętnienie lub powstanie białego pierścienia.

### **Zadanie3. Wysalanie białek siarczanem amonu**

Odczynniki:

- 1% r-r żelatyny
- 1% r-r albuminy
- 1% r-r globuliny
- 1% r-r jaja kurzego
- nasyc. r-r siarczanu amonu
- woda dest.

Wykonanie:

Do 12 probówek oznaczonych numerami od I-XII odmierzyć odpowiednie odczynniki zgodnie z tabelą:

<b>Numer próbówki</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>	<b>XI</b>	<b>XII</b>
<b>Odczynnik (w ml)</b>												
Żelatyna	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Albumina	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
Globulina	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-
Białko jaja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
Woda	4	1,5	-	4	1,5	-	4	1,5	-	4	1,5	-
Nasycony siarczan amonu	-	2,5	4	-	2,5	4	-	2,5	4	-	2,5	4

Zmętnienie świadczy o wysalaniu się białka.

„+” - występuje osad wysolonego białka,

„-” - brak osadu.

## **ĆWICZENIE 5. Metody ilościowego oznaczania białek.**

### **Zadanie 1. Oznaczanie ilościowe białka metodą biuretową**

Odczynniki:

- wzorcowy roztwór albuminy w 0,9% NaCl (10 mg/ml)

- odczynnik biuretowy

*Wykonanie:*

Do suchych próbek odmierzyć kolejno podane w tabeli objętości wzorcowego roztworu albuminy, wody i odczynnika biuretowego.

Nr próby	I	II	III	IV	V	VI – próba ślepa	VII – próba badana
Roztwór wzorowy (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0	0
Woda destylowana (ml)	0,4	0,3	0,2	0,1	0	0,5	0
Odczynnik biuretowy (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Próba badana (ml)	0	0	0	0	0	0	0,5

Po upływie 30 min. zmierzyć absorbancję przy  $\lambda=540$  nm względem próby ślepej (VI). Wykreślić krzywą wzorcową – zależność absorbancji od stężenia (próby I-V). Oznaczyć zawartość białka w próbce badanej (VII).

## **Zadanie 2. Oznaczanie ilościowe białka metodą Lowry'ego**

*Odczynniki:*

- wzorcowy roztwór albuminy w 0,9% NaCl (100  $\mu\text{g/ml}$ )
- odczynnik Folina - Cioalteau

*Wykonanie:*

Do suchych próbek odmierzyć kolejno podane w tabeli objętości wzorcowego roztworu albuminy, wody i odczynnika Folina - Cioalteau.

Nr próby	I	II	III	IV	V	VI	VII – próba ślepa	VIII – próba badana
Roztwór wzorowy (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0	0
Woda destylowana (ml)	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	2	0
Odczynnik Lowry'ego (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Próba badana (ml)	0	0	0	0	0	0	0	0,2

Po upływie 10 min. zmierzyć absorbancję przy  $\lambda=750$  nm względem próby ślepej (VII). Wykreślić krzywą wzorcową – zależność absorbancji od stężenia (próby I-VI). Oznaczyć zawartość białka w próbce badanej (VIII).

## **ĆWICZENIE 6. Cukry proste – struktura, właściwości, funkcje**

### **Zadanie 1. Reakcja z odbarwioną fuksyną (próba Schiffa)**

*Odczynniki:*

- 0,01% r-r fuksyny
- formalina
- 1% r-r glukozy
- r-r kwaśnego siarczynu sodu - NaHSO<sub>3</sub>

*Wykonanie:*

Do 2 ml r-ru fuksyny dodawać NaHSO<sub>3</sub> aż do odbarwienia. Odbarwiony roztwór podzielić na 2 części: do jednej z nich dodać 4-5 kropli formaliny, a do drugiej – 4-5 kropli r-ru glukozy.

### **Zadanie 2. Próby redukcyjne cukrów**

#### *a. Próba Fehlinga*

*Odczynniki:*

- 1% r-r glukozy
- odczynnik Fehlinga I i II

*Wykonanie:*

Do 1 ml r-ru glukozy dodać po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II i zagotować. Wytrąca się czerwony osad.

#### *b. Próba Benedicta*

*Odczynniki:*

- 1% r-r glukozy
- odczynnik Benedicta

*Wykonanie:*

Do 1,5 ml odczynnika Benedicta dodać 3 krople r-ru glukozy, probówkę wstawić na 5 min. do łaźni wrzącej. W zależności od stężenia cukru roztwór może przyjmować zabarwienie zielone lub wytrąca się osad w kolorze od żółtego aż do czerwono-brązowego.

#### *c. Próba z odczynnikiem Nylandera*

*Odczynniki:*

- 1% r-r glukozy
- odczynnik Nylandera

*Wykonanie:*

Do 2 ml r-ru glukozy dodać kilka kropli odczynnika Nylandera, wstawić do wrzącej łaźni na 10 min. Roztwór żółknie, brunatnieje i w końcu staje się czarny od wydzielającego się metalicznego bizmutu.

**d. Próba z kwasem pikrynowym**

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- nasycony r-r kwasu pikrynowego
- 10% r-r NaOH

Wykonanie:

Do 1 ml r-ru glukozy dodać 2 ml r-ru kwasu pikrynowego i 0,5 ml 10% NaOH. Podgrzewać przez 5 min. Roztwór przyjmuje zabarwienie ciemno czerwone.

**e. Próba Tollensa**

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- amoniakalny r-r wodorotlenku srebra -  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{OH}$

Wykonanie:

Do 2 ml amoniakalnego r-ru wodorotlenku srebra dodać 2 ml r-ru glukozy. Po zmieszaniu wstawić do wrzącej łaźni wodnej. Po kilku min. na ściankach próbówki wydziela się metaliczne srebro.

**Zadanie 3. Reakcje barwne cukrów odwodnionych pod działaniem kwasów z pochodnymi fenolowymi**

**a. Próba Molischa z  $\alpha$ -naftolem**

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- odczynnik Molischa
- stęż.  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Wykonanie:

Do 1 ml r-ru glukozy dodać 1-2 krople odczynnika Molischa, wymieszać. Ostrożnie po ściance próbówki wprowadzić 1 ml stęż.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  tak, aby była widoczna granica między cieczami. W miejscu zetknięcia się obu cieczy powstaje czerwono-fioletowy pierścień. Powstały poniżej zielony pierścień pochodzi od zanieczyszczeń  $\alpha$ -naftolu.

**b. Próba Seliwanowa z rezorcyną (odróżnianie ketoz od aldoz)**

Odczynniki:

- 1% r-r fruktozy
- 1% r-r glukozy
- r-r HCl (rozcieńczonego wodą dest. w stosunku 1:1)
- rezorcyna in subst.

Wykonanie:

Przygotować 2 próbówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-r glukozy
- b. do drugiej 1 ml 1% r-r fruktozy

Do każdej probówki dodać 2 ml r-ru HCl oraz kryształek rezorcyny. Po zmieszaniu wstawić do wrzącej łaźni na 30 sek. Porównać wyniki reakcji w obu probówkach.

*c. Próba Tollensa z floroglucyną (odróżnianie pentoz od heksoz)*

*Odczynniki:*

- 1% r-r rybozy
- 1% r-r glukozy
- stęż. HCl
- floroglucyna in subst.

*Wykonanie:*

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-r glukozy
- b. do drugiej 1 ml 1% r-r rybozy

Do każdej dodać 2 ml stęż. HCl i kryształek floroglucyny. Ogrzać do wrzenia. Porównać wyniki reakcji w obu probówkach.

*d. Próba Biała z orcyną (odróżnianie pentoz od heksoz)*

*Odczynniki:*

- 1% r-r rybozy
- 1% r-r glukozy
- stęż. HCl
- orcyna in subst.
- 1% r-r FeCl<sub>3</sub>

*Wykonanie:*

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-r glukozy
- b. do drugiej 1 ml 1% r-r rybozy

Do każdej dodać 1 ml stęż. HCl, szczyptę orcyny i kroplę FeCl<sub>3</sub>. Ogrzać do wrzenia. Porównać wyniki reakcji w obu probówkach.

## **ĆWICZENIE 7. Dwucukry – struktura, właściwości, funkcje**

### **Zadanie 1. Fermentacja alkoholowa**

*Odczynniki:*

- 1% r-ry cukrów: glukozy, fruktozy, laktozy, sacharozy
- drożdże piekarskie

*Wykonanie:*

Kawałek drożdży rozetrzeć w zlewce z 30 ml r-ru cukru. Zawiesiną napęlnić naczynie fermentacyjne w taki sposób, aby ramię zamknięte nie zawierało pęcherzyków powietrza. Następnie naczynie fermentacyjne umieścić w cieplarni na okres 2 godz. w temp. 37°C. Równocześnie nastawić próbę kontrolną, zawierającą kawałek drożdży rozartych z wodą dest. Obserwować wydzielanie się pęcherzyków CO<sub>2</sub>.

### **Zadanie 2. Otrzymywanie osazonów**

*Odczynniki:*

- 1% r-r glukozy
- 1% r-r fruktozy
- 2,5% r-r laktozy
- 5% r-r maltozy
- r-r fenylohydrazyny

*Wykonanie:*

Do 4 probówek odmierzyć po 1 ml świeżo sporządzonego r-ru fenylohydrazyny, a następnie dodać kolejno roztwory poszczególnych cukrów (po 2,5 ml). Zawartość probówek dokładnie wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni na około 60 min. Po wyjęciu z łaźni ostudzić. Osad kryształków osazonów przenieść na szkiełko podstawowe, przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obejrzyć pod mikroskopem.

### **Zadanie 3. Próba Fehlinga**

*Odczynniki:*

- 1% r-r laktozy
- odczynnik Fehlinga I i II

*Wykonanie:*

Do 1 ml r-ru laktozy dodać po 1 ml r-rów odczynnika Fehlinga I i II. Ogrzać do wrzenia. Wytrąca się ceglasty osad Cu<sub>2</sub>O.

### **Zadanie 4. Próba z kwasem pikrynowym**

Odczynniki:

- 1% r-r laktozy
- nasycony r-r kwasu pikrynowego
- 10% r-r NaOH

Wykonanie:

Do 1 ml r-ru laktozy dodać 2 ml r-ru kwasu pikrynowego i 0,5 ml 10% NaOH. Podgrzewać przez 5 min. Roztwór przyjmuje zabarwienie ciemno czerwone.

### **Zadanie 5. Próba Fehlinga**

#### *a. Wykazanie braku własności redukujących sacharozy*

Odczynniki:

- 1% r-r sacharozy
- odczynnik Fehlinga I i II

Wykonanie:

Do probówki wprowadzić 1 ml r-ru sacharozy, a następnie po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II. Ogrzać do wrzenia. Płyn nie zmienia barwy.

#### *b. Wykazanie własności redukujących sacharozy po hydrolizie kwaśnej*

Odczynniki:

- 1% r-r sacharozy
- stęż. r-r HCl
- 10% r-r NaOH
- odczynnik Fehlinga I i II

Wykonanie:

Do 2 ml sacharozy dodać 0,5 ml stęż. HCl, a następnie ogrzać do wrzenia i gotować przez kilka minut. Próbę ostudzić i w celu neutralizacji dodać 0,5 ml 10% NaOH. Z próby pobrać 1 ml zawartości do innej probówki i dodać po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II. Ogrzać do wrzenia. Wytrąca się osad  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

### **Zadanie 6. Próba Barfoeda - odróżnianie jednocukrów od dwucukrów redukujących**

Odczynniki:

- 1% r-r glukozy
- 5% r-r laktozy
- odczynnik Barfoeda

Wykonanie:

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- a. do pierwszej 1 ml 1% r-r glukozy
- b. do drugiej 1 ml 5% r-r laktozy

Do każdej probówki dodać 1 ml odczynnika Barfoeda. Po wymieszaniu wstawić na 3 min. do wrzącej łaźni. Po oziębieniu i odczytaniu wyniku wstawić probówkę z ujemną próbą na dalsze 15 min. do wrzącej łaźni.

Glukoza łatwo wykazuje własności redukujące, natomiast laktoza po dłuższym ogrzewaniu - gdy zostanie rozerwane wiązanie glikozydowe.

## **ĆWICZENIE 8. Wielocukry – struktura, właściwości, funkcje**

### **Zadanie 1. Próba z jodem**

*Odczynniki:*

- 1% r-r kleiku skrobiowego
- odczynnik Lugola (J<sub>2</sub> w KJ)

*Wykonanie:*

Do 1 ml kleiku skrobiowego dodać kroplę odczynnika Lugola. Roztwór przybiera ciemno niebieskie zabarwienie, które znika po ogrzaniu probówki do wrzenia. Po oziębieniu - zabarwienie powraca.

### **Zadanie 2. Wysalanie skrobi**

*Odczynniki:*

- 1% r-r kleiku skrobiowego
- nasycony r-r siarczanu amonu

*Wykonanie:*

Do 2ml r-ru kleiku dodać 2 ml siarczanu amonu. Po wymieszaniu pozostawić na 30 min. Po 10 min. pojawia się zmętnienie, a w dalszym etapie z roztworu wytrąca się osad skrobi.

### **Zadanie 3. Własności redukcyjne skrobi przed i po hydrolizie**

*Odczynniki:*

- 1% r-r kleiku skrobiowego
- odczynnik Fehlinga I i II
- stęż. HCl
- 2M r-r NaOH

*Wykonanie:*

Do dwóch probówek odmierzyć po 1 ml kleiku skrobiowego.

- a. do pierwszej probówki dodać po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II. Ogrzać do wrzenia.
- b. do drugiej probówki dodać 3 krople stęż. HCl gotować przez 1 min. Po ochłodzeniu próbę zalkalizować 2M NaOH i dodać po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II. Zagotować.



Porównać próby.

- I probówka - brak zmiany barwy.
- II probówka - wytrąca się ceglasty osad  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

#### **Zadanie 4. Enzymatyczna hydroliza skrobi**

*Odczynniki:*

- 1% r-r kleiku skrobiowego
- ślina jako źródło amylazy
- odczynnik Fehlinga I i II
- odczynnik Lugola

*Wykonanie:*

Do 3 ml kleiku skrobiowego dodać 1 ml śliny. Wymieszać. Probówkę odstawić na 5 min. Po upływie tego czasu zawartość probówki rozdzielić na dwie części.

- a. w pierwszej probówce wykonać reakcję z odczynnikami Fehlinga I i II,
- b. w drugiej - reakcję z odczynnikiem Lugola.

I probówka - reakcja słabo dodatnia - wytrąca się osad  $\text{Cu}_2\text{O}$

II probówka - zabarwienie brązowo czerwone od obecności dekstryn.

#### **Zadanie 5. Rozpuszczalność celulozy**

*Odczynniki:*

- bibuła filtracyjna
- odczynnik Cross-Bewana

*Wykonanie:*

Kawałek bibuły filtracyjnej zalać 1-2 ml odczynnika Cross-Bewana, wymieszać na vortexie. Odstawić na ok. 30 min. Ponownie wymieszać na vortexie, a następnie wytrącić przez dodanie równej objętości wody dest.

#### **Zadanie 6. Hydroliza celulozy**

*Odczynniki:*

- wata
- stęż.  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 2M r-r NaOH
- odczynnik Fehlinga I i II

*Wykonanie:*

Kawałek waty zalać w probówce 5 ml wody dest. i 1 ml stęż.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 30 min. Pobrać 1 ml z tego roztworu, zobojętnić 1,5 ml 2M r-rem NaOH, a następnie dodać po 1 ml odczynnika Fehlinga I i II. Zagotować. Wytrąca się osad  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

### **Zadanie 7. Odróżnianie bibuły od papieru gazetowego**

Odczynniki:

- bibuła
- papier gazetowy
- 2% etanolowy r-r floroglucyny
- stęż. HCl

Wykonanie:

Kawałek papieru gazetowego (zawierającego polimery pentoz) i kawałek bibuły zwilżyć kroplą 2% etanolowego r-r floroglucyny i kroplą stęż. HCl. Papier zabarwia się na wiśniowo, reakcja z bibułą daje wynik ujemny.

## **ĆWICZENIE 9. Identyfikacja nieznanego cukru**

### **Zadanie 1. Próba z jodem**

Odczynniki:

- 1% r-r kleiku skrobiowego
- odczynnik Lugola (J<sub>2</sub> w KJ)

Wykonanie oznaczenia

Pobrać próbę nieznanego węglowodanu.

1. Przeprowadzić próbę Molischa, aby uzyskać pewność, że otrzymana próbka do analizy zawiera węglowodan.
2. Przeprowadzić próbę z I<sub>2</sub>(jod w jodku potasu ), aby stwierdzić ewentualną obecność polisacharydów w otrzymanej próbce.
3. Wykonać wszystkie podane w tabeli specyficzne próby na węglowodany. Wynik zanotować w tabeli.

Próba Molischa	
Próba z jodem	
próba Benedicta	
Próba Barfoeda	
Próba Tollensa	
Próba Seliwanowa	

Odpowiedź na pytanie: Jaki węglowodan znajdował się w badanej próbce?

## **ĆWICZENIE 10. Enzymy – izolowanie inwertazy z drożdży**

### **Zadanie 1. Izolowanie inwertazy z drożdży**

#### *Odczynniki:*

- drożdże
- celit (ziemia krzemkowa)
- toluen
- aceton

#### *Wykonanie:*

2,5 g drożdży rozetrzeć w ochłodzonym moździerzu porcelanowym z ziemią krzemkową

(ok. 1,5 g). Następnie dodać porcjami 5 ml toluenu. Rozcierać do uzyskania konsystencji kremu. Nie przerywając rozcierania, dodać do zawiesiny małymi porcjami 10 ml wody destylowanej. Mieszaninę pozostawić w łaźni lodowej na 20-30 min. (mieszając od czasu do czasu), a następnie odwirować osad (10 min. x 3000 obr/min.). Pobrać ostrożnie płyn znajdujący się pomiędzy górną warstwą tłuszczu a osadem (środkowa warstwa) do małej zlewki, porcję 3 ml ochłodzić w łaźni lodowej i powoli, mieszając ciągle dodać małymi porcjami 10 ml acetonu (ochłodzonego do -20°C). Pozostawić mieszaninę na 15 min. w łaźni z lodem, a następnie odwirować osad wytrąconego białka (10 min. x 3000 obr/min.). Zlać płyn z nad osadu, a osad białka rozpuścić w 2,5 ml wody destylowanej (dodawać małymi porcjami!). Preparat przechowywać zamrożony w -20°C.

## **ĆWICZENIE 11. Enzymy – wyznaczenie optymalnego stężenia inwertazy**

### **Zadanie 1. Wykreślanie krzywej wzorcowej**

Odczynniki:

- 5 mM r-r wzorcowy glukoza-fruktoza (5  $\mu$ moli cukrów/ml)
- 0,1 M bufor octanowy o pH 4,7
- Roztwór roboczy DNS

Wykonanie:

Przygotowanie krzywej wzorcowej:

Do 7 suchych probówek odmierzyć kolejno podane w tabeli objętości:

<b>Nr próby</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII – próba ślepa</b>
Roztwór wzorcowy (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0
Bufor octanowy (ml)	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	1,0
Odczynnik DNS (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
<b>Stężenie r-ru wzorcowego (<math>\mu</math>mol cukrów/ml)</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>	<b>1,5</b>	<b>2,0</b>	<b>2,5</b>	<b>3,0</b>	0

1. Próby dokładnie wymieszać i ogrzewać wszystkie równocześnie przez 10 min. we wrzącej łaźni wodnej.
2. Ochłodzić pod bieżącą wodą do temperatury pokojowej i dokonać odczytu wartości absorbancji przy długości fali 540 nm, wobec próby ślepej.
3. Wykreślić na papierze milimetrowym krzywą zależności absorbancji od stężenia cukrów (glukoza-fruktoza).

### **Zadanie 2. Badanie wpływu różnych stężeń inwertazy na szybkość hydrolizy sacharozy**

Odczynniki:

- podstawowy roztwór enzymu,
- 0,1 M bufor octanowy o pH 4,7
- Roztwór roboczy DNS – przed rozpoczęciem oznaczeń rozcieńczyć 3-krotnie roztwór podstawowy DNS 0,4 M NaOH (50 ml odcz. plus 100ml 0,4 M NaOH)
- 0,2 M r-r sacharozy w buforze octan. o pH 4,7

Wykonanie:

Wyznaczenie optymalnego stężenia enzymu (takie stężenie enzymu, przy którym wydajność reakcji będzie największa).

1. Podstawowy roztwór enzymu rozcieńczyć odpowiednio w oddzielnych probówkach (rozcieńczenie zależne od aktywności roztworu podstawowego enzymu):. n p. 1000x, 2000x, 3000x i 4000 razy.
2. Przygotować po 5 probówek dla każdego rozcieńczenia, w celu oznaczenia szybkości reakcji katalizowanej przez różne stężenia enzymu.
3. Do 5-ciu probówek napipetować po 2 ml odczynnika DNS
4. W probówce nr 6 przygotować mieszaninę inkubacyjną – 3 ml odpowiednio rozcieńczonego enzymu z 3 ml 0,2 M sacharozy (dla każdego rozcieńczenia zgodnie z tabelką). Dokładnie wymieszać - **po dodaniu 1-szego ml rozpoczyna się reakcja enzymatyczna!**

<b>Skład mieszaniny inkubacyjnej</b>	<b>3 ml <u>odpowiednio rozcieńczonego</u></b> <b>enzymu</b> <b>+</b> <b>3 ml 0,2 M sacharozy</b>
--------------------------------------	---

5. Inkubację sacharozy z różnymi stężeniami enzymu przeprowadzić w temperaturze pokojowej.
6. Po 5-tej minucie od rozpoczęcia reakcji enzymatycznej pobrać 1 ml mieszaniny inkubacyjnej do probówki zawierającej 2 ml DNS.
7. Następnie po upływie odpowiednio: 10, 15 i 20 min. pobierać 1 ml mieszaniny inkubacyjnej do uprzednio przygotowanych probówek z odczynnikami.
8. Po wykonaniu oznaczeń w probówkach I – IV, wykonać **próbę ślepą (probówka nr V) oddzielnie**: do probówki z 2 ml DNS dodać 0,5 ml 0,2 M sacharozy i 0,5 ml buforu octanowego.

Nr probówki	I	II	III	IV	V
Czas inkubacji (min.)	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>ślepa</b>
Odczynnik DNS (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Mieszanina inkubacyjna (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	-
0,2 M sacharoza (ml)	-	-	-	-	0,5
Bufor octanowy (ml)	-	-	-	-	0,5

9. Wszystkie probówki (I-V) dokładnie wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 10 min.
10. Ochłodzić próby pod bieżącą wodą i dokonać odczytu absorbancji przy długości fali  $\lambda=540$  nm wobec próby ślepej.
11. Z krzywej wzorcowej odczytać ilość mg cukrów powstających w poszczególnych czasach hydrolizy.

## ĆWICZENIE 12. Enzymy – wyznaczenie stałej Michaelisa

### Zadanie 1. Wyznaczanie stałej Michaelisa

#### Odczynniki:

- r-r enzymu o optymalnym stężeniu,
- 0,1 M bufor octanowy o pH 4,7
- Roztwór roboczy DNS – przed rozpoczęciem oznaczeń rozcieńczyć 3-krotnie roztwór podstawowy DNS 0,4 M NaOH (50 ml odcz. plus 100ml 0,4 M NaOH)
- 0,2 M r-r sacharozy w buforze octan. o pH 4,7

#### Wykonanie:

1. Wykonać cztery stężenia sacharozy: 0,2 M; 0,1 M, 0,05 M; 0,025 M (w buforze octanowym o pH 4,7).
2. Dla każdej serii oznaczeń przygotować po 3 probówki.
3. Do probówek napipetować po 2 ml odczynnika DNS
4. W probówce nr 4 przygotować **mieszaninę inkubacyjną** – 2 ml odpowiednio rozcieńczonej sacharozy z 2 ml enzymu o optymalnym stężeniu (wyznaczonym w ćwiczeniu nr 2). Dokładnie wymieszać. **Po dodaniu 1-szego ml enzymu rozpoczyna się reakcja enzymatyczna.**

<b>Skład mieszaniny inkubacyjnej</b>	2 ml enzymu + 2 ml <b>0,025 M</b> sacharozy	2 ml enzymu + 2 ml <b>0,05 M</b> sacharozy	2 ml enzymu + 2 ml <b>0,1 M</b> sacharozy	2 ml enzymu + 2 ml <b>0,2 M</b> sacharozy
<b>Ostateczne stężenie substratu w mieszaninie</b>	<b>0,0125 M</b>	<b>0,025 M</b>	<b>0,05 M</b>	<b>0,1 M</b>

5. Inkubację różnych stężeń sacharozy z odpowiednio rozcieńczonym enzymem przeprowadzić w temperaturze pokojowej.
6. Po 5-tej minucie od rozpoczęcia reakcji enzymatycznej pobrać 1 ml mieszaniny inkubacyjnej do probówki zawierającej 2 ml DNS.
7. Następnie po upływie 10 min. ponownie pobrać 1 ml mieszaniny inkubacyjnej do probówki zawierającej 2 ml DNS.
8. Po wykonaniu oznaczeń w probówkach I – IV, wykonać **próbę ślełą (probówka nr III) oddzielnie**: do probówki z 2 ml DNS dodać 0,5 ml odpowiednio rozcieńczonej sacharozy i 0,5 ml buforu octanowego.

Nr próbówki	I	II	III
Czas inkubacji (min.)	5	10	ślepa
Odczynnik DNS (ml)	2,0	2,0	2,0
Mieszanka inkubacyjna (ml)	1,0	1,0	-
Rozcieńczona sacharoza (ml)	-	-	0,5
Bufor octanowy (ml)			0,5

9. Wszystkie próbówki (I-III) dokładnie wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 10 min.
10. Ochłodzić próby pod bieżącą wodą i dokonać odczytu absorbancji przy długości fali  $\lambda=540$  nm wobec próby ślepej.
11. Z krzywej wzorcowej odczytać ilość  $\mu$ oli cukrów powstających w poszczególnych czasach hydrolizy.

#### Obliczenia:

1. Dla każdego stężenia sacharozy wykreślić zależności ilości powstałych heksoz (w  $\mu$ molach/ml od czasu inkubacji).
2. Wyznaczyć szybkości początkowe reakcji ( $V_0$ ). Miarą szybkości początkowej jest tangens kąta utworzonego między styczną do początkowych części krzywej, a osią odciętych (optymalny czas dla wyznaczania szybkości początk. - 5 min.). Szybkość początk. wyrazić w  $\mu$ M/min.
3. Wyznaczyć zależności szybkości początkowych od stężenia substratu:
  - oznaczyć  $V_{max}$
  - odczytać wartość stałej Michaelisa.
4. Sporządzić wykres Lineweavera-Burka. Na osi rzędnych odłożyć wartości  $1/V_0$ , a na osi odciętych wartość  $1/s$ . Powstała prosta przecina oś X w punkcie  $-1/K_m$ .

## ĆWICZENIE 13. Witaminy

### Zadanie 1. Wykonanie krzywej wzorcowej

Odczynniki:

- odczynnik Folina – Ciocalteau (10x rozcieńczony),
- wzorcowy r-r kwasu askorbinowego (100 µg/ml)

Wykonanie:

Do suchych próbek odmierzyć kolejno podane w tabeli objętości wzorcowego roztworu kwasu askorbinowego, wody i odczynnika Folina – Ciocalteau.

Nr próby	I	II	III	IV	V	VI	VII – próba ślepa
Roztwór wzorowy (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0
Woda destylowana (ml)	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	2
Odczynnik Folina – Ciocalteau (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Wszystkie próbki wymieszać i po upływie 10 min. zmierzyć absorbancję przy  $\lambda=750$  nm względem próby ślepej (VII). Wykreślić krzywą wzorcową – zależność absorbancji od stężenia (próby I-VI).

### Zadanie 2. Oznaczenie stężenia witaminy C w materiale biologicznym

Odczynniki:

- odczynnik Folina – Ciocalteau (10x rozcieńczony),
- wzorcowy r-r kwasu askorbinowego (100 µg/ml)
- 10% TCA
- sok z cytryny i/lub sok z kiszanej kapusty

Wykonanie:

Do 0,5 ml soku z cytryny (lub soku z kiszanej kapusty) dodać 1 ml 10% TCA. Próby energicznie wymieszać i wstawić na 5 min. do lodu. Wytrącony osad odwirować (10 min. x 3000 rpm). Do oznaczeń pobrać 0,5 ml klarownego roztworu znad osadu. Objętość prób uzupełnić wodą destylowaną do 2 ml i do każdej dodać po 0,2 ml odczynnika Folina. Wykonać próbę ślepa: 0,5 ml 10% TCA + 1,5 ml wody destylowanej + 0,2 ml odczynnika Folina. Próby wymieszać i po upływie 10 min. zmierzyć absorbancję przy  $\lambda=750$  nm względem próby ślepej. Obliczyć zawartość kwasu askorbinowego w próbce badanej (uwzględnić rozcieńczenie badanego materiału w trakcie odbiałczania TCA – 12 razy).



### **Zadanie 3. Wykrywanie witaminy A.**

*Odczynniki:*

- odczynnik Carra-Price'a (nasycony roztwór chlorku antymonu (III) w chloroformie),
- r-r witaminy A
- chloroform
- stęż.  $\text{H}_2\text{SO}_4$

*Wykonanie:*

Do suchej probówki wlać około 2 ml odczynnika Carra-Price'a i dodać 1 kroplę r-ru witaminy A.

Zaobserwować wynik.

### **Zadanie 4. Wykrywanie witaminy E.**

*Odczynniki:*

- etanolowy r-r wit. E,
- stęż.  $\text{HNO}_3$

*Wykonanie:*

Do 2 ml roztworu etanolowego badanej substancji dodać 0,5 ml stężonego  $\text{HNO}_3$ . Gotować 3 min w łaźni wodnej. Zaobserwować wynik.

### **Zadanie 5. Wykrywanie witaminy D.**

*Odczynniki:*

- r-r wit. D,
- chloroform,
- stęż.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,
- bezwodnik octowy,
- stęż.  $\text{HCl}$ ,

*Wykonanie:*

Do probówki odmierzyć 0,1 ml r-ru wit. D oraz 1 ml chloroformu. Wymieszać i dodać 0,1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  oraz 0,1 ml bezwodnika octowego. Kolejny raz wymieszać.

Zaobserwować wynik.

### **Zadanie 6. Wykrywanie witamin A i D w tranie.**

*Odczynniki:*

- tran,
- chloroform,
- odczynnik Carra-Price'a.

*Wykonanie:*

Do próbki nr 1 pobrać 1 ml tranu i dodać 5 ml chloroformu. Zatkać korkiem i całość energicznie wytrząsać przez 2 min.

Następnie do próbki nr 2 pobrać 2 ml r-ru z próbki nr 1 i dodać 1 ml odczynnika Carra-Price'a. Wstawić do wrzącej łaźni wodnej na ok 2 min. Zaobserwować zabarwienie w próbce.

## **ĆWICZENIE 14. Kwasy nukleinowe - izolacja**

### **Zadanie 1. Izolowanie RNA z drożdży**

#### *Odczynniki:*

- drożdże
- 20% r-r kwasu TCA ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ )
- aceton
- eter
- 96% etanol
- 10% r-r NaCl

#### *Wykonanie:*

1. Odważyć 2g drożdży piekarskich do probówki wirowniczej o poj. około 12 ml, dodać 3 ml wody dest. i wymieszać bagietką w celu otrzymania zawiesiny. Probówkę wstawić do łaźni lodowej.
2. Po upływie kilku minut dodać 6 ml 20% TCA oziębionego do około 0°C. Zawartość probówki starannie wymieszać bagietką i po upływie 10 min. wirować przy 3000 ob/min. przez 5 min. Płyn nad osadu (supernatant) zawierający kwasorozpuszczalne związki odrzucić (zlać), a probówkę z osadem ponownie umieścić w łaźni lodowej.
3. Celem odmycia  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  oraz związków lipidowych do osadu dodać 8 ml acetonu (uprzednio oziębionego), wymieszać bagietką i po upływie 5 min. odwirować przy 2000 ob/min. przez ok. 5 min. Supernatant odrzucić, a osad ponownie przemyć 8 ml mieszaniny acetonu i eteru (1:1) i odstawić na 15 min. w temperaturze pokojowej. Następnie odwirować przez 10 min. przy 3000 ob/min.
4. Supernatant odrzucić a osad osuszyć w strumieniu ciepłego powietrza. Do wysuszonego osadu dodać 3 ml 1,4 M NaCl i wymieszać starannie bagietką. Probówkę zamknąć korkiem z chłodniczką powietrzną i umieścić we wrzącej łaźni wodnej na ok. 40 min.
5. Po zakończonej ekstrakcji probówkę ochłodzić, a następnie odwirować przy 3000 ob/min przez 5 min.
6. Supernatant, zawierający kwasy nukleinowe, przelać do plastikowej probówki z korkiem i wstawić do zlewki z lodem na 5 min. Następnie dodać 7 ml oziębionego etanolu w celu wytrącenia RNA. Zawartość probówki dokładnie wymieszać i pozostawić na 15 min. w temp. ok. 0°C. Po tym czasie odwirować przy 3000 ob/min. przez 10 min.
7. Supernatant odrzucić, a osad rozpuścić w 10 ml wody dest. i przechować w lodówce do następnego ćwiczenia.

## ĆWICZENIE 15. Kwasy nukleinowe – struktura, właściwości, funkcje

### Zadanie 2. Oznaczanie RNA z drożdży na podstawie zawartości rybozy.

Odczynniki:

- wzorcowy r-r RNA (300 µg/ml)
- 6% alkoholowy r-r orcyny
- 10% r-r FeCl<sub>3</sub> w stęż. HCl

Wykonanie:

Próby przygotować wg tabeli:

Nr próbówki	I	II	III (próba ślepa)
FeCl <sub>3</sub> (ml)	1	1	1
R-r orcyny (ml)	0,4	0,4	0,4
Woda (ml)	0	0	1
R-r wzorcowy (ml)	1	0	0
R-r badany (ml)	0	1	0

Po wymieszaniu, próbówki wstawić do łaźni wrzącej na 20 min., następnie schłodzić i do każdej z nich dodać po 5 ml wody dest. Absorbancję prób mierzyć przy dł. fali λ=610 nm, wobec próby ślepej (nr 3):

a. Wyliczyć zawartość RNA w próbce badanej (nr 2) ze wzoru:

$$\frac{A_{wz}}{C_{wz}} = \frac{A_x}{C_x}$$

$$C_x = \frac{A_x}{A} \times C_{wz}$$

A<sub>wz</sub> - absorbancja r-ru wzorcowego

C<sub>wz</sub> - stężenie r-ru wzorcowego w µg/ml

A<sub>x</sub> - absorbancja r-ru badanego

C<sub>x</sub> - stężenie r-ru badanego w µg/ml

b. Wyliczyć ilość RNA (X) znajdująca się w objętości r-ru (V) na podstawie oznaczenia rybozy (pamiętać o pomnożeniu wyniku przez rozcieńczenie!).

### **Zadanie 3. Rozpuszczalność kwasów nukleinowych.**

*Odczynniki:*

- r-r RNA
- 1M r-r HCl
- 1M r-r NaOH
- 96% etanol (silnie schłodzony)!

*Wykonanie:*

- do 1 ml r-ru RNA dodać kroplami 1M HCl aż do wytrącenia się osadu kwasu nukleinowego. Po dodaniu r-ru NaOH osad ulega rozpuszczeniu.
- do 1 ml r-ru RNA dodać 2 ml etanolu. Wytrąca się osad.

### **Zadanie 4. Tworzenie kompleksów z barwnikami**

*Odczynniki:*

- r-r RNA
- 0,1M r-r CH<sub>3</sub>COOH
- 0,1% r-r błękitu metyl.

*Wykonanie:*

Do 1 ml r-ru RNA dodać 0,5 ml 0,1M CH<sub>3</sub>COOH, aż do wystąpienia lekkiego zmętnienia. Następnie dodać kroplę błękitu metylowego. Wytrząsać energicznie przez kilka minut. Na ściankach probówki wytrąca się niebieski osad.

### **Zadanie 5. Odróżnianie DNA od RNA**

*Odczynniki:*

- 0,1% r-ry RNA i DNA
- 10% r-r FeCl<sub>3</sub> w stęż. HCl
- 6% r-r orcyny w etanolu
- r-r dwufenyloaminy w kwasie octowym

*Wykonanie:*

#### a/ wykrywanie RNA

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- do pierwszej 1 ml 0,1% r-ru RNA
- do drugiej 1 ml 0,1% r-ru DNA

Do obu probówek dodać po 1 ml r-ru FeCl<sub>3</sub> i 0,4 ml r-ru 6% orcyny. Probówki umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 20 min.

W probówce zawierającej RNA powstaje zielone zabarwienie. DNA daje ok. 10-krotnie słabszy odczyn.

#### b/ wykrywanie DNA

Przygotować 2 probówki, do których należy odmierzyć:

- do pierwszej 1 ml 0,1% r-ru RNA
- do drugiej 1 ml 0,1% r-ru DNA

Następnie do obu probówek dodać 2 ml r-ru dwufenyloaminy. Probówki umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 10 min.

W probówce zawierającej DNA powstaje niebieskie zabarwienie. Barwny kompleks z dwufenyloaminą daje dezoksyryboza.

### **Zadanie 6. Kwaśna hydroliza RNA**

*Odczynniki:*

- r-r RNA
- 72% HClO<sub>4</sub>
- stęż. HCl
- stęż. HNO<sub>3</sub>
- amoniak
- 5% r-r molibdenianu amonu
- amoniakalny r-r AgOH
- 1% r-r CuSO<sub>4</sub>
- r-r kwaśnego siarczynu sodu
- floroglucyna *in subst.*

*Wykonanie:*

2 ml r-ru RNA ogrzewać z 2 ml HClO<sub>4</sub> we wrzącej łaźni wodnej przez 45 min. Uzyskany hydrolizat służy do dalszych prób.

#### a/ wykrywanie pentozy (Biała)

Do 1 ml hydrolizatu RNA dodać 1 ml stęż. HCl, szczyptę orcyny i kroplę FeCl<sub>3</sub>. Ogrzać do wrzenia. Porównać wyniki reakcji w obu probówkach.

#### b/ wykrywanie kwasu fosforowego

0,5 ml hydrolizatu RNA zobojętnić 10-15 kroplami r-em amoniaku, następnie dodać 0,5 ml stęż. HNO<sub>3</sub> i 2 ml 5% r-ru molibdenianu amonu. Zawartość probówki ogrzać do wrzenia. Wytrąca się żółty osad fosfomolibdenianu.

#### c1/ wykrywanie zasad azotowych (puryn)

Do 1 ml hydrolizatu RNA dodać kroplami amoniak (do słabo alkalicznego odczynu). Jeżeli wystąpi zmiętnienie – przesączyć. Następnie dodać 3 ml amoniakalnego r-ru AgOH. Wytrąca się osad nierozpuszczalnych w amoniaku soli srebrnych puryn.

#### c2/ wykrywanie zasad azotowych (puryn)

Do 1 ml hydrolizatu RNA dodać kroplami 1M NaOH (do słabo kwasowego odczynu). R-r zagotować a następnie dodać 4-6 kropli 1% r-ru CuSO<sub>4</sub> i kroplami r-r kwaśnego siarczynu sodu. Wytrąca się osad nierozpuszczalnych soli miedziawych puryn.

### **Zadanie 7. Spektrometria kwasów nukleinowych - widma absorpcyjne**

*Odczynniki:*

- zasady: adenina, guanina, cytozyna, uracyl, 0,1% r-ry DNA i RNA

## **ĆWICZENIE 16. Tłuszczowce – struktura, właściwości, funkcje**

### **Zadanie 1. Zmydlanie tłuszczów – otrzymywanie mydła**

Odczynniki:

- olej
- 30% NaOH
- 96% etanol

Wykonanie:

Do parowniczkę porcelanową dodać 1,5 ml oleju, 2,5 ml 30% NaOH i 1,5 ml etanolu. Podgrzewając łagodnie mieszać przez kilka minut, aż wytworzy się mydło. Następnie dodać ok. 50 ml wody i mieszać tak długo (cały czas podgrzewając), aż otrzymane mydło rozpuści się zupełnie. Uzyskane mydło ostudzić i zachować do dalszych doświadczeń.

### **Zadanie 2. Wysalanie mydła**

Odczynniki:

- r-r mydła
- NaCl *in subst.*

Wykonanie:

Do 1 ml r-ru mydła dodać kilka kryształków NaCl, aż do nasycenia roztworu. Wytrąca się osad mydła solonego. Do osadu dodać wody dest., aż do rozpuszczenia się osadu.

### **Zadanie 3. Otrzymywanie mydła nierozpuszczalnego**

Odczynniki:

- r-r mydła
- 1% r-r BaCl<sub>2</sub>
- 1% r-r CaCl<sub>2</sub>
- 1% r-r Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>

Wykonanie:

Do trzech probówek zawierających po 1 ml r-ru mydła dodać odpowiednio: 1 ml BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> i Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>. Wytrącają się osady. Do osadów dodać wody dest. Zaobserwować wynik.

### **Zadanie 4. Wydzielanie wolnych kwasów tłuszczowych**

Odczynniki:

- r-r mydła
- stęż. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- papierki wskaźnikowe

*Wykonanie:*

Do 5 ml r-ru mydła dodać 4-5 kropli stęż.  $H_2SO_4$ . Roztwór mętnieje z powodu wydzielania się wolnych kwasów tłuszczowych nierozpuszczalnych w wodzie. Mieszaninę ogrzać do wrzenia. Kwasy tłuszczowe zbierają się na powierzchni płynu, a po oziębieniu zastygają tworząc na niej cienką warstwę.

#### **Zadanie 5. Wykrywanie glicerolu – próba akroleinowa**

*Odczynniki:*

- olej
- glicerol
- kwaśny siarczan potasu *in subst.*-  $KHSO_4$
- skrawek bibuły
- amoniakalny r-r  $AgOH$

*Wykonanie:*

Przygotować 2 probówki:

- a. do pierwszej dodać 5 kropli oleju
- b. do drugiej - 5 kropli glicerolu (kontrola)

Do obu probówek dodać szczyptę kryst.  $KHSO_4$ . U wylotu probówek umieścić zwilżony amoniakalnym r-r'em  $AgOH$  skrawek bibuły. Obie probówki kolejno ogrzewać nad palnikiem.

#### **Zadanie 6. Rozpuszczalność tłuszczowców**

*Odczynniki:*

- woda dest.
- 96% etanol
- chloroform
- aceton
- olej

*Wykonanie:*

Do poszczególnych probówek zawierających po kilka kropli oleju dodać odpowiednio po 1 ml odpowiednich rozpuszczalników.

#### **Zadanie 7. Próba Kreisa na jełczenie aldehydowe**

*Odczynniki:*

- olej świeży
- olej zjełczały
- stęż.  $HCl$
- 0,1% r-r rezorcyny w benzenie

*Wykonanie:*

Przygotować 2 plastikowe probówki z korkiem, do których odmierzyć:

- a. do pierwszej 2 ml świeżego oleju
- b. do drugiej 2 ml oleju zjełczałego.



Do obu probówek dodać po 2 ml stęż. HCl i wytrząsać w ciągu minuty. Następnie dodać 2 ml r-ru rezorcyny w benzenie, wstrząsnąć i pozostawić do rozdzielania się warstw. Czerwone zabarwienie warstwy kwasowej wskazuje na obecność aldehydów.

### **Zadanie 8. Wykrywanie glicerolu – reakcja z wodorotlenkiem miedziowym**

*Odczynniki:*

- glicerol
- woda dest.
- 10% NaOH
- 7% r-r CuSO<sub>4</sub>

*Wykonanie:*

Przygotować dwie probówki. Do każdej z nich odmierzyć po 1 ml 7% roztworu CuSO<sub>4</sub> i 1 ml 10% roztworu NaOH. Wytrąci się osad Cu(OH)<sub>2</sub>. Następnie do pierwszej probówki dodać 1 ml glicerolu a do drugiej 1 ml wody destylowanej. Zaobserwować wynik.

### **Zadanie 9. Utlenianie wiązania podwójnego**

*Odczynniki:*

- olej
- woda dest.
- 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 0,01M KMnO<sub>4</sub>

*Wykonanie:*

Przygotować dwie probówki. Do pierwszej probówki odmierzyć 0,5 ml oleju, do drugiej 0,5 ml wody destylowanej, a następnie do każdej dodać 3 ml 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> w celu zalkalizowania środowiska. Probówki ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez ok. 1 min. Do każdej dodać 1 kroplę 0,01 M KMnO<sub>4</sub>. Zamieszać. Zaobserwować zmianę zabarwienia.

## **ĆWICZENIE 17. Cholesterol – struktura, właściwości, funkcje**

### **Zadanie 1. Wykrywanie cholesterolu – próba Salkowskiego**

*Odczynniki:*

- 0,2% chloroformowy r-r cholesterolu
- olej świeży
- stęż.  $H_2SO_4$

*Wykonanie:*

Przygotować 2 probówki, do których odmierzyć:

- a. do pierwszej 0,5 ml świeżego oleju
- b. do drugiej 0,5 ml 0,2% chloroformowego r-r cholesterolu

Obie podwarstwić 0,5 ml stęż.  $H_2SO_4$ . Czerwona barwa świadczy o obecności cholesterolu.

### **Zadanie 2. Wykrywanie cholesterolu – próba Liebermanna - Burcharda**

*Odczynniki:*

- 0,2% chloroformowy r-r cholesterolu
- olej świeży
- bezwodnik kwasu octowego
- stęż.  $H_2SO_4$

*Wykonanie:*

Przygotować 2 probówki, do których odmierzyć:

- a. do pierwszej 0,5 ml świeżego oleju
- b. do drugiej 0,5 ml 0,2% chloroformowego r-r cholesterolu

Do obu probówek dodać 0,5 ml bezwodnika kwasu octowego i po ściankach probówek 2 krople stęż.  $H_2SO_4$ . Wymieszać. Pojawiająca się czerwona barwa przechodzi w niebieską a następnie w zieloną.

### **Zadanie 3. Oznaczanie całkowitego cholesterolu metodą Ilcy'ego**

*Odczynniki:*

- r-r wzorcowy cholesterolu (2 mg/ml) – (proszek rozpuszczamy w chloroformie i dodajemy etanol)
- mieszanina chloroform/etanol (1:9)
- odczynnik wywołujący barwę
- r-r badany (ok. 1 mg/ml)

**Wykonanie:**

Do suchych próbek odmierzyć kolejno podane w tabeli objętości wzorcowego roztworu cholesterolu, mieszaniny chloroform/etanol i odczynnika wywołującego barwę.

<b>Nr próby</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI – próba ślepa</b>	<b>VII – próba badana</b>
Roztwór wzorowy (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0	0
Mieszanina chloroform/etanol (ml)	0,4	0,3	0,2	0,1	0	0,5	0
Odczynnik wywołujący barwę (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Próba badana (ml)	0	0	0	0	0	0	0,5

Wszystkie próbki wymieszać i po upływie 10 min. zmierzyć absorbancję przy  $\lambda=660$  nm względem próby ślepej (VI). Wykreślić krzywą wzorcową – zależność absorbancji od stężenia (próby I-V). Oznaczyć zawartość cholesterolu w próbce badanej (VII).