

## Zagadnienia do kolokwium I:

1. wyznaczanie masy cząsteczkowej i składu aminokwasowego
2. Metody oznaczania C-końcowego aminokwasu
3. Metody wyznaczania N-końcowego aminokwasu
4. Degradacja Edmanna
5. Chemiczne metody selektywnego rozszczepienia łańcucha polipeptydowego
6. Zastosowanie enzymów w analizie sekwencyjnej
7. Fizykochemiczne metody wyznaczania sekwencji peptydów
8. Metody chromatograficzne analizy i oczyszczania białek
  - chromatografia jonowymienna
  - chromatografia podziałowa
  - chromatografia absorpcyjna
  - chromatografia z wykorzystaniem sit molekularnych
  - automatyzacja procesu chromatografii cieczowej - HPLC (schemat aparatury, stosowane wypełnienia, detektory)

## Zagadnienia do kolokwium II :

1. Grupy ochronne (budowa, wprowadzanie do cząsteczki, usuwanie)
  - zabezpieczanie grupy  $\alpha$  aminowej (grupy benzyloksykarbonylowa, t-butylloksykarbonylowa, fluorenylometoksykarbonylowa)
  - grupy zabezpieczające grupę  $\alpha$  karboksylową
  - blokowanie wybranych łańcuchów bocznych (Lys, Glu, Asp, Thr, Ser)
  - ortogonalne grupy blokujące
2. Metody tworzenia wiązania peptydowego
  - metoda karboimidowa
  - metoda estrów aktywnych
  - metoda bezwodników mieszanych
  - zastosowane soli uroniowych w syntezie peptydów
  - racemizacja w syntezie peptydów
3. Synteza na nośniku stałym
  - porównanie wad i zalet syntezy w roztworze i na nośniku stałym
  - najczęściej spotykane metody syntezy peptydów na nośniku stałym („strategia Boc” i „strategia Fmoc”)
  - przykłady najczęściej stosowanych żywic (żywica Merrifielda i Wanga)
4. Znajomość reakcji wykorzystywanych w przeprowadzonym ćwiczeniu.

## LITERATURA

- „Aminowasy, Peptydy Białka” Jakubke
- notatki z wykładu z chemii organicznej
- dodatkowe informacje na stronie [http://www.chempep.com/ChemPep\\_Resource.htm](http://www.chempep.com/ChemPep_Resource.htm)
- Ćwiczenia z Biochemi Kłyszewko-Stefanowicz

# 1.

## Modyfikacja chemiczna białka – acetylacja cytochromu C

### Materiały:

- Cytochrom C (z serca konia) – 10 mg
- bezwodnik octowy (10% roztwór w acetonitrylu)
- kwas octowy
- bufor octanowy ( $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$ )
- Sephadex G-25

### Przygotowanie kolumny chromatograficznej:

Do wypełnienia kolumny wykorzystujemy zawiesinę Sephadexu G-25, dostarczona przez osobę prowadząca ćwiczenie. Zawiesina jest przygotowana 24 h przed rozpoczęciem ćwiczeń, by żel całkowicie spęczniał. W kolumnie chromatograficznej umieszczamy zwitek waty, następnie wlewamy zawiesinę do kolumny. W celu ustabilizowania złoża w kolumnie, kolumnę przemywamy 0.1% roztworem kwasu octowego. Na szczycie złoża Sephadexu umieścić krążek bibuły (zapobiega to mieszanii żelu podczas nanoszenia próbki).

### Wykonanie ćwiczenia:

W fiolce umieszczonej w zlewce z lodem umieszczamy roztwór cytochromu C (10 mg cytochromu C w 1ml 1M buforu octanowego) oraz wskazaną przez prowadzącego ilość roztworu bezwodnika kwasu octowego (5; 10; 20 i 30  $\mu\text{l}$ ). Reakcję acetylowania prowadzimy w 4°C przez godzinę, a następnie наносimy zawartość fiolki na przygotowaną kolumnę chromatograficzną i wmywamy 0.1% roztworem kwasu octowego. Frakcję zawierającą acetylowane cytochromy zbieramy do osobnego naczynia i zachowujemy do pomiarów MS. **NIE WOLNO DOPUŚCIĆ DO ZAPOWIETRZENIA KOLUMNY!!!!** Widmo MS pokaże zawartość form cytochromu C o różnym stopniu acetylacji. Na podstawie widma należy wyznaczyć ilość zacetylowanych grup aminowych w cytochromie C. Porównując wyniki poszczególnych grup ćwiczeniowych należy sporządzić wykres zależności stopnia acylowania cytochromu od stężenia bezwodnika octowego.

### Dane:

$M$  cytochromu C z serca końskiego 12361 g/mol

$M$  Ac<sub>2</sub>O 102.09 g/mol

$d$  Ac<sub>2</sub>O 1.08 g/cm<sup>3</sup>

### W sprawozdaniu podaj :

- objętości wszystkich zebranych frakcji oraz wymagane obliczenia
- średnią ilość zacetylowanych grup aminowych w cytochromie obliczoną na podstawie widm MS:

$$\text{średnia ilość grup Ac} = \frac{\sum \text{liczba grup Ac} * I}{\sum I}$$

- wykres zależności stopnia acylowania cytochromu od stężenia bezwodnika octowego.

## 2.

### Elementy analizy peptydów

- Odczynniki:
- HCl 6N 10ml
- roztwór ninhydryny
- roztwory wzorców aminokwasów
- roztwory wzorców DNP-pochodnych aminokwasów
- eluenty E1 i E2
- acetonowy roztwór DNB
- stały węglan sodowy
- płytki do TLC (3/8 cm)
- eter etylowy 70 ml
- E1: n-butanol:kwas octowy:woda (4:1:1)
- E2: chloroform:kwas octowy (10:1)
- Aceton

#### Sprzęt:

- ampułki 2
- szkiełko zegarkowe 2
- komory chromatograficzne 2
- palnik gazowy
- pipety Pasteura 2
- kolbka stożkowa (25 ml)
- rozdzielacz

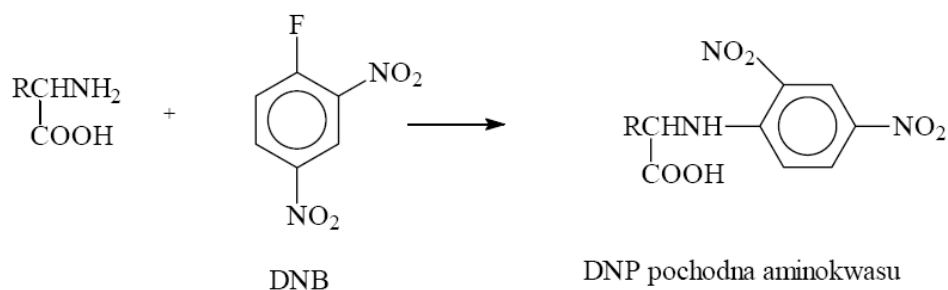
### 1. Wyznaczanie składu aminokwasowego.

Otrzymaną próbkę peptydu (ok. 5 mg) rozpuścić w 2 ml 6N HCl. Uzyskany roztwór należy zatopić w ampułce szklanej i umieścić w suszarce nastawionej na 100° C na ok. 24 h. Po ostudzeniu ampulkę otworzyć, zawartość odparować do sucha na szkiełku zegarkowym ogrzewanym na łaźni wodnej. Suchą pozostałość należy rozpuścić w 1 ml wody destylowanej. Otrzymany roztwór nanieść na płytkę do chromatografii cienkowarstwowej. Na pozostałe tory płytki nanieść wzorcowe roztwory aminokwasów. Rozwijać w eluencie E1. Obliczyć wartości  $R_f$  dla wzorców i aminokwasów będących składnikami peptydu. Jakie aminokwasy wchodzi w skład badanego peptydu?

### 2. Oznaczanie N-końcowego aminokwasu

Próbkę peptydu (ok. 20 mg) rozpuścić w 5 ml wody. Do otrzymanego roztworu dodać 200 mg węglanu sodowego, a następnie po ogrzaniu do 40°C wkropić roztwór 20 mg DNB w 0.5 ml acetonu. Roztwór wstrząsać przez ok. 30 min. w temperaturze 40-50°C. Nieprzereagowany DNB

wyekstrahować eterem. Po dodaniu ok. 0.5 ml stęż. HCl przeprowadzić ponowną ekstrakcję eterem (4 razy po 10 ml). Ekstrakty eterowe zawierające DNP pochodną peptydu odparować na łaźni wodnej, następnie pozostałość przenieść do ampułki i dodać 3 ml HCl i po zatopieniu prowadzić hydrolizę przez ok. 24 h w suszarce nastawionej na 100°C. Po otwarciu ampułki zawartość rozcieńczyć pięciokrotnie wodą i poddać ekstrakcji eterem (4 razy po 5 ml). Po odparowaniu eteru na łaźni wodnej pozostałość rozpuścić w 1 ml acetonu, nanieść na płytkę do chromatografii cienkowarstwowej. Na pozostałe tory płytki nanieść wzorcowe roztwory pochodnych DNP aminokwasów. Rozwijać w eluencie E2. Obliczyć wartości R<sub>f</sub> dla wzorców i próbki. Określić N-końcowy aminokwas w badanym peptydzie.



**W sprawozdaniu podaj :**

- współczynniki R<sub>f</sub> substancji wzorcowych produktów hydrolizy peptydu oraz pochodnej DNP
- zidentyfikuj aminokwasy wchodzące w skład peptydu i N-końcowy aminokwas
- określ sekwencję dipeptydu.
- zapisz zachodzące reakcje chemiczne i wzory strukturalne stosowanych odczynników.

### 3.

#### Synteza na nośniku stałym tripeptydu Phe-Lys-Gly

**Materiały:** (ilość na 2 grupy 12 osobowe )

Fmoc-Phe-OH	480 mg w 12 ml DMF
Fmoc-Lys(Boc)-OH	792mg w 12 ml DMF
Żywica Wanga obsadzona Fmoc-Gly-OH (0.86)	12x 20 mg
TCTU	438 mg w 12 ml DMF 2x
Dizopropylloetyloamina (DIEA)	240 $\mu$ l w 12 ml DMF 2x
25% roztwór piperydyny w DMF	
DMF	
Metanol	

#### Sprzęt

- 12 reaktorków strzykawkowych 3 ml
- jednorazowe pipetki do przenoszenia objętości 0.5 ml
- 12 naczyń na zlewki
- 12 zlewek na DMF
- 12 zlewek na metanol
- 12 zlewek na roztwór piperydyny
- mieszadło

#### Wykonanie

2. umieść 20 mg żywicy w strzykawce, dodaj 1 ml DMF i mieszaj przez 15 min do spęcznienia żywicy.
3. po usunięciu DMF ze strzykawki dodaj 25% roztwór piperydyny w DMF. Mieszaj przez 7 min. Po usunięciu piperydyny ze strzykawki dodaj ponownie 25% roztwór piperydyny w DMF i mieszaj przez 7 min.
4. Po usunięciu piperydyny ze strzykawki przemyj żywicę 5 razy DMF, za każdym razem mieszając przez minutę.
5. Przygotuj mieszaninę roztworów Fmoc-Lys(Boc)-OH, TCTU, i DIEA, (po 0,5 ml każdego z dostarczonych roztworów) i pozostaw na 3 min do aktywacji odczynnika. Przygotowaną mieszaninę dodaj do strzykawki zawierającej żywicę, mieszaj przez godzinę.
6. Po zakończeniu sprzęgania przemyj żywicę 5 razy (jak w punkcie 3)
7. Odblokuj grupę aminową za pomocą piperydyny ( jak w punkcie 2)
8. przemyj 5 razy DMF

9. Przygotuj mieszaninę roztworów Fmoc-Phe-OH, TCTU, i DIEA, (po 0,5 ml każdego z dostarczonych roztworów) i pozostaw na 3 min do aktywacji odczynnika. Przygotowaną mieszaninę dodaj do strzykawki zawierającej żywicę, mieszaj przez godzinę.
10. Po zakończeniu sprzęgania przemyj żywicę 5 razy (jak w punkcie 3)
11. Odblokuj grupę aminową za pomocą piperydyny ( jak w punkcie 2)
12. Przemyj żywicę 5 razy DMF i 5 razy metanolem. Przemytą żywicę wysusz w próżni.
13. otrzymany peptyd usuń z żywicy za pomocą TFA (kwasu trifluorooctowego) z dodatkiem 5% wody. Czas trwania reakcji 1.5 h. Po oddzieleniu roztworu peptydu w TFA od żywicy kwas trifluoroctowy odparuj w strumieniu gazowego azotu w zważonej fiołce. Na podstawie przyrosty masy fiołki oblicz wydajność syntezy. Załóż, że peptyd tworzy sól z 2 cząsteczkami TFA. Jednorodność otrzymanego peptydu skontroluj za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (płytką pokryta SiO<sub>2</sub>, eluent n-butanol:kwas octowy : woda 4:1:1., chromatogram wywołaj roztworem ninhydryny w acetonie.
14. Próbkę otrzymanego peptydu zachowaj aby przeprowadzić dalsze eksperymenty dotyczące padania specyficzności proteaz .

**W sprawozdaniu podaj :**

- **reakcje chemiczne i wzory strukturalne stosowanych odczynników**
- **oblicz nadmiar pochodnych aminokwasowych w stosunku do obsadzenia żywicy, przyjmij, że obsadzenie żywicy wynosiło 0.86 10<sup>-3</sup> równoważnika na gram.**
- **oblicz współczynnik R<sub>f</sub> i oceń czystość peptydu na podstawie analizy chromatograficznej**
- **podaj obliczoną wydajność syntezy.**

Wzory chemiczne i masy cząsteczkowe reagentów sprawdź w katalogu NovaBiochem.

# 4.

## Badanie specyficzności proteaz

### Materiały:

peptyd1: LEDGRTLSDY  
peptyd2: IFPLMLVF  
nasycony roztwór  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$   
trypsyna  
chymotrypsyna  
papierki wskaźnikowe

### Sprzęt:

- probówki eppendorfa
- pipetki

### Wykonanie

1. Próbkę każdego peptydu (1mg) rozpuścić w 1 ml wody jakości HPLC.
2. Przygotować roztwór enzymu (1mg/ml wody).
3. Doprowadzić pH roztworu każdego peptydu do wartości ok. 8 za pomocą nasyconego roztw.  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
4. Z roztworu wyjściowego każdego z peptydów pobrać 300 $\mu\text{l}$  i umieścić w osobnych eppendorfach.
5. Do pobranej ilości roztworu pierwszego peptydu dodać 30  $\mu\text{l}$  wodnego roztworu trypsyny, do drugiej - 30  $\mu\text{l}$  wodnego roztworu chymotrypsyny.
6. Roztwory pozostawić w temperaturze pokojowej.
7. Po 30 min i 60 min pobrać 100  $\mu\text{l}$  każdego z roztworów. Dodać 5 $\mu\text{l}$  TFA. Podpisane próbki dać prowadzącemu zajęcia w celu wykonania pomiarów MS.

### W sprawozdaniu:

- **Podaj krótki opis przeprowadzonych czynności**
- **Zapisz schemat reakcji hydrolizy enzymatycznej**
- **Na podstawie analizy widm MS zidentyfikuj otrzymane produkty**
- **Porównaj wynik reakcji z przewidzianym w oparciu o znajomość specyficzności stosowanych enzymów (porównanie obliczonych i eksperymentalnych mas monizotopowych fragmentów peptydowych).**

## 5.

**PEG- masa cząsteczkowa na podstawie oznaczenia grup końcowych,**

**Biureta**

**Kolby stożkowe 2**

**Próbka PEG**

**Mianowany roztwór NaOH (0.1N)**

**Fenoloftaleina**

Otrzymany oligomer glikolu polietylenowego zawiera jako grupy końcowe grupy karboksylowe (COOH). W tym ćwiczeniu oznaczysz średnią masę cząsteczkową polimeru oznaczając zawartość grup końcowych. Uzyskane wyniki porównaj z danymi otrzymanymi z analizy widma MS badanego polimeru

1. Przygotuj 3 naważki badanej substancji (masa naważki powinna wynosić ok. 500mg)
2. Naważkę polimeru rozpuść w 50 ml wody destylowanej.
3. dodaj fenoloftaleinę i miareczkuj 0,1 N roztworem NaOH do trwałej zmiany barwy. Na podstawie wyniku miareczkowania oblicz równoważnik polimeru, a następnie, zakładając, że jedna cząsteczka zawiera 2 grupy karboksylowe oblicz średnią masę cząsteczkową polimeru.

**W sprawozdaniu podaj :**

- **Wyniki miareczkowań**
- **Konieczne obliczenia**
- **Średnią masę cząsteczkową polimeru**
- **Narysuj wzór strukturalny formy, która dominuje w badanej mieszaninie.**
- **Porównaj otrzymane dane z informacjami otrzymanymi z analizy widm MS i przedyskutuj ewentualne rozbieżności.**



## 6.

### Mikrokapsułki

#### Odczynniki:

- 1% r-r żelatyny w wodzie
- 1% r-r gumy arabskiej w wodzie
- 10% kwas octowy
- 10% NaOH
- Formalina
- 200 mg barwnika Oil blue N w 5 ml parafiny (rozpuszczane na gorąco)

#### Wykonanie ćwiczenia:

1. 150 ml r-ru żelatyny oraz 150 ml r-ru gumy arabskiej umieść w kolbie, dodaj 4 ml r-ru barwnika w parafinie, ogrzewaj w temp. 80°C mieszając przez 30 min.
2. Zakwaś przy pomocy 10% kwasu octowego do pH 4, ochłódź do temp. pokojowej
3. Obniż temperaturę do 5°C za pomocą łązni lodowej, zalkalizuj 10% NaOH do pH 11, mieszaj 30 min.
4. W celu utwardzenia mikrokapsułek dodaj 30 ml formaliny, mieszaj 30 min. bez chłodzenia w temp. pokojowej
5. Zawiesinę przelej do cylindra miarowego w celu rozwarstwienia, warstwę górną oddziel i przemyj wodą. Sprządź preparat mikroskopowy otrzymanych mikrokapsułek.

#### W sprawozdaniu podaj :

- Opis wykonania ćwiczenia
- Opis wyglądu uzyskanych mikrokapsułek.

# 7.

## Identyfikacja tworzyw sztucznych, Depolimeryzacja polistyrenu

### Odczynniki:

- Próbki polimerów
- Polistyren 25g

### Wykonanie ćwiczenia:

1. Na podstawie samodzielnie zebranych informacji przeprowadź identyfikację dostarczonych próbek tworzyw sztucznych i wskaż która jest polistyrenem
2. Zbuduj zestaw do pirolizy, w kolbie umieścić 25 g rozdrobnionego polistyrenu
3. Ogrzewaj kolbę za pomocą płaszczu grzejnego, aż nastąpi rozkład większości polimeru. Produkty depolimeryzacji, głównie styren zostają skroplone w chłodnicy Liebiga.
4. Uzyskany produkt oczyść przez destylację zbierając frakcję wrzącą w zakresie 140-145°C.
5. Oblicz wydajność procesu depolimeryzacji, przygotuj próbkę otrzymanej substancji do analizy spektroskopowej.

### W sprawozdaniu podaj :

- Nazwy dostarczonych próbek polimerów
- Równanie reakcji depolimeryzacji
- Obliczoną wydajność procesu wraz z obliczeniami
- Interpretację widma NMR lub MS otrzymanego produktu reakcji