

2. Analiza aminokwasowa peptydów

1. Hydroliza kwasowa peptydu

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. 6 N wodny roztwór HCl
2. Badany peptyd

Wykonanie doświadczenia:

W małej kolbie okrągłodennej ze szlifem kulkowym rozpuścić 0,5 mg peptydu w 0,4 mL 6 N roztworu HCl, a następnie ją zamknąć. Kolbę ogrzewać przez 24 h w temperaturze 110°C. Następnie otrzymany hydrolizat peptydu zanalizować za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), nanosząc na płytkę oprócz hydrolizatu także wolne aminokwasy.

2. Analiza hydrolizatu peptydowego metodą chromatografii cienkowarstwowej

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. Płytki chromatograficzne (20×20 cm) pokryte 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego
2. Komora chromatograficzna
3. Układ rozwijający: chloroform : etanol (3 : 1; v/v)
4. Hydrolizat peptydowy otrzymany w wyniku przeprowadzenia pkt 1
5. Ciepłarka (105°C)
6. Suszarka do włosów
7. Kapilary
8. Spryskiwacz do płytek chromatograficznych
9. Układ wywołujący:
 - a) wywoływacz ninhydrynowy (50 mL EtOH, 0,1 g ninhydryny, 1 mL kwasu octowego) – świeżo przygotowany, przechowywany w butelce osłoniętej np. folią aluminiową od dostępu światła, po spryskaniu wywołać termicznie
 - b) jod – nasycona parami jodu komora chromatograficzna, szczelnie zamknięta. Wywoływanie poprzez umieszczenie suchej płytki (po rozwinięciu) w komorze z jodem.
10. Standardy aminokwasów: przygotować próbki o objętości 1 mL w probówkach Eppendorfa poprzez rozpuszczenie 1 mg aminokwasu w 1 mL 0,1% HCl

Wykonanie doświadczenia:

Na płytce chromatograficznej (**podczas wszystkich operacji należy unikać dotykania złoza płytki palcami**) (20×20 cm) w odległości 1 cm od brzegu narysować delikatnie miękkim ołówkiem linię, na której co 1,5 cm zaznaczyć punkty. W oznaczonych punktach nanieść kapilarą poszczególne roztwory standardów aminokwasów oraz hydrolizatu peptydowego. Odparować (do sucha) rozpuszczalniki strumieniem zimnego powietrza z suszarki do włosów. Włożyć płytkę do komory chromatograficznej nasyconej parami układu rozwijającego i pozostawić do momentu, gdy czoło układu rozwijającego osiągnie poziom około 2 cm od przeciwległego końca płytki. Po wyjęciu płytki z komory chromatograficznej zaznaczyć ołówkiem poziom czoła układu rozwijającego, a następnie płytkę dokładnie wysuszyć za pomocą suszarki do włosów i wywołać ninhydryną lub w komorze nasyconej parami jodu (**pod włączonym wyciągiem!**). Zaznaczyć delikatnie pojawiające się plamki.

3. Identyfikacja *N*-końcowej reszty aminokwasowej

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. Badany peptyd
2. Aceton
3. 6 N wodny roztwór HCl
4. Chlorek dansylu
5. Cieplarka
6. Nasycony roztwór Na₂CO₃
7. Roztwory dansylowych pochodnych aminokwasów w acetonie (1mg/mL)
8. Probówki zwykłe szklane
9. Płaszcz grzejny
10. Płytki chromatograficzne (20×20 cm) pokryte 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego
11. Komora chromatograficzna
12. Układ rozwijający: chloroform : etanol (2 : 1; v/v)

Wykonanie doświadczenia:

Do 200 µL roztworu peptydu w probówce Eppendorfa dodać 300 µL acetonowego roztworu chlorku dansylu o stężeniu 10 mg/mL. Reakcję prowadzić w temp 65°C w cieplarce przez 20 minut. Następnie do mieszaniny dodać 150 µL nasyconego roztworu Na₂CO₃. Oddzielić warstwę organiczną i odparować za pomocą strumienia azotu rozpuszczalnik z warstwy organicznej. Otrzymany osad peptydu rozpuścić w 0,4 mL 6 N roztworu HCl, a następnie przenieść go do małej kolby okrągłodennej ze szlifem kulkowym. Zamkniętą kolbę ogrzewać w temperaturze 110°C przez 24 godziny. Następnie otrzymany roztwór hydrolizatu przenieść do kolby okrągłodennej i odparować do sucha. Otrzymany osad rozpuścić w 0,5 mL acetonu. Roztwór przesączyć używając pipety Pasteura wypełnionej watą szklaną. Klarowny roztwór hydrolizatu nanieść na płytkę TLC przygotowaną wcześniej według wskazówek prowadzącego ćwiczenia. Jednocześnie sporządzić roztwory acetonowe dansylowych pochodnych aminokwasów o stężeniu 1mg/mL. Do analizy użyć dwóch płytek TLC o wymiarach 20×20 cm. Jako fazę ruchomą zastosować mieszaninę chloroform : etanol w stosunku objętościowym 2 : 1. Jako odnośniki na płytkę nanieść pochodne dansylowe aminokwasów, których obecność potwierdzono w peptydzie oraz roztwór otrzymany w wyniku dansylowania i kwaśnej hydrolizy peptydu. Po wyjęciu płytki z komory chromatograficznej wysuszyć ją za pomocą suszarki do włosów (chłodny strumień powietrza) a następnie umieścić płytkę w świetle lampy UV (λ_{254}) i delikatnie miękkim ołówkiem obrysować pojawiające się plamy. Na podstawie wartości współczynników podziału R_f zidentyfikować *N*-końcową resztę aminokwasową obecną w peptydzie.

Sprawozdanie z ćwiczenia powinien zawierać: wyniki analizy TLC (skład aminokwasowy badanego peptydu), równanie reakcji dansylowania aminokwasu (na dowolnym przykładzie), wyznaczone współczynniki R_f analizowanych pochodnych dansylowych, a na ich podstawie identyfikację *N*-końcowej reszty aminokwasowej.