

### РАБОТА №3 «ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ КАЗЕИНА»

Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы. Агрегации белков в таких растворах препятствуют только гидратные оболочки. Поэтому при значениях рН среды, соответствующих рI белков, под действием дегидратирующих веществ белки могут осаждаться. На этом свойстве основано определение изоэлектрической точки белков. Казеин в изоэлектрической точке в отличие от других белков может осаждаться без действия дегидратирующих веществ.

*Реактивы и оборудование:* 0,2 М ацетат натрия, 0,2 М раствор уксусной кислоты, 1% раствора казеина, пробирки.

*Ход работы:* Используя данные таблицы 1, приготовьте в шести пронумерованных пробирках буферные растворы с разными значениями рН.

№ пробирок	Состав буферной смеси		рН буферной системы
	CH <sub>3</sub> COOH 0,2М	CH <sub>3</sub> COONa 0,2М	
1.	1,9	0,1	3,4
2.	1,8	0,2	3,8
3.	1,4	0,6	4,4
4.	1,0	1,0	4,7
5.	0,6	1,4	5,1
6.	0,2	1,8	5,7

*Таблица 1.* Соотношение компонентов (мл) буферной смеси для определения ИЭТ казеина

Перемешайте содержимое пробирок и в каждую из них добавьте по 1,0 мл 1% раствора казеина. Затем перемешайте содержимое пробирок ещё раз и оставьте их на несколько минут. Затем по максимальной степени помутнения определите изоэлектрическую точку казеина.

*Вывод:* Заполните таблицу, расположенную ниже.

№ пробирок	Состав буферной смеси		рН буферной системы	Степень помутнения раствора казеина
	CH <sub>3</sub> COOH 0,2М	CH <sub>3</sub> COONa 0,2М		
1.	1,9	0,1	3,4	
2.	1,8	0,2	3,8	
3.	1,4	0,6	4,4	
4.	1,0	1,0	4,7	
5.	0,6	1,4	5,1	
6.	0,2	1,8	5,7	

Предположите, какие из 20 аминокислот должны содержаться в бóльшем количестве в белке, чтобы обуславливать такое значение ИЭТ казеина.

#### **РАБОТА №4 «РАЗДЕЛЕНИЕ АЛЬБУМИНОВ И ГЛОБУЛИНОВ ЯИЧНОГО БЕЛКА МЕТОДОМ ВЫСАЛИВАНИЯ»**

Высаливание - это обратимая реакция осаждения белков под действием больших концентраций нейтральных солей ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и др.). При высаливании происходит дегидратация макромолекул белка и устранение заряда. Высаливание является обратимым процессом и после удаления соли (разбавлением водой, диализ) восстанавливается нативная конформация белка и его свойства. На процесс высаливания влияет ряд факторов: гидрофильность белка, его относительная молекулярная масса, заряд. Поэтому для высаливания различных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей. Глобулины осаждаются в полунасыщенном растворе сульфата аммония, а альбумины – в насыщенном растворе сульфата аммония.

*Реактивы и оборудование:* яичный белок, насыщенный раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10%-ый раствор гидроксида натрия, 1%-ый раствор сульфата меди, пробирки, воронки, фильтры.

*Ход работы:* Прилейте к 2 мл яичного белка равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и перемешайте. При этом получается полунасыщенный раствор сульфата аммония, в котором выпадают в осадок глобулины. Отфильтруйте осадок через 5 минут. Полученный осадок перенесите в пробирку, проделайте биуретовую реакцию. Для этого к осадку прибавьте 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1% раствора сульфата меди. В оставшемся фильтрате остаются яичные альбумины. Для высаливания альбуминов к фильтрату порционно, каждый раз перемешивая раствор добавляют кристаллический сульфат аммония до полного насыщения, т.е. пока новая порция соли остается нерастворенной. Отфильтруйте выпавший осадок альбуминов. С полученным осадком проведите биуретовую реакцию.

*Вывод:* заполните таблицу

Название белка	Степень насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Характер осадка	Биуретова реакция

## САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

### Контрольные вопросы и задания:

1. Определите изоэлектрические точки пептидов ( $>$ ,  $<$ ,  $=7,0$ ):
  - а) Pro-Lys-Tyr-Gln-Trp
  - б) Ala-Ser-Glu-Asn-Met
2. Сравните направление движения в электрическом поле двух пептидов при pH 7,0 (к катоду или аноду): а) Val-Glu-Ala б) Leu-Asn-Arg.
3. В ядерных белках-гистонах содержится большое количество аминокислотных остатков аргинина и лизина, а в белке крови альбумине – много остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот. В каких средах ( $>$ ,  $<$  или  $=7,0$ ) лежит pI этих пептидов? С каким из двух пептидов может взаимодействовать  $Ca^{2+}$ ?