



**2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto  
„Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų  
plėtra“**

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios  
technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

-----

## **BIO 321. BIOCHEMIJA**

### **Laboratorinis darbas**

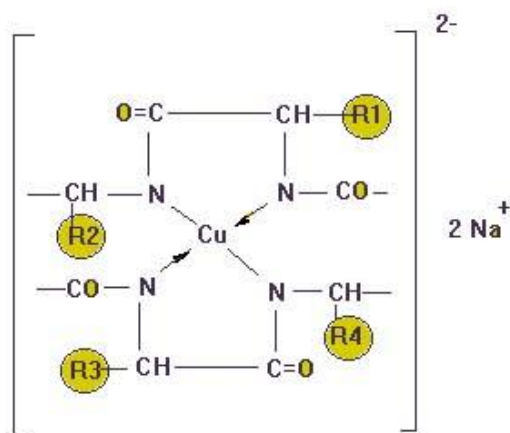
#### **Baltymų koncentracijos nustatymas tirpaluose. Mitochondrijų baltymų kiekio nustatymas biureto metodu.**

Baltymai yra termolabilūs linijiniai biopolimerai, sudaryti iš aminorūgščių, į kurias hidrolizuojami suskyla. Ląstelėje gali būti keletas tūkstančių skirtingų baltymų.

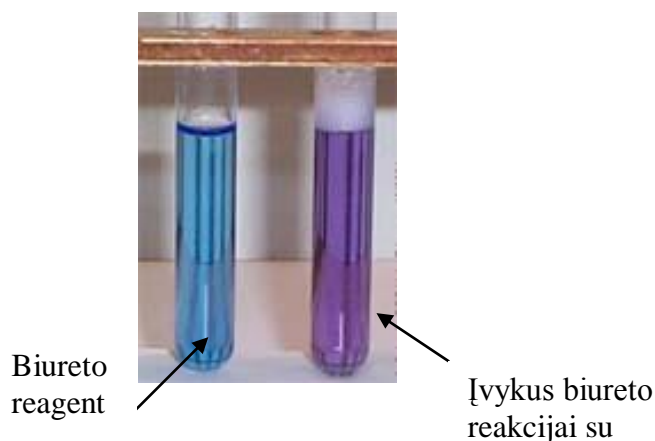
Viena svarbiausių baltymų funkcijų – katalitinė: medžiagų apykaita būtų neįmanoma, jeigu virškinimo sultyse ir organizmo ląstelėse nebūtų specifinių baltymų – fermentų, kurie katalizuoja, pagreitina vykstančias chemines reakcijas. Taip pat baltymai atlieka pernašos, struktūrinę, apsauginę, energetinę (oksiduojantis baltymuose esančioms aminorūgštims, išsiskyrusi energija gali būti panaudojama organizmo energetiniams poreikiams tenkinti), motorinę (raumenys sudaryti iš baltymų aktino ir miozino, kurių pagalba cheminė energija paverčiama mechanine), toksinę, receptorinę (baltymai receptoriai, išsidėstę ant membranų paviršiaus, sąveikauja su įvairiomis medžiagomis (pvz., hormonais, neuromediatoriais, šviesa) ir perduoda signalą per membraną), reguliacinę (baltymai gali prisijungti prie nukleorūgščių, kitų baltymų ir keisti jų biologinį aktyvumą) funkcijas.

Viena iš labiausiai paplitusių ir naudojamų reakcijų peptidų ir baltymų nustatymui yra biureto reakcija. Šiai reakcijai vykti reikia kelių peptidinių jungčių, todėl viena

amino rūgštis neduoda teigiamos reakcijos. Veikiant peptidus ar baltymus  $\text{Cu}^{2+}$  šarminėje aplinkoje susidaro purpurinės spalvos  $\text{Cu}^{2+}$  - baltymo kompleksas.



Kadangi tirpalo spalvos intensyvumas priklauso nuo baltymo kiekio, ši reakcija naudojama baltymo koncentracijai nustatyti, susidariusio komplekso spalvos intensyvumą matuojant spektrofotometriškai.



Biureto metodas baltymui nustatyti nėra labai jautrus ir tinka baltymo koncentracijai nuo 2 -10 mg baltymo mėginyje. Nustatymui trukdo amonio jonai.

### Reagentų paruošimas

**Reagentai:** natrio šarmas (NaOH);  
vario sulfatas ( $\text{CuSO}_4$ );  
Kalio, natrio tartrastas;  
Natrio deoksicholatas;  
Liofilizuoto žmogaus serumo albuminas.

### Darbo eiga:

**Biureto reagento gamyba.**

1. *10% NaOH tirpalo gamyba iš sotaus NaOH tirpalo:* sotas NaOH tirpalas gaminamas prieš kelias dienas iš 50 g NaOH ir 50 ml H<sub>2</sub>O. Sotas tirpalas gaunamas, kai pridėto šarmo kristalai nebetirpsta ir nusėda dugne. Tirpinimo metu indą užkimsti kamščiu su piltuvėliu, kuriame yra vata ir drėgmę sugeriantis CaCl<sub>2</sub> (paruošia laborantas). Paruoštas tirpalas filtruojamas stiklo filtru Nr. 2. Cilindre paruošiamas 10% NaOH tirpalas iš 42 ml sotaus NaOH, kuris skiedžiamas bidistiliuotu H<sub>2</sub>O iki 300 ml.
2. *1 % vario sulfato (CuSO<sub>4</sub>) tirpalas:* 500 ml bidistiliuoto vandens tirpinama 1,5 g CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O.
3. Jam ištirpus, pridedama 12 g K, Na-tartrato.
4. Pastarajam ištirpus, pridedama 300 ml 10% NaOH ir pilama bidistiliuoto vandens iki 1000 ml.

#### **Natrio deoksicholato gamyba (DOX):**

0,33g Na deoksicholato ištirpinama 100 ml H<sub>2</sub>O.

#### **Albumino tirpalo paruošimas:**

2 g albumino ištirpinama 10 ml 0,9 % NaCl tirpalo. 1 ml šio tirpalo yra 200 mg baltymo. Reagentas nestabilus. Jam stabilizuoti pridedama 0,05 ml NaN<sub>3</sub> (natrio azido) tirpalo. Toks reagentas, laikomas šaldytuve, tinka vartoti 2 mėnesius.

#### **Gradavimo grafiko paruošimas**

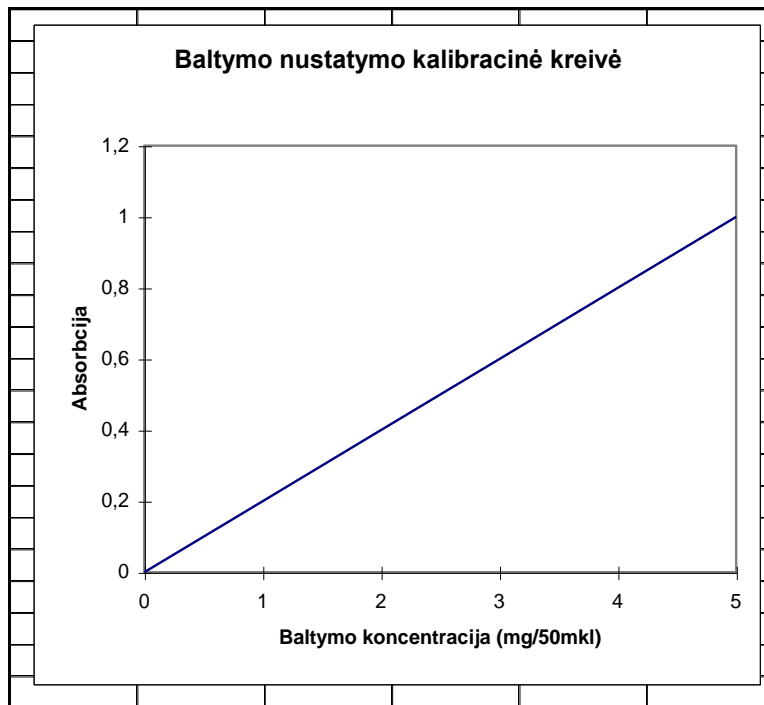
1. Pagal lentelę paruošiami baltymo tirpalų praskiedimai:

---

<b>Gaminamas tirpalas</b>	<b>Skiedimai</b>	<b>Baltymo kiekis 50-yje µl tirpalo</b>
200 mg/ml		10 mg
150 mg/ml	750 µl baltymo tirpalo (200 mg/ml) + 250 µl H <sub>2</sub> O	7,5 mg
100 mg/ml	500 µl baltymo tirpalo (200 mg/ml) + 500 µl H <sub>2</sub> O	5 mg
75 mg/ml	750 µl baltymo tirpalo (100 mg/ml) + 250 µl H <sub>2</sub> O	3,75 mg
50 mg/ml	500 µl baltymo tirpalo (100 mg/ml) + 500 µl H <sub>2</sub> O	2,5 mg
25 mg/ml	500 µl baltymo tirpalo (50 mg/ml) + 500 µl H <sub>2</sub> O	1,25 mg
12,5 mg/ml	500 µl baltymo tirpalo (25 mg/ml) + 500 µl H <sub>2</sub> O	0,625 mg
10 mg/ml	100 µl baltymo tirpalo (100 mg/ml) + 900 µl H <sub>2</sub> O	0,5 mg
5 mg/ml	100 µl baltymo tirpalo (50mg/ml) + 900 µl H <sub>2</sub> O	0.25mg/ml

---

2. Baltymo nustatymui imama 50 µl kiekvieno paruošto baltymo tirpalo, 0,95 ml DOX ir 4 ml biureto reagento.
3. Paruošiamas *kontrolinis tirpalas* be baltymo: pridedama 1 ml DOX (vietoje baltymo tirpalo 0,95 ml DOX tirpalo) ir 4 ml biureto reagento.
4. Baltymo tirpalai ir kontrolinis tirpalas inkubuojami 20 min. vandens termostate 37°C temperatūroje.
5. Matuojamas šviesos sugėrimas spektrofotometru „Helios“, bangos ilgiui esant 540 nm. Palyginamuoju tirpalu naudojant *kontrolinį tirpalą*.
6. Braižoma kalibracinė kreivė.



***Mitochondrijų baltymų kiekio nustatymas biureto metodu***

1. Į 0,05 ml (50  $\mu$ l) mitochondrijų suspensijos įpilama 0,95 ml 0,33% dezoksicholato tirpalo, gerai sumaišoma.
2. Po to įpilama 4 ml biureto reagento, sumaišoma ir inkubuojama vandeniniame termostate 37°C, 20 min.
3. Paruošiamas *kontrolinis tirpalas* be baltymo: pridedama 1 ml DOX ir 4 ml biureto reagento.
4. Gauto tirpalo optinis tankis matuojamas spektrofotometru, esant bangos ilgiui 540 nm, palyginamuoju tirpalu naudojamas kontrolinis tirpalas.
5. Baltymo kiekis nustatomas pagal kalibracinę kreivę.