

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Τάξη/τμήμα: _____ Ημερομηνία: _____

Όνομα ομάδας: _____

Μέλη ομάδας: _____

Ερευνητικό ερώτημα: Πώς μπορεί να διαπιστωθεί ποιοτικά η παρουσία των πρωτεϊνών και καταγραφεί η καταστροφή τους;

Στόχοι άσκησης

- Να διαπιστώσουν μαθητές/μαθήτριες την ποιοτική μέθοδο ταυτοποίησης των πρωτεϊνών.
- Να αναγνωρίσουν το αποτέλεσμα του φαινομένου της μετουσίωσης και να καταγράψουν παράγοντες που το προκαλούν.
- Να συσχετίσουν τη λήψη των πρωτεϊνών με την καλή διατροφή και τις ανάγκες του οργανισμού.

Α. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΓΝΩΣΕΙΣ

Το τελικό σχήμα των πρωτεϊνών μπορεί να είναι σφαιρικό ή ινώδες. Οι σφαιρικές πρωτεΐνες, όπως η ωολευκωματίνη στο ασπράδι του αυγού, οι πρωτεΐνες του γάλακτος, τα περισσότερα ένζυμα, είναι διαλυτές στο νερό. Οι ινώδεις πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο του συνδετικού ιστού, οι κερατίνες των τριχών και των νυχιών, είναι αδιάλυτες στο νερό.

Η τεχνική για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στηρίζεται στην ιδιότητα που έχουν τα πεπτιδία να αντιδρούν σε αλκαλικό περιβάλλον με τα ιόντα Cu^{++} και να σχηματίζουν σύμπλοκες ενώσεις με χαρακτηριστικό «μενεξεδί» χρώμα (αντίδραση διουρίας ή αντίδραση Μπιούρετ)

ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

- 5 δοκιμαστικοί σωλήνες, στατώ δοκιμαστικών σωληνίων
- διαλύματα KOH 0.1M και CuSO_4 , πρωτεΐνη πεψίνη, 4 υλικά για ταυτοποίηση πρωτεϊνών

ΠΟΡΕΙΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. Σε στατώ, υπάρχουν αριθμημένοι 5 δοκιμαστικοί σωλήνες. Στο σωλήνα 1 έχει ήδη διαλυθεί μικρή ποσότητα πεψίνης σε 3ml περίπου απεσταγμένου νερού (θετικός μάρτυρας).
2. Προσθέτετε 10 σταγόνες διαλύματος KOH 0,1M και αναδεύετε [μετακινώντας δεξιόλαριστερά το σωλήνα, όχι πάνω-κάτω], το σωλήνα 1.
3. Προσθέτετε 3 σταγόνες πρότυπου διαλύματος CuSO_4 , στο σωλήνα 1. Στο διάλυμα εμφανίζεται μενεξεδί χρώμα, ενδεικτικό της παρουσίας του πεπτιδίου της πεψίνης.
4. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες 2, 3, 4 έχουν προστεθεί 3ml άγνωστης ουσίας, ενώ στον 5 έχουν προστεθεί 3ml CuSO_4 [αρνητικός μάρτυρας]. Να ανιχνεύσετε ποιοι από τους σωλήνες περιέχουν πρωτεΐνες, επαναλαμβάνοντας τα βήματα 2 και 3 για καθέναν από αυτούς και καταγράφοντας το χρώμα που δημιουργείται*.
5. Να καταγράψετε τις παρατηρήσεις σας στον παρακάτω πίνακα
- 6.

Α/Α	Χρώμα που δημιουργήθηκε	Αντίδραση (+ ή -)**	Συμπέρασμα***
1 [πεψίνη] *			
2			
3			
4			
5 [CuSO_4] *			

* Ο σωλήνας 1 είναι το χρώμα του δείγματος με πρωτεΐνη (θετικός μάρτυρας), ο σωλήνας 5 (δεν έχει μέσα πρωτεΐνη) είναι το χρώμα του δείγματος χωρίς πρωτεΐνη (αρνητικός μάρτυρας-). Για να έχετε πρωτεΐνη θα πρέπει το χρώμα που δημιουργείται να είναι ανάμεσα στο χρώμα αυτών των δύο δειγμάτων.

** Στην προτελευταία στήλη θα σημειώσετε το σύμβολο [+], στην περίπτωση που στο σωλήνα ανιχνεύσετε πρωτεΐνη και το σύμβολο [-] όταν στο σωλήνα δεν υπάρχει πρωτεΐνη.

*** Στην τελευταία στήλη γράφεται το συμπέρασμά σας αν τελικά υπάρχει ή όχι πρωτεΐνη.

Β. ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ **ΓΝΩΣΕΙΣ**

Το ασπράδι του αυγού, όταν θερμανθεί σκληραίνει. Με τη θερμότητα σπάζουν κάποιοι δεσμοί που συνδέουν τα μονομερή της πρωτεΐνης του αυγού (της ωολευκωματίνης) και προκαλείται τυχαίος σχηματισμός κάποιων άλλων δεσμών. Αποτέλεσμα είναι η πρωτεΐνη να χάσει το κανονικό της σχήμα. Και επειδή το σχήμα της πρωτεΐνης έχει σχέση με τη λειτουργία της, χάνοντας το κανονικό της σχήμα, χάνει και τη λειτουργία της.

Παρόμοιο φαινόμενο αλληλλαγής της δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών παρατηρούμε με την προσθήκη οξέος στο γάλα. Ετσι λοιπόν μεταβολές της θερμοκρασίας ή του pH μπορούν να σπάσουν τέτοιους δεσμούς, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της δομής των πρωτεϊνών ή με άλλα λόγια τη μετουσίωση των πρωτεϊνών.

ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

- έξι δοκιμαστικοί σωλήνες, στατώ δοκιμαστικών σωληνίων
- αλατόνερο ή ζαχαρόνερο, γάλα, ασπράδι αυγού, ξύδι, διάλυμα ΚΟΗ 5Μ

ΠΟΡΕΙΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. Σε στατώ δοκιμαστικών σωληνίων υπάρχουν αριθμημένοι ακόμη 6 δοκιμαστικοί σωλήνες.
2. Στους σωλήνες 6, 7 έχουν προστεθεί 3ml γάλα. Στους σωλήνες 8, 9 έχουν προστεθεί 3ml ασπράδι αυγού. Στους σωλήνες 10, 11 έχουν προστεθεί 3 ml αλατόνερο. Αναδεύετε [μετακινώντας δεξιόαριστερά το σωλήνα, όχι πάνω-κάτω] καλά όλα τα μίγματα για να δημιουργηθεί ομογενές μίγμα.
3. Στους σωλήνες 6, 8 και 10 προσθέτετε 5 σταγόνες ξύδι και αναδεύετε [μετακινώντας δεξιόαριστερά το σωλήνα, όχι πάνω-κάτω].
4. Στους σωλήνες 7, 9, 11 προσθέτετε 10 σταγόνες διαλύματος ΚΟΗ 5Μ [φωνάξετε τον καθηγητή για να το προσθέσει] και αναδεύετε [μετακινώντας δεξιόαριστερά το σωλήνα, όχι πάνω-κάτω].
5. Παρατηρείστε και καταγράψτε τις παρατηρήσεις σας στον παρακάτω πίνακα. Εξηγήστε τι νομίζετε ότι συνέβη σε κάθε περίπτωση, ως προς το φαινόμενο της μετουσίωσης.

Σωλήνας	Παρατήρηση	Ερμηνεία
6 ^{ος} : γάλα + 5 σταγόνες ξύδι		
7 ^{ος} : γάλα + 10 σταγόνες ΚΟΗ 5Μ		
8 ^{ος} : ασπράδι + 5 σταγόνες ξύδι		
9 ^{ος} : ασπράδι + 10 σταγόνες ΚΟΗ 5Μ		
10 ^{ος} : αλατόνερο + 5 σταγόνες ξύδι		
11 ^{ος} : αλατόνερο + 10 σταγόνες ΚΟΗ 5Μ		

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗ

Η άσκηση αυτή, όπως συντάχθηκε απαιτεί πολλούς δοκιμαστικούς σωλήνες (11 ανά ομάδα) και μερικά υλικά καθημερινής χρήσης

1. Θα πρέπει λοιπόν για να μην ταλαιπωρείστε με το πλήσιμο των υάλινων συσκευών να μάθετε τους μαθητές να **πλένουν σωστά**. Το πλήσιμο είναι η βασικότερη εργαστηριακή τεχνική που πρέπει να γνωρίζουμε. Βάλτε πλαστικά στατώ δίπλα στον νεροχύτη, ώστε οι μαθητές να τα βάζουν ανάποδα για να στεγνώσουν.
2. Κάτω από το στατώ με τους σωλήνες, βάλτε ένα λευκό χαρτί να κάνει αντίθεση για να μπορούν να βλέπουν το χρώμα που αλλάζει (σε όποια περίπτωση αλλάζει).
3. Για πιο άμεση και εύκολη προετοιμασία, χρησιμοποιούμε σύριγγα των 5-10ml, για να μοιράζουμε τα διάφορα διαλύματα στους σωλήνες.
4. **Παραλαβή λευκωματίνης αυγού**. Ανοίγουμε δύο τρύπες στους πόλους του αυγού και αφήνουμε λίγο ασπράδι να χυθεί μέσα σε ένα ποτήρι ζέσεως των 200ml στο οποίο έχουμε προσθέσει περίπου 40-50ml νερό. Στη συνέχεια αναδεύουμε καλά. Από το ποτήρι ζέσεως μοιράζουμε ανά 3ml περίπου στους δοκιμαστικούς σωλήνες που θα δουλέψουμε το πείραμά μας.
5. **Παρασκευή διαλύματος ΚΟΗ 0,1Μ**. Διαλύουμε 0,56 g ΚΟΗ σε 100ml απιονισμένο νερό. Αφού διαλυθεί καλά το φυλάσσουμε σε πλαστικά ψιαλίδια, στα οποία κολλάμε μία αυτοκόλλητη ετικέτα με την ονομασία του διαλύματος. Είναι προτιμότερο, να φτιάχνουμε πυκνότερα διαλύματα π.χ. 1Μ και να τα αραιώνουμε.
6. **Παρασκευή διαλύματος CuSO_4** . Για την παρασκευή αυτού του διαλύματος ακολουθούμε την εξής πορεία:
 1. **Παρασκευή μητρικού διαλύματος CuSO_4** . Διαλύουμε 15,9g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 100ml απιονισμένο νερό. Αναδεύουμε για αρκετή ώρα να διαλυθεί πλήρως ο $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Μεταφέρουμε σε πλαστικό ψιαλίδιο το διάλυμα και κολλάμε σ' αυτό αυτοκόλλητη ταινία με την ονομασία του διαλύματος
 2. **Παρασκευή προτύπου διαλύματος CuSO_4** . Για την παρασκευή του προτύπου διαλύματος αραιώνουμε 19ml από το μητρικό διάλυμα με απιονισμένο νερό μέχρι την ένδειξη 100ml. Μεταφέρουμε το διάλυμα σε άλλο πλαστικό ψιαλίδιο και κολλάμε αυτοκόλλητη ταινία με την ονομασία του διαλύματος. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** στα πειράματα ανίχνευσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιούμε πάντοτε το πρότυπο διάλυμα CuSO_4 . Κάθε φορά που μας εξαντλείται το πρότυπο διάλυμα θα παίρνουμε 19ml από το μητρικό διάλυμα και θα το αραιώνουμε με νερό μέχρι την ένδειξη 100ml
5. Η **Πεψίνη** υπάρχει σε όλα τα οργανωμένα εργαστήρια των Λυκείων. Το ένζυμο αυτό θα το βρείτε σε ένα μικρό γυάλινο ψιαλίδιο. Για την ανίχνευσή της πρωτεΐνης αυτής θα χρησιμοποιήσετε **μία ελάχιστη ποσότητα** από αυτό το ένζυμο. Η ποσότητα της πεψίνης μόλις που θα καλύπτει τη μύτη του πλαστικού μαχαιριδίου που θα χρησιμοποιήσουμε για την παραλαβή του. Διαλύουμε την πεψίνη σε 3ml απιονισμένο νερό.
6. Το **Γάλα** καλό θα είναι να προτιμήσετε να έχει λίγα λιπαρά. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών του γάλακτος σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε 0,5-1ml γάλα και το αραιώνουμε με 2ml απιονισμένο νερό. Στο πείραμα της μετουσίωσης **δεν αραιώνουμε** το γάλα.
7. Οι **μεταβολές του pH**, όπως και οι **μεταβολές στη συγκέντρωση αλάτων** προκαλούν αλλαγές στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων αμινοξέων. Π.χ
 - σε όξινο περιβάλλον τα H^+ ενώνονται με τις καρβοξυλικές ομάδες $[\text{COO}^-]$ του ασπαρτικού και γλουταμινικού οξέος ουδετεροποιώντας το αρνητικό τους φορτίο. Επιπλέον, ενώνονται σε ελεύθερα ζεύγη ηλεκτρονίων του ατόμου του αζώτου της αμινομάδας $[\text{NH}_2]$ των θυσίνης και αργινίνης φορτίζοντας τα αμινοξέα θετικά. Αποτέλεσμα αυτής της αλλαγής είναι η μεταβολή του φορτίου της πρωτεΐνης (γίνεται θετικότερη) και η αδυναμία των πλευρικών ομάδων να ενωθούν ηλεκτροστατικά με γειτονικά μόρια ή ιόντα που έχουν υποστεί την αλλαγή του φορτίου τους.

- σε βασικό περιβάλλον τα H^+ απομακρύνονται από τις καρβοξυλικές ομάδες $[COO^-]$ του ασπαρτικού και γλουταμινικού οξέος φορτίζοντάς τις αρνητικά κι επιπλέον απομακρύνονται από τις ομάδες NH_3^+ της θυσίνης και της αργινίνης μειώνοντας το θετικό τους φορτίο. Αποτέλεσμα αυτής της αλλαγής είναι η μεταβολή του φορτίου της πρωτεΐνης [γίνεται αρνητικότερη] και η αδυναμία των πλευρικών ομάδων να ενωθούν ηλεκτροστατικά με γειτονικά μόρια ή ιόντα που έχουν υποστεί την αλλαγή του φορτίου τους
8. Οι υψηλές θερμοκρασίες μειώνουν την ισχύ των δεσμών υδρογόνου.

ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ΤΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Τοποθετούμε σε στατώ δοκιμαστικών σωληνίων 5 δοκιμαστικούς σωληνίες

- Στον σωλήνα 1 προσθέτουμε την πεψίνη σε πάρα πολύ μικρή ποσότητα και την διαλύουμε καλά σε 3ml απιονισμένο νερό
- Στο σωλήνα 2 προσθέτουμε 0,5-1ml γάλα αραιωμένο με περίπου 2 ml απιονισμένο νερό
- Στο σωλήνα 3 προσθέτουμε 3ml ζαχαρόνερο ή αλατόνερο
- Στο σωλήνα 4 προσθέτουμε 1ml ασπράδι του αυγού αραιωμένο με 2 ml νερό
- Στον σωλήνα 5 προσθέτουμε 3ml προτύπου διαλύματος $CuSO_4$

Ο σωλήνας 1 είναι ο μάρτυρας για το θετικό αποτέλεσμα της αντίδρασης ανίχνευσής των πρωτεϊνών και ο σωλήνας 5 είναι ο μάρτυρας για το αρνητικό αποτέλεσμα της αντίδρασης ανίχνευσης των πρωτεϊνών.

Καλό θα είναι η προσθήκη των προς ανίχνευση διαλυμάτων στους δοκιμαστικούς σωληνίες να έχει γίνει πριν από την έναρξη του μαθήματος.

Μπορούμε να σκεφθούμε και να επιλέξουμε οποιουδήποτε άλλους συνδυασμούς ουσιών. Είναι προτιμητέο όταν ολοκληρωθεί η άσκηση, να αναφέρουμε το περιεχόμενο των σωληνίων στους μαθητές και να συζητήσουμε.

ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ΤΗΣ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1. Για τον παράγοντα pH θα χρησιμοποιήσουμε σταγόνες ξύδι
2. Για τον παράγοντα βάση, θα χρησιμοποιήσουμε διάλυμα KOH 5M. Επειδή το διάλυμα KOH 5M είναι αρκετά πυκνό, προτιμήστε να το προσθέσετε εσείς στους μαθητές σας και να μην τους το δώσετε να το βάλουν μόνοι τους στους δοκιμαστικούς σωληνίες
3. Το ασπράδι του αυγού δεν το αραιώνουμε με νερό
4. Το γάλα δεν το αραιώνουμε με νερό

Ο ΠΑΓΚΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΜΑΘΗΤΗ θα έχει

- στατώ με 11 δοκιμαστικούς σωληνίες
- π्लाστικό ψιαλίδιο με διάλυμα KOH 0,1M
- π्लाστικό ψιαλίδιο με πρότυπο διάλυμα $CuSO_4$
- π्लाστικό ψιαλίδιο με ξύδι