

3. Analiza aminokwasowa peptydów

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. 6 N roztwór HCl
2. Nasycony roztwór Na_2CO_3
3. Badany peptyd
4. Aceton
5. Chlorek dansylu
6. Płytki chromatograficzne (20×20 cm) pokryte 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego
7. Komora chromatograficzna do chromatografii cienkowarstwowej (TLC)
8. Kapilary
9. Układ rozwijający: chloroform : etanol (3 : 1; v/v)
10. Roztwory dansylowych pochodnych aminokwasów w acetonie (1mg/mL)
11. Probówki zwykłe szklane
12. Płaszcz grzejny

Wykonanie doświadczenia:

1. Hydroliza kwasowa peptydu

Rozpuścić 0,5 mg peptydu w 0,4 mL 6N roztworu HCl. Probówkę ogrzewać przez 24 h w temperaturze 110°C. Następnie otrzymany hydrolizat aminokwasów zanalizować za pomocą chromatografii cieczowej (TLC).

2. Identyfikacja N-końcowej reszty aminokwasowej

Do 200 μL roztworu peptydu w probówce dodać 300 μL acetonowego roztworu chlorku dansylu o stężeniu 10 mg/mL. Reakcję prowadzić w temp 65°C przez 15 minut w cieplarni. Następnie do mieszaniny dodać 300 μL nasyconego roztworu CaCO_3 . 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 i ogrzewać w temp 110°C przez 24 godziny. Następnie roztwór hydrolizatu przenieść ilościowo do kolby okrągłodennej i odparować do sucha. Otrzymany osad rozpuścić w 0,5 mL acetonu i przesączyć przez watę szklaną umieszczoną w pipiecie Pasteura. 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 3 : 1. Jako odnośniki na płytkę nanieść pochodne dansylowe aminokwasów (19 pozycji) oraz roztwór otrzymany w wyniku dansylowania i kwaśnej hydrolizy peptydu. Na podstawie wartości współczynników podziału R_f zidentyfikować N-końcową resztę aminokwasową obecną w peptydzie.

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