

4. Hydroliza enzymatyczna peptydu

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. Bufor Tris HCl o pH 8,3
2. Roztwór trypsyny o stężeniu 1mg/mL w 0,1 M roztworze HCl z dodatkiem 20 mM CaCl₂
3. Roztwór chymotrypsyny o stężeniu 1mg/mL w 0,1 M roztworze HCl z dodatkiem 20 mM CaCl₂
4. 30% kwas octowy
5. 3 mg badanego peptydu
6. Płytki chromatograficzne (20×20 cm) pokryte 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego
7. Komora chromatograficzna do chromatografii cienkowarstwowej (TLC)
8. Kapilary
9. 1% roztwór ninhydryny w etanolu
10. Układ rozwijający BAWP (alkohol *n*-butylowy : kwas octowy : woda : pirydyna) o następującym składzie 1 : 1 : 1 : 1 (v/v/v/v)
11. Probówki Eppendorfa

Wykonanie doświadczenia:

W dwóch probówkach umieścić 100 µL roztworu peptydu (1mg/mL) i inkubować w temperaturze pokojowej w 2 mL buforu Tris HCl o pH 8,3 z dodatkiem 100 µL roztworu trypsyny (probówka 1) i 100 µL roztworu chymotrypsyny (probówka 2). Po 2 godzinach inkubacji zakończyć reakcję dodając do probówek 100 µL 30% roztworu kwasu octowego. Następnie wykonać analizę metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) nanosząc na płytkę TLC roztwory z probówki 1 i 2, a także jako odnośniki roztwory trypsyny, chymotrypsyny oraz peptydu. Chromatogram wywołać stosując 1% roztwór ninhydryny w etanolu. Określić podatność analizowanego peptydu na proteolizę. Na podstawie informacji o sekwencji (strukturze I-rzędowej, jeśli peptyd jest liniowy to oba terminy są tożsame, w przeciwnym wypadku do struktury I rzędowej często zaliczana jest lokalizacja układów cyklicznych) peptydu zaproponować miejsca hydrolizy i powstałe fragmenty.

Sprawozdanie z ćwiczenia powinno zawierać: opis mechanizmu działania i specyficzności zastosowanych enzymów proteolitycznych, na podstawie analizy TLC, stwierdzenie czy peptyd uległ proteolizie, jeśli tak to należy wskazać miejsca na chromatografie odpowiadające sekwencjom powstałych fragmentów.