

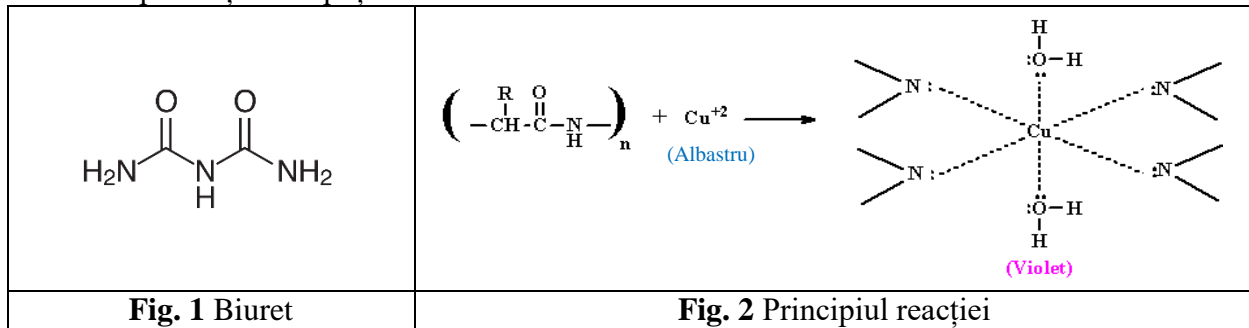
Lucrarea de laborator 3

BIOCHIMIE

Experiența 1. Reacția biuretului asupra legăturii peptidice.

Principiul reacției:

Denumirea provine de la biuret. Soluția puternic alcalină (NaOH) hidrolizează peptidele până la fragmente ce conțin legături peptidice după care aceste grupări interacționează cu ionii de Cu^{2+} din sulfatul de cupru de culoare albastră, formând complexe colorate de la **roșu** la **violet**. Este necesară prezența a cel puțin trei resturi aminoacidice.



Mod de lucru:

În două eprubete cu câte 10 picături de soluție I și II ce conțin peptide se adaugă câte 5 picături soluție NaOH 10% și câte 1 picătură de CuSO_4 1%. Se agită.

Concluzie:

Soluția din eprubeta I se **colorează în** _____/nu se colorează, și conține _____, iar soluția din eprubeta II se **colorează în** _____/nu se colorează și conține _____.

Soluția din eprubeta _____ nu se colorează deoarece

Un exemplu de dipeptidă este: _____.

15p

Experiența 2. Reacția Fol asupra aminoacizilor ce conțin sulf.

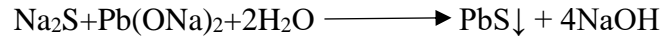
Principiul reacției:

Prin încălzirea soluțiilor proteice în mediu puternic alcalin cu plumbit, lichidul se colorează în brun sau negru. Reacția este condiționată de prezența în proteină a **aminoacizilor ce conțin sulf**, care sub influența alcaliilor se distrug cu formare de **sulfură de sodiu**:

Plumbitul se formează la interacțiunea acetatului de plumb cu baza alcalină:



Sulfura de sodiu reacționează cu plumbitul, formînd sulfura de plumb de culoare brună sau neagră:



Mod de lucru:

În 2 eprubete se iau cîte 10 picături de soluție: I – albuș de ou, II – proteină vegetală și se adaugă cîte 5 picături soluție de NaOH 10% și cîte o picătură soluție de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0,5%. Printr-o încălzire îndelungată lichidul devine brun și se depune un precipitat brun sau negru de sulfură de plumb.

Concluzie:

Colorația intensă a soluției de _____ atestă, că această proteină este **bogată / săracă** în aminoacizii _____ iar cea slabă a soluției de _____ că în această proteină acești aminoacizi sunt în cantitate **mare / mică**.

Exemple de aminoacizi ce conțin sulf sunt 1. _____ și 2. _____

14p.

Experiența 3. Electroforeza ADN în gel de agaroză.

Principiul metodei.

Electroforeza în geluri de agaroză reprezintă metoda standard de analiză a acizilor nucleici. Deplasarea moleculelor se face în prezența unui curent electric. Mobilitatea electroforetică este influențată de următorii factori: concentrația de agaroză, conformația moleculei de ADN (monocatenar, bicatenar sau superrăsucit), masa moleculară a moleculei, prezența compusului fluorescent în gel, tamponul utilizat, tipul de agaroză și voltajul aplicat.

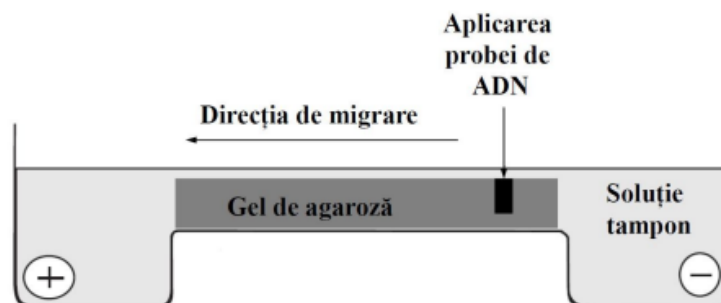


Fig. 3 Tehnica de separare a acizilor nucleici prin electroforeza orizontală

Tehnica se folosește pentru determinarea purității ADN, verificarea existenței produșilor rezultați în urma PCR-ului și a lungimii acestor produse sau la analiza fragmentelor rezultate după clivarea enzimatică (cu ajutorul enzimelor de restricție) a ADN-ului.

Benzile sunt vizualizate cu compuși fluorescenți (bromura de etidiu sau SYBR Green) prin iradiere cu lumină UV. Pentru facilitarea estimărilor cantitative există colecții de polimeri „marcheri de masă moleculară” utilizați pentru etalonarea separărilor.

Probleme:

- a) Prin electroforeză în gel de agaroză cu concentrația 1,5% au fost analizate produsele reacției PCR cu utilizarea primerilor GSU 1491-1495. La finalizarea migrării moleculele de ADN au fost vizualizate cu ajutorul unui transiluminator UV fiind obținută imaginea de mai jos.

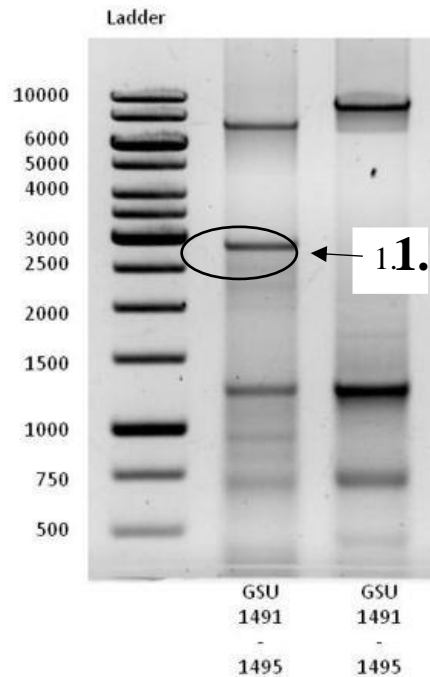


Fig. 4. Imaginea gelului de agaroză

Concluzie: Lungimea fragmentului de ADN marcat în desen cu cifra 1 este de _____ pb.
10 p.

- b) β -lactoglobulina este una dintre cele mai importante proteine din laptele mamiferelor. Până acum au fost descoperite 11 variante genetice care codifică forme diferite ale proteinei β -lactoglobulină, expresia acestora influențând calitatea laptelui: Variantele A și B prezintă cel mai mare interes, deoarece au fost asociate cu performanțele de producție a laptelui și de asemenea cu procesarea eficientă și calitatea acestuia. Exemplarele homozigote BB furnizează un lapte bogat în grăsime și în proteine, foarte valoros în procesul de fabricare a brânzeturilor, în timp ce exemplarele homozigote AA dau lapte cu un procent mic de grăsime, dar în cantitate mai mare.

Pentru identificarea alelelor A și B ale genei care codifică β -lactoglobulină la bovine, a fost extras ADN genomic de la 4 vaci din ferma X, produsul PCR al genei, cu mărimea de 262 pb, a fost supus digestiei cu enzima de restricție Hae III care recunoaște situsul palindromic format din patru nucleotide GG↓CC. Alela A prezintă două benzi de 153 și 109 pb deoarece

la nivelul fragmentului amplificat există un situs de restricție Hae III. Alela B prezintă trei benzi de 109, 79 și respectiv 74 pb datorită prezenței mutației punctiforme (T/C) care generează un nou situs de restricție. Dacă se folosește separarea prin electroforeză în gel de agaroză standard, benzile de 79 și 74 pb migrează împreună, și nu pot fi clar separate și evidențiate.

În rezultatul electroforezei fragmentelor de restricție a fost obținută următoarea imagine:

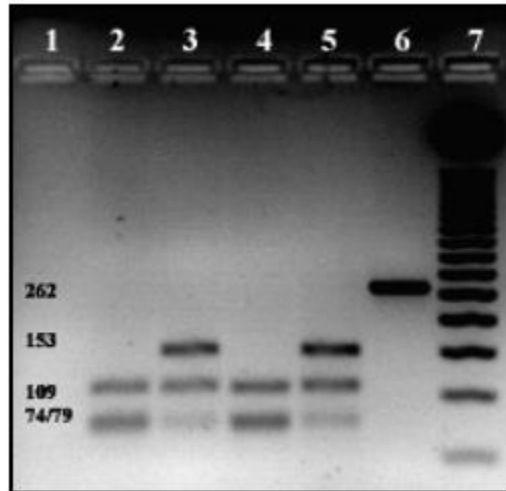


Fig. 5 Electroforeză produșilor de restricție. 1 – martor negativ; 2-5 –probele cercetate; 6 – fragment care nu a fost supus restricției; 7 – marker de masă moleculară 50 bp (Promega).

În imaginea de mai sus:

genotipul AA corespunde probei cu nr. _____

genotipul BB corespunde probei cu nr. _____

genotipul AB corespunde probei cu nr. _____

Care genotip este cel mai optim din punct de vedere economic? De ce?

Răspuns: _____

Ce sfat veți oferi fermierului în cauză vizavi de strategia reproducerii bovinelor în ferma sa?

