Republic of Iraq
Ministry of Higher Education &
Scientific Research
University of Baghdad
College of Science
Department of Chemistry

Laboratory manual of Biochemistry

For third stage/ second course

Department of Chemistry

By

Assistant lecture
Zainab makki dahham

2020-2021

السلامة المختبرية

- ❖ يجب ارتداء الصدرية البيضاء الخاصة بالمختبر للحفاظ على ملابسك من تأثير المواد الكيمياوية بمجرد دخول المختبر.
- ❖ تعلّم أسماء كافة الأجهزة والأدوات والمواد التي تستعملها في التجارب وحافظ عليها من التلف والكسر ونظفها بعد انتهاء التجربة.
- ❖ ضع جميع حاجياتك والكتب داخل الدولاب أمامك ورتب الأدوات التي تحتاجها للتجربة على الدولاب بحيث تترك مجالاً كافياً للعمل.
- ❖ كن مرتباً في عملك وحافظ على مكانك نظيفاً وامسح الطاولة التي تشتغل عليها بأسفنجه رطبة كلما انسكب عليها سائل ما.
- ❖ لا تضع أي شيء في فمك ولا تدخن.
- ❖ يجب عدم الإسراف في استعمال المواد الكيمياوية والماء المقطر والتقيد بالكميات المذكورة في طريقة أجراء التجربة.
- ❖ بعد استخدام زجاجيات المواد الكيمياوية يجب إعادتها إلى مكانها مع أحكام إغلاقها.
- ❖ يجب فتح صنبور المياه لفترة عند إلقاء الحوامض المركزة في الأحواض لكي تصبح مخففة منعاً لتآكل أنابيب تصريف المياه.
- ❖ عند الانتهاء من العمل أغلق التيار الكهربائي لجميع الأجهزة المستخدمة.
- ❖ مطالعة التجربة قبل القدوم إلى المختبر وفهمها جيداً والتقيد بخطوات العمل في كل تجربة.
- ❖ يجب تدوين ملاحظات عن كافة المشاهدات والاستنتاجات التي تحصل عليها أثناء إجراء التجارب.

protein Solubility

م.م زينب علي دحام
٢٠٢١/٦/٢

Some proteins dissolves into solutions suchas Normal saline (0.9% Nacl) to form Collidal solutions. (محاليل غروية)

The protein Solubility depends (تعتمد) on several factors:-

1. The nature (طبيعة) of protein:- globular (كروي) protein solubile in solutions, while fibrous (ليفي) protein insolubile in solutions
2. Ionic strength of solvent. (القوة الايونية للمذيب)
3. Nature of the solvent (طبيعة المذيب)
4. The pH
5. The Temperature.

For example

* Albumine dissolve in Normal Saline (0.9% Nacl), while Casein (the protein present in milk) dissolve in weakly alkaline solution.

Q/ How can you prepar the Normal Saline?

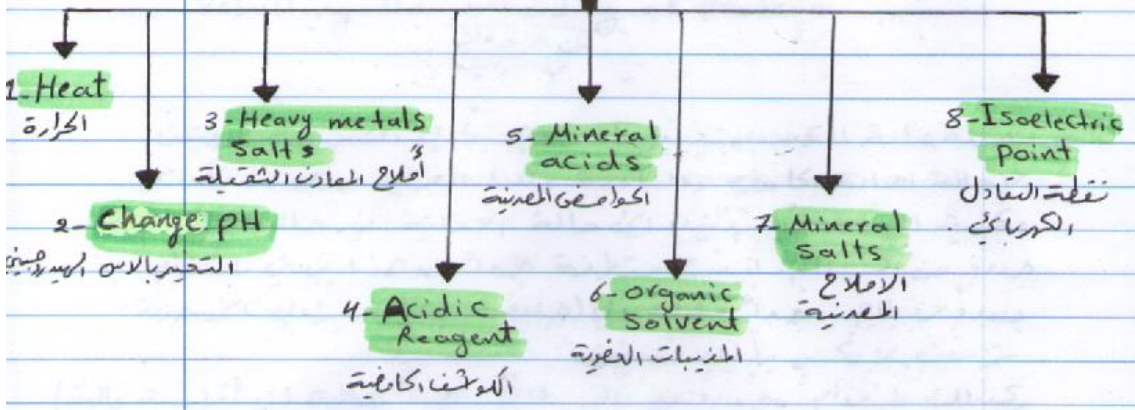
Answer| 0.9 gm of Nacl → dissolve → in 100ml of D.W (ماء مقطر)

هذا يعني أن التركيز النهائي هو (0.9%)

protein precipitation

The main purpose (الهدف) of protein precipitation is to separate (فصل) the protein from the solution either (او) to eliminate (التخلص) interferences (الشوائب) or to purify (تنقية) them for using in industry (الصناعة) and medicine (الطب).

precipitation reactions by



1- Heat — الحرارة
2- Change pH — التغير بالاس الهيدروجيني
3- Heavy metals Salts — أملاح المعادن الثقيلة
4- Acidic Reagent — الكواشف الحامضية
5- Mineral acids — الحوامض المعدنية
6- Organic Solvent — المذيبات العضوية
7- Mineral salts — الاملاح المعدنية
8- Isoelectric point — نقطة التعادل الكهربائي.

① **Heat** :- when the protein solution exposed (يتعرض) to heat it will be (precipitate) (denaturated) (يتمسخ).

* عند غلي زلال البيض نلاحظ تجمده وهنا يعني ان البروتين تمسخ ومن هذه الحالة لا يمكن عودة البروتين الى حالته الطبيعية بعد زوال العامل المؤثر والذي هو الحرارة وهنا الترسيب يسمى (غير عكسي)

② **change pH** :- التغير في pH

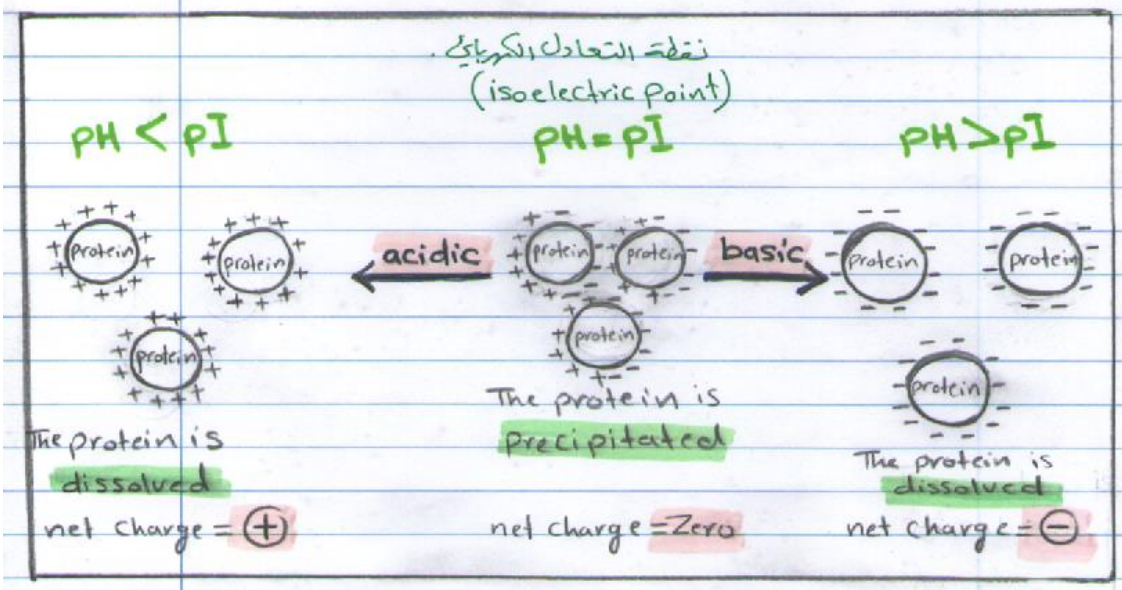
Adding diluted (المخففة) acids to solution, decrease (يقلل) the pH and leads (يؤدي) to positively charging the protein, due (يعزى) to the proton capture (يمسك) by amino groups (NH_2 groups convert to $^{+}NH_3$ ion).

The protein dissolve in solution, due to the repulsion (التنافر) of positive charges between the protein molecules.

when the diluted alkaline solution is gradually (تدريجياً) added to the solution, the protein will reach the isoelectricpoint in which the protein is precipitated as a result of the attraction (تجاذب) between the different charges of the protein molecules.

Keep adding the diluted alkaline solution, increase the pH and leads to negatively charging the protein, due to the (convert of $NH_3^{\oplus}$ ion to NH_2 neutral group), while COOH convert to ($COO^{\ominus}$).

The protein dissolve in solution, due to the repulsion of negative charges between the protein molecules.



③ Heavy meatls salts :

Heavy metal salts usually contain Hg^{+2}, Pb^{+2}, Ag^{+1}

The properties of heavy metals are :-

1. It has a high molecular weight
2. Having a positive charge

The principle :- Heavy metals salts will neutralization the protein by the negative charge of protein will bind with the positive charge of metals ions. Then the protein will precipitate as insolubile metal protein salt.

<u>note</u>:- we can use this precipitation in treatment of lead, mercury and other heavy metals poisoning by using egg albumin to formation (precipitate as insolubile metal protein salt), this precipitate is not absorbed and is excreted from the human body by vomiting.

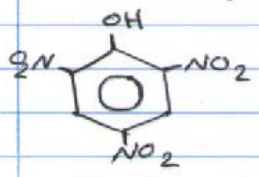
* يمكن الاستفادة من تطبيق الترسيب باملاح المعادن الثقيلة في معالجة التسمم بالمعادن الثقيلة مثل الرصاص والزئبق وغيرها والذي يحصل لبعض الاشخاص في المعامل. ويتم باستخدام البومين البيض باعطاءه للشخص المتسمم وهذا بدوره يكون مع المعدن الثقيل راسب غير ذائب لا يمتص من قبل الجسم ويتم طرحه عن طريق التقيؤ.

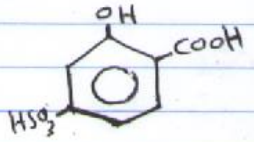
<u>Note</u>:- Adding excess of the heavy metals solution leading to dissolve the precipitate because the excess positive ions confer a stabilizing positive charge on the protein particles.

<u>Note</u>: using hard basic solution lead to preciptate the metal as hydroxide.

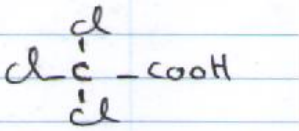
استخدام محاليل شديدة القاعدية يؤدي الى ترسيب المعدن الثقيل على شكل هيدروكسيد.

④ **Acidic reagent**:- These compounds carry a large negative charge, such as picric acid, sulphosalicylic acid and trichloroacetic acid.





Picric acid — Sulphosalicylic acid — Trichloroacetic acid.



The principle :- The acidic reagents will neutralization the protein by the positive charge of protein will bind with the negative charge of acidic reagent. Then the protein will precipitate as insolubile salt.

---

(5) Mineral acids :- These compound carry negative charge, such as HNO_3, HCl and H_2SO_4.

* الحوامض تكون مركزة وليس مخففة .

The principle :- The mineral acids will neutralization the protein by the positive charge of protein will bind with the negative charge of mineral acids. Then the protein will precipitate as insolubile salt.

---

(6) Organic Solvent :- such as ethanol, ether and acetone.

The principle :- Adding organic solvent to the solution reduces (يقلل) the hydration (الترطيب) of the protein by removing (ازالة) water by formation (تكوين) hydrogen bond between organic solvent and water, then the protein which leads to aggregation (ستجمع) and precipitation (سترسب).

---

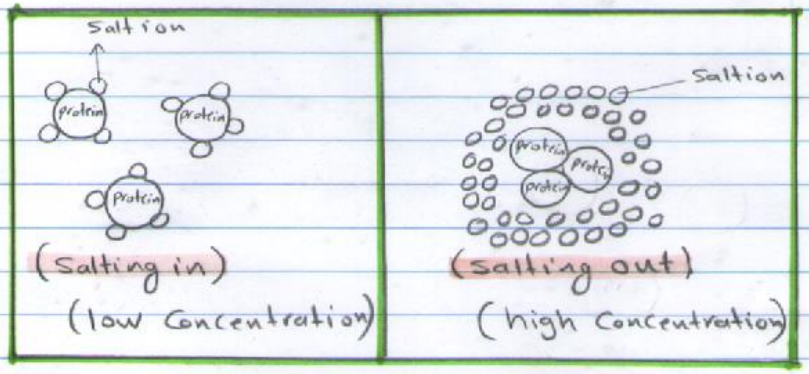
(7) Mineral salts :- There are two phenomena (ظاهرتين) :-

تمليح داخلي **Salting in :-** It is the process of using **low concentration** of salts that leads to an increase in the solubility of the protein due to the stabilization of charged groups.

(* تؤدي الى زيادة ذوبانية البروتين)

Salting out تمليح خارجي :- It is the process of using high Concentration of salts that leads to precipitate ترسيب the protein.

The principle :- Adding the salt ions into the solution in high Concentration Cause the restriction تقييد of the available المتواجدة water molecules.
The interaction التجاذب between proteins molecules is stronger than between the protein and the available water molecules. Which Causes the protein aggregation تجمع and precipitation.



* The degree of precipitation depends on several factors :-

1. The type of Salt. نوع الملح
2. The Concentration of Salt. تركيز الملح
3. The nature of protein. طبيعة البروتين
4. The molecular weight of Protein (الوزن الجزيئي للبروتين)
   (The high M.Wt will precipitate First)

علاقة عكسية

note: There is inverse relationship between the M.wt of protein and the concentration of salt

↓

High M.wt need low Concentration Salt.
Low M.wt need high Concentration Salt

عكسية

note: It is reverse process, the protein can agin become solubile when we add water

مؤذي

Salting precipitation is not harmful for proteins and keep their biological functions.
يحافظ البايولوجية الوظائف

التقنية فصل

* We can use this technique in seperate mixture proteins in medical laboratory.
مزيج المختبرات الطبية

مثلاً: - سيرم الدم يحوي على مجموعة من البروتينات مثل الالبومين والكلوبيولينات نعند استخدام محلول من ملح Na_2SO_3 بتركيز 28% سوف يعمل على اذابة الالبومين (Salting in) وترسيب الكلوبيولينات (Salting out).

(8) Isoelectric point:

The isoelectric point of a protein (pI): is the pH at which a protein has zero net charge.

* In this point the protein will be precipitate.

* This technique used in separate the mixture of proteins have different pI.

The pI of Casein = 4.7
(بروتين الحليب)

(8)

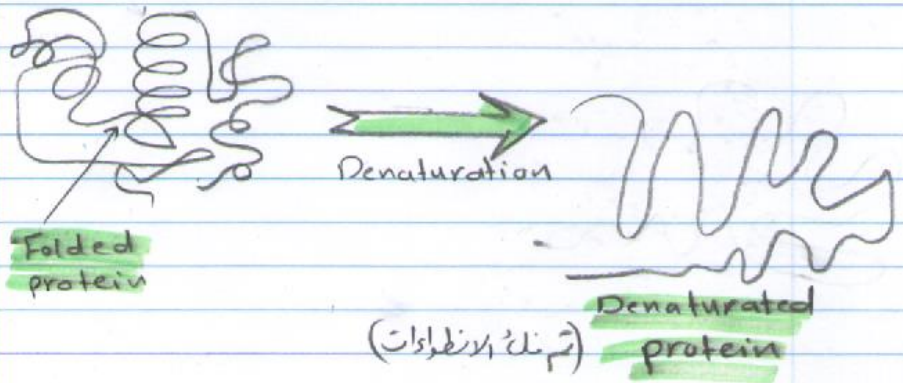
Protein denaturation

Denaturation:- is defined as a major change from the original native state of the protein without alteration of the molecule's primary structure.

Denaturation Factors:-

1- Heat
2- organic solvent.
3- Strong base.
4- Strong acid
5- Irradition such as u.v or x-ray
6- chemicals substance such as urea.

The principle:- Denaturation factors cause destroy weak bond and this will cause to loss the three-dimentional structure and loss its biological activity function and lead to precipitation of protein.



Spectroscopic Techniques in Biochemistry
(الطيفية — تقنية)

The Beer_Lambert law (قانون لامبرت بيير) :- States (ينص) that the quantity (كمية) of light absorbed (الممتص) by (بواسطة) substance (مادة) dissolved in solvent is directly (مباشرة) propotional (تتناسب) to the concentration of the substance and path length (طول المسار) of the light through the solution.

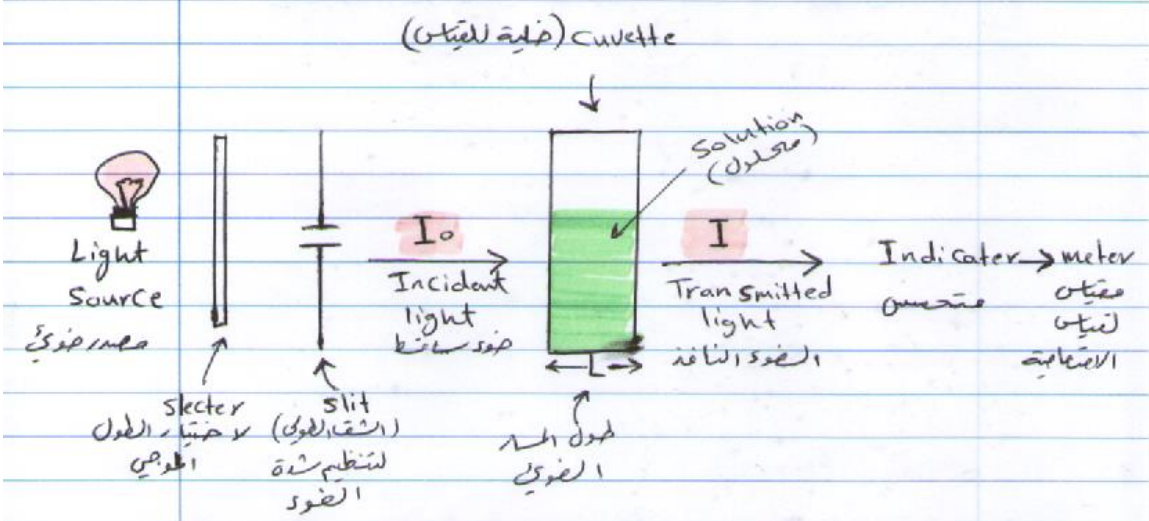
$$A = \varepsilon C L$$

A = Absorbance الامتصاصية

ε = Molar absorption Coefficient معامل الامتصاص المولاري.

C = Molar Concentration التركيز المولاري

L = optical path length طول المسار الضوئي



(مخطط مبسط يوضح جزاء Spectrophotometer من الداخل)

$$A = \log \frac{I_o}{I}$$

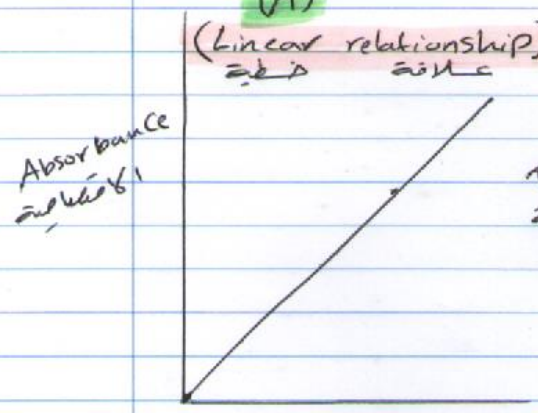
$$T = \frac{I}{I_o}$$

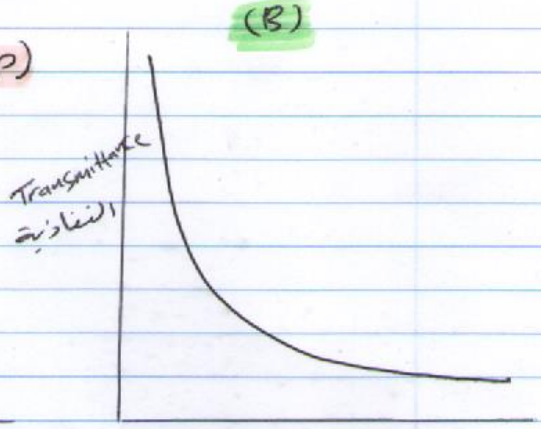
A= Absorbance الامتصاصية

T= Transmittance النفاذية

* ملاحظة :- الماء والهواء امتصاصيتهما صفر والنفاذية لهما تكون ١٠٠

العلاقة
The relationship between :-





A = The Absorbance and Concentration
B = The Transmittance and Concentration.

Blank solution :- A solution that does not contain (يحتوي) a detectable (محسوسة) amount (كمية) of analyte (← المادة المراد تحليلها). (This solution contain all reactant (مواد التفاعل) except (ماعدا) the analyte)

Standard solution :- is a solution containing accurately (← بدقة) known (معلوم) concentration of a substance.

*ملاحظة :- stock solution نقصد به المحلول الأساسي الذي يكون بتركيز عالي ويتم تحضير التراكيز المخففة منه.

There are two methods to measure (لقياس) the concentration of an unknown (مجهول) solution:-

(طريقة القانون)

① **Law method** :-

$$C_{un.K} = \frac{A_{un.K} - A_B}{A_{st} - A_B} \times C_{st}$$

$C_{un.K}$ = The concentration of unknown solution: (المجهولة التركيز)
(ويكون غير معلوم)

A_B = The absorbance of Blank.

A_{st} = The Absorbance of standard solution (المحلول القياسي)

C_{st} = The concentration of standard solution

$A_{un.K}$ = The absorbance of unknown solution

* كل المعلومات في القانون اعلاه تكون موجودة ماعدا تركيز المحلول المجهول.

* الامتصاصية يمكن معرفتها من خلال جهاز (Spectrophotometer)

* ملاحظة: في هذه الطريقة يتم اعتماد standard واحد ويتم المقارنة به.

② standard curve method :- طريقة المنحنى القياسي

في هذه الطريقة يتم تحضير مجموعة من المحاليل القياسية بتراكيز مختلفة.
مثلاً :- نستحضر (stock solution) من محلول (CuSO4.5H2O) الزرقاء
بتركيز 10% ونحضر منه التراكيز (5%، 4%، 3%، 2%، 1%)
ويكون التحضير باستخدام قانون التخفيف العام.

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

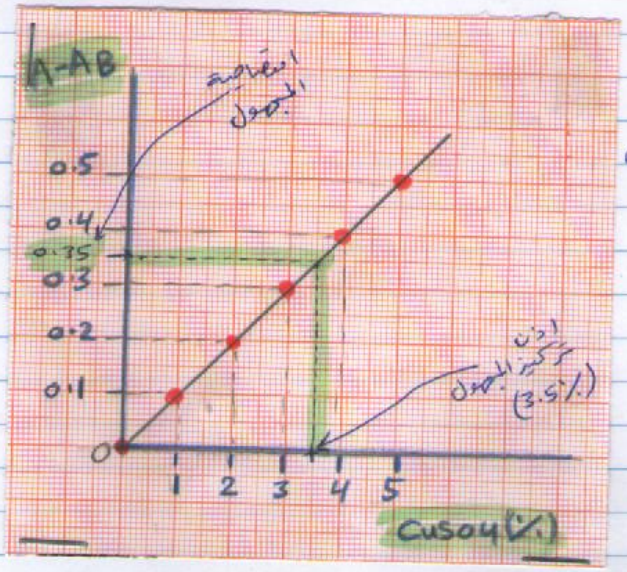
ويتم التخفيف بالمذيب المستخدم في التجربة.

(المثال ادناه يمثل ارقام افتراضية لغرض التوضيح)

Tube number	A	A-AB	$CuSO_4$% (التركيز)
1	0.05	0.05 − 0.05 = 0	0% (Blank)
2	0.15	0.15 − 0.05 = 0.1	1%
3	0.25	0.25 − 0.05 = 0.2	2%
4	0.35	0.35 − 0.05 = 0.3	3%
5	0.45	0.45 − 0.05 = 0.4	4%
6	0.55	0.55 − 0.05 = 0.5	5%
7	0.40	0.40 − 0.05 = 0.35	unknown (المجهول)

← امتصاصية البلانك

← تقاس بالجهاز



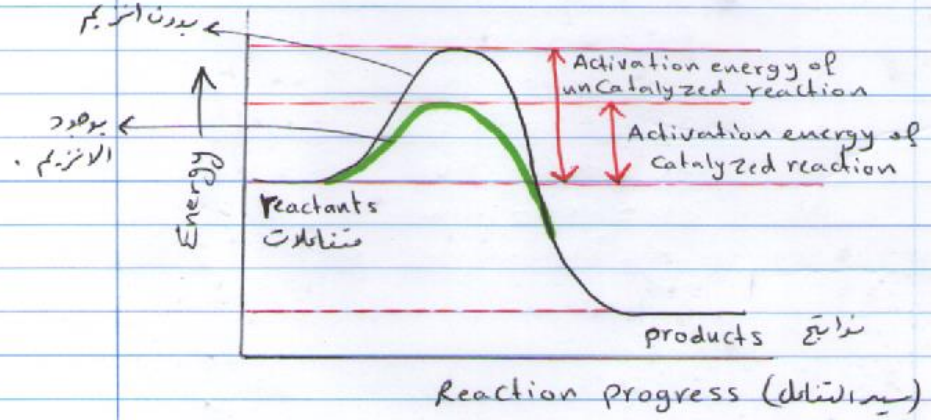
يتم تسقيطها على المنحنى لاستخراج التركيز

Enzymes

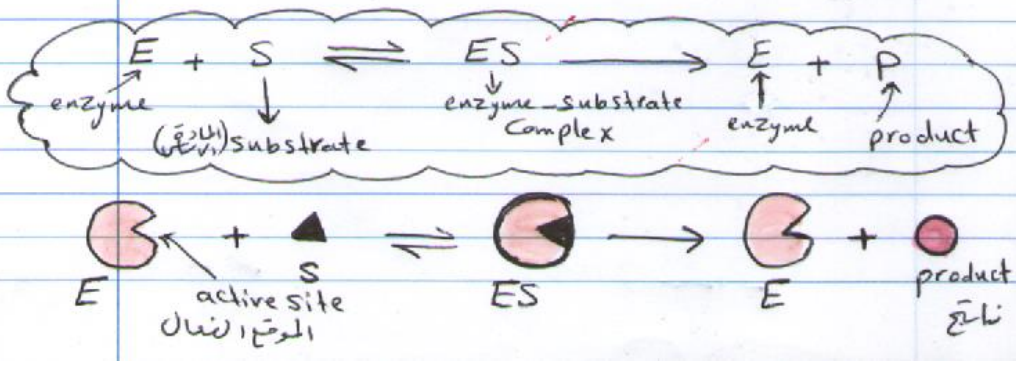
م.م زينب مكي دهام
2021/7/13

Enzymes :- are proteins that acts as a Catalyst in living organisms, regulating the rate at which Chemical reactions without itself being altered in the process.

الانزيمات :- هي بروتينات تعمل كعوامل مساعدة في الكائنات الحية لتنظيم التفاعلات الكيميائية دون تغيير نفسها بعد التفاعل.



* نلاحظ من الرسم اعلاه وجود الانزيم ادى الى خفض طاقة التنشيط اللازمة لحدوث التفاعل وتحويل المتفاعلات الى نواتج.



Active site :- is the region of an enzyme (منطقة) where substrate molecules bind (ترتبط) and undergo (تحدث) a chemical reaction.

*ملاحظة :- لكل انزيم خصوصية ، توجد قسم من الانزيمات بموقع فعال واحد واخرى يوجد لديها اكثر من موقع فعال. مثل انزيم urease يحتوي اربع مواقع فعالة.

α-amylase

هذا الانزيم موجود في اللعاب ويتم افرازه من الغدد اللعابية عند الانسان وظيفته المساعدة على هضم الكاربوهيدرات والنشويات وتحويلها الى سكريات بسيطة ، ايضاً يفرز الانزيم من البنكرياس ليساعد في هضم النشويات التي لم يتم تحللها في الفم ، ليتم هضمها في الامعاء.

* تم اشتقاق اسم الانزيم نسبة الى المادة الاساس التي يعمل عليها وهي النشأ (Starch) الذي يتألف من الاميلوز والاميلوبكتين

ملاحظة المقطع ase موجود نهاية اسم كل انزيم.

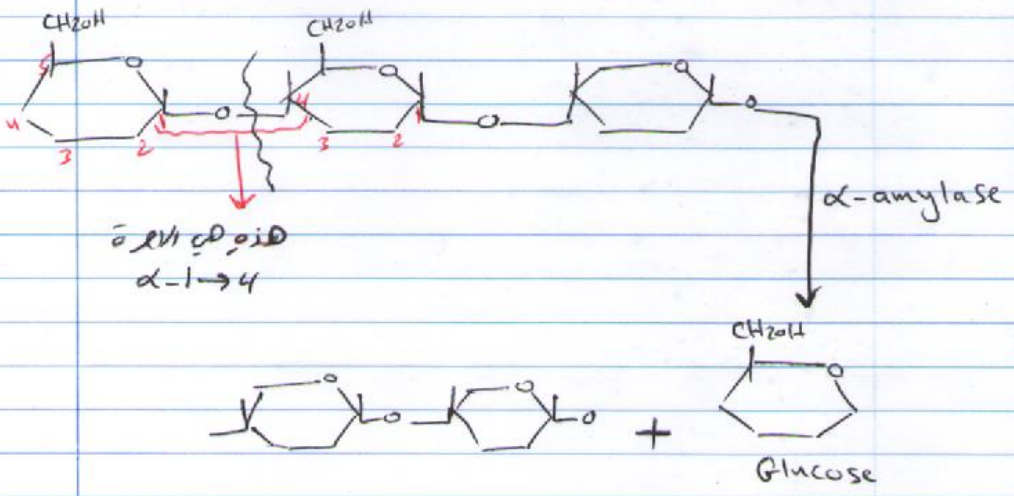
Starch (substrate)
المادة الاساس التي
يعمل عليها الانزيم

α-amylase

سكر ثنائي (سكر الشعير) maltose (Intermediate Compound)
مركب وسطي .

سكر احادي Glucose (product) .
الناتج

* يعمل الانزيم على تحليل الآصرة من نوع α-1→4 الموجودة في Starch.



* وهكذا يستمر تكسير الاواصر من نوع α1→4 الى ان يتم تحلل Starch.

* يعتبر الكلور (Cl) منشط activator لهذا الانزيم.

* يعمل هذا الانزيم في pH = 7
* يعمل هذا الانزيم في درجة حرارة 37C°.

* ممكن ان نعبر عن عمل الانزيم بمصطلح فعالية، ويمكن تعريف فعالية انزيم α-amylase كالاتي :-

(كمية α-amylase اللازمة لتحطيم 5 mg من النشا خلال 15 دقيقة وفي ظروف قياسية) وتعرف هذه الوحدة (Somogi unit/100ml) نسبة الى العالم الذي اكتشفها.

α-amylase activity :- The amount of α-amylase which will destroy 5 mg of starch in 15 min in standard conditions.

ملاحظة :- انزيم α-amylase ممكن أن يحلل الـ glycogen لانه يحوي على الاصرة α1→4
بينما الانزيم لايعمل على السيليلوز لانه يحوي على الاصرة من نوع β1→4

---

* The rate (سرعة) of an enzyme (reaction) ↑ dependent (تعتمد) upon the following factors :-

1- Temperature
2- pH
3- substrate Concentration
4- Enzyme Concentration
5- Time.
6- The Inhibitors (المثبطات) and activators (المنشطات).

* كل انزيم يعمل في درجة حرارة مثلى له وفي حالة رفع درجة حرارة الوسط الذي يعمل به الانزيم عن الدرجة المثلى يؤدي الى تمسخ الانزيم وفقدان وظيفته البايولوجية.

* كل انزيم يعمل في pH امثل له وفي حال تغير pH الوسط الذي يعمل به الانزيم سوف يؤدي الى حدوث تغير في الموقع الفعال مما يؤدي الى تأثر فعالية الانزيم.

The effects of Substrate Concentration on enzymatic reaction

تجربة تأثير تركيز المادة الاساس على سرعة التفاعل الانزيمي.

Tube number	1	2	3	4	5	6	7
Volume of starch 1%	0.1ml	0.2ml	0.4ml	0.8ml	1.6 ml	2ml	—
Volume of H_2O لاكمال الحجم	1.9 ml	1.8 ml	1.6 ml	1.2 ml	0.4 ml	—	2 ml
Final Concentration of starch	0.05%	0.1%	0.2%	0.4%	0.8%	1%	Zero (Blank)
NaCl منشط للانزيم	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
α-amylase	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

Incubation all tubes at 37°C for 10 min

↓

Then add the following

NaoH	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
DNS	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

↓

Then boiling For (3 min)

↓

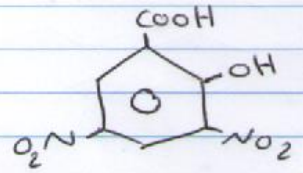
Read the Abs at $\lambda = 540nm$

* الغرض من التجربة ايجاد Km ، Vmax اعتمادا على معادلة ميكالس-منتن ومعادلة لينوفر-بيرك

* تم اضافة NaOH لايقاف التفاعل الانزيمي من خلال تغيير pH الوسط من التعادل الى القاعدي وبذلك يتوقف عمل الانزيم .

* تم اضافة DNS كمكاشف لوني ، لتقدير كمية السكر المتكون من التفاعل الانزيمي .

DNS :- 3,5-dinitrosalicylic acid.



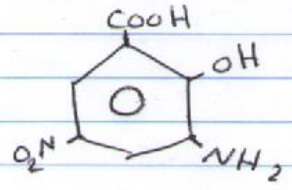
هذا المركب عامل مؤكسد له القابلية على التفاعل مع السكريات المختزلة .

Starch $\xrightarrow{\alpha\text{-amylase}}$ Glucose

+

DNS (مادة صفراء اللون)

Yellow



3-amino,5-Nitrosalicylic acid.

(مادة برتقالية اللون)

orange

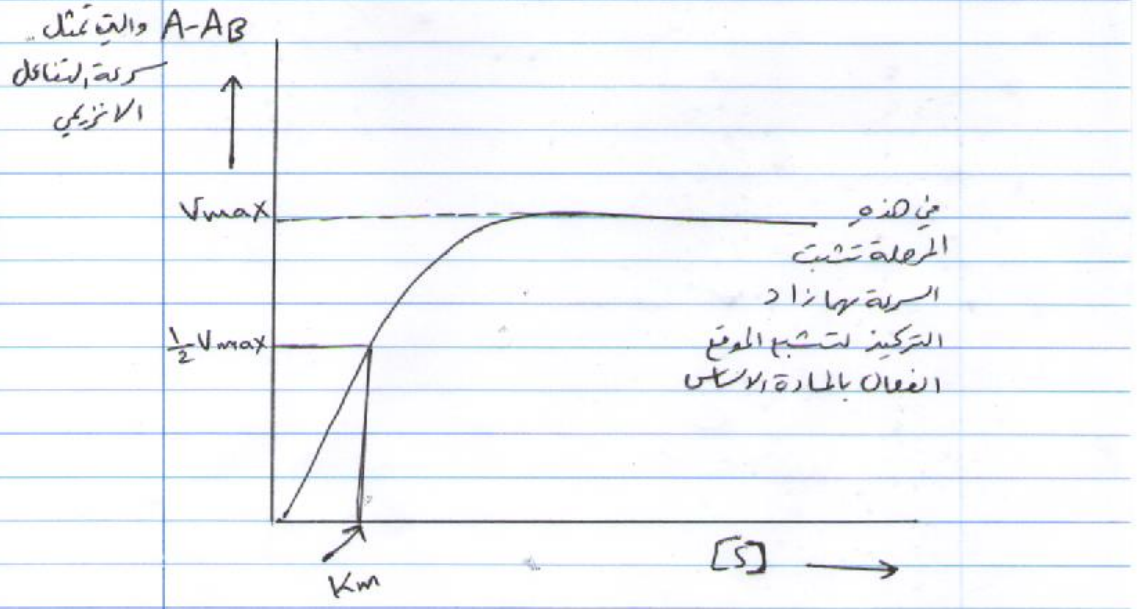
1- Michaelis - Menten equation :

$$V = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]}$$

- V_{max} ← السرعة القصوى
- V ← سرعة التفاعل الانزيمي
- K_m ← ثابت ميكالس - منتن
- $[S]$ ← تركيز المادة الاساس

Km = is the Concentration of substrate at which $V = \frac{1}{2} V_{max}$, and it's not equilibrium Constant.

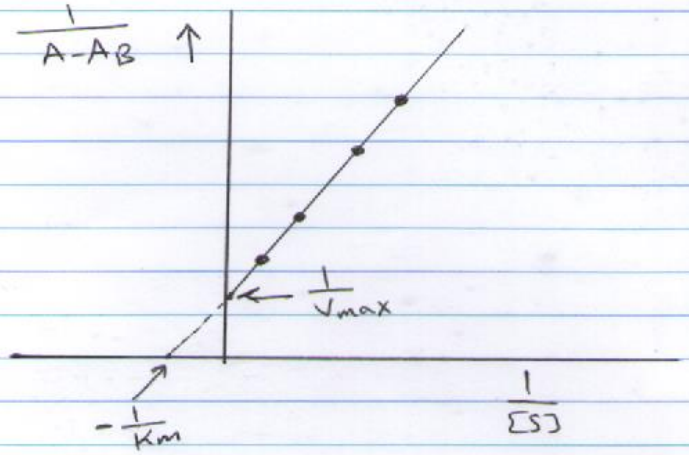
Vmax = is the maximum velocity of the enzymatic reaction, and at this velocity any increase in the substrate Concentration will not increase it.
(maximum velocity: السرعة القصوى)



2- Lineweaver-Burk equations معادلة لينوفر-بيرك

وهذه المعادلة هي مقلوب لمعادلة ميكالس-منتن.

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{Vmax} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax}$$



* يعتبر Km ثابت يميز لكل انزيم وهو دليل على الفة الانزيم للمادة الاساس والعلاقة بينهما عكسية.
كلما كان Km قليل يعني للانزيم الفة عالية للمادة الاساس.

* ملاحظة * المعادلة اعلاه يمكن اشتقاقها مباشرة من معادلة ميكالس منتن بكل سهولة من خلال قلب المعادلة فقط. فيمكن للطالب حفظ معادلة ميكالس فقط واستنتاج معادلة لينوفر بيرك بالاشتقاق.

مثال توضيحي

IF you have the following data are shown in the table below.

اذا كانت لديك المعلومات في الجدول ادناه

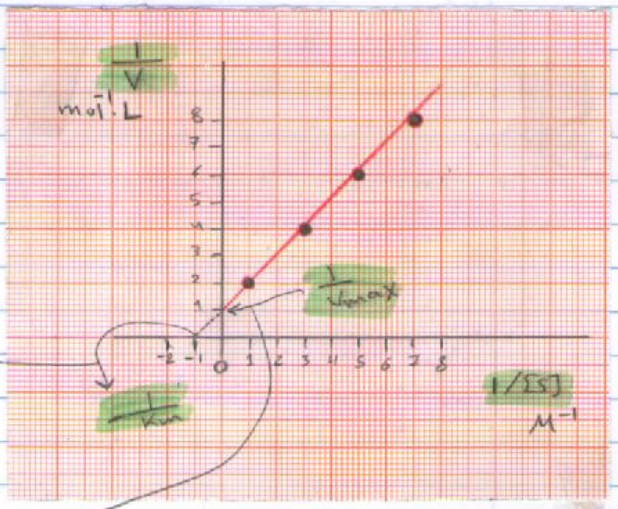
[S] M	V mole/L
1	0.5
0.333	0.25
0.2	0.166
0.142	0.125

عين Km و Vmax برسم بياني باستخدام معادلة لينوفر - بيرك .

Determine Km and Vmax graphically by Lineweaver_Burk equation.

الحل

[S] M	V mole/L	1/[S] M^{-1}	1/V $mol^{-1}.L$
1	0.5	1	2
0.333	0.25	3	4
0.2	0.166	5	6
0.142	0.125	7	8



$-\frac{1}{Km} = -1$

$Km = 1\ M^{-1}$

$\frac{1}{Vmax} = 1$

$Vmax = 1\ mol^{-1}.L$