

TÉMA	BIELKOVINY
Úloha 2:	<i>Izolácia kazeínu z mlieka</i>
Princíp:	<i>Kazeín je hlavnou bielkovinovou zložkou mlieka (tvorí až 80 % mliečnych proteínov), kde sa nachádza vo forme vápenatej soli. Patrí do skupiny fosfoproteínov a vyznačuje sa veľmi nízkym zastúpením prvkov sekundárnej štruktúry. V mlieku vytvára suspenziu častíc (tzv. kazeínové micely), v ktorých sú jednotlivé makromolekuly kazeínu stabilizované hydrofóbnymi interakciami a iónmi vápnika. Okyslením silnou kyselinou (napr. HCl) na hodnotu svojho izoelektrického bodu (pI 4,6) dochádza k destabilizácii kazeínových miciel, výsledkom čoho je precipitácia kazeínu.</i>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. mlieko 2. 10 % roztok kyseliny chlorovodíkovej 3. 96 % etanol (denaturovaný)
Materiál:	centrifúga, centrifugačné skúmavky, gáza alebo obväz, sklenená tyčinka, mikropipety, kadička s objemom 100 ml
Postup:	50 ml mlieka centrifugujeme 10 minút pri 3000 otáčkach za minútu (ot/min), čo pri nami použitom rotore odpovedá 1000 g (RCF = <i>relative centrifugal force</i>). Vylúčený tuk odstránime prefiltrovaním mlieka cez kúsok gázy do kadičky s objemom 100 ml. Následne k mlieku pridávame 10 % HCl, a to po kvapkách za stáleho miešania sklenenou tyčinkou do vytvorenia vločkovitej zrazeniny (spotreba je približne 1 ml HCl, ak použijeme nadbytok HCl, zrazenina sa začne znova rozpúšťať). Suspenziu prelejeme do centrifugačnej skúmavky a odstreďujeme 10 minút pri 3000 ot/min (1000 g). Supernatant (roztok nad zrazeninou) zlejeme, zrazeninu premyjeme priamo v centrifugačnej skúmavke destilovanou vodou (25 ml) a opäť odstreďujeme. Vodu zlejeme, zrazeninu kazeínu rozmiešame s 25 ml 96 % etanolu, väčšie kúsky rozdrobíme a znova centrifugujeme. Po odstredení zlejeme etanol a kazeín necháme voľne schnúť na filtračnom papieri. Na ďalšom cvičení kazeín odvážime a jeho hmotnosť zapíšeme do protokolu.
Záver:	Uvedieme množstvo vyizolovaného kazeínu (v gramoch na 50 ml mlieka).
Úloha 3:	<i>Stanovenie koncentrácie bielkoviny Lowryho metódou</i>
Princíp:	<i>Lowryho metóda je jeden z najčastejšie využívaných spôsobov stanovenia koncentrácie bielkovín. V prvom kroku bielkovina reaguje s mednatými iónmi v alkalickej prostredí, pričom dochádza k ich redukcii na medné ióny. Následne dochádza účinkom medných iónov k redukcii kyseliny fosfomolybdeno-fosfovolfrámovej, ktorá je súčasťou Folinovho činidla. Finálny produkt tejto reakcie má modré sfarbenie. Jeho intenzita závisí od koncentrácie bielkoviny v roztoku. Množstvo bielkoviny vo vzorke sa určí na základe hodnoty nameranej absorpcie pri 750 nm.</i>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. roztok A: 2 % uhličitan sodný v 0,1 M hydroxide sodnom 2. roztok B: 0,5 % pentahydrát síranu mednatého v 1 % tetrahydráte vínanu sodnodraselného (roztoky A, B zmiešame max. 4 hod. pred cvičením v pomere 50:1) 3. Folinovo činidlo (kyselina fosfomolybdeno-fosfovolfrámová) 4. štandardný roztok bielkoviny (hovädzí albumín) s koncentráciou 50 mg/100 ml 5. vzorka bielkoviny s neznámou koncentráciou

Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nadstavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka						
Postup:	Do šiestich označených skúmaviek pipetujeme sklenenými pipetami štandardný roztok hovädzieho albumínu podľa tabuľky 1.8 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do siedmej skúmavky pipetujeme namiesto štandardu 1 ml roztoku bielkoviny s neznámou koncentráciou (do zošita nezabudneme zapísať číslo vzorky).						
TABUĽKA 1.8	0	1	2	3	4	5	vzorka
štandard albumínu [ml]	–	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	–
neznáma vzorka [ml]	–	–	–	–	–	–	1
destilovaná H ₂ O [ml]	1	0,95	0,90	0,75	0,50	0,25	–
A + B (50:1) [ml]	5	5	5	5	5	5	5
	premiešať nechať 10 min reagovať						
Folinovo činidlo [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	premiešať nechať 30 min reagovať určiť absorbanciu pri 750 nm						
množstvo bielkoviny v skúmavke [mg]	0	0,025	0,050	0,125	0,250	0,375	x
absorbancia pri 750 nm	–						
Vyhodnotenie:	Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5) zostrojíme kalibračný graf (závislosť absorbancie štandardného roztoku hovädzieho albumínu pri 750 nm od jeho množstva v roztoku). Na tento účel je vhodný bežne dostupný program MS Excel. Body na grafe preložíme priamkou v tvare $y = ax$, kde x predstavuje množstvo bielkoviny v skúmavke, y je nameraná hodnota absorbancie pri 750 nm a člen a je konštanta. Množstvo bielkoviny x (v mg na 1 ml vzorky) vypočítame dosadením hodnoty absorbancie vzorky za y v uvedenej rovnici. Zistené množstvo porovnáme so skutočnou hodnotou a vypočítame relatívnu chybu (v %).						
Záver:	Uvedieme koncentráciu bielkoviny vo vzorke (v mg/ml) spolu s relatívnou chybou.						