

TÉMA	BIELKOVINY						
Úloha 4:	Stanovenie izoelektrického bodu ľudského albumínu						
Princíp:	Jedným z možných spôsobov stanovenia izoelektrického bodu bielkovín (pI) je zistiť hodnotu pH, pri ktorej je bielkovina najmenej rozpustná vo vode. Pri tomto pH sa celkový náboj bielkoviny rovná nule a ľahko sa vyzráža, čo sa prejaví zvýšením turbidity (zakalenia) roztoku. Vyzrážanie bielkoviny sa urýchli pridaním vhodných dehydratačných prostriedkov, napr. etanolu alebo acetónu. Vzniknutý zákal je možné kvantifikovať meraním optickej hustoty roztoku pri určitej vlnovej dĺžke. Čím viac je roztok zakalený, tým vyššia je hodnota optickej hustoty. Dôvodom je rozptyl žiarenia na vyzrážaných bielkovinových časticiach.						
Reagencie:	1. 0,1 M octan sodný 2. 0,4 % roztok ľudského albumínu (0,4 g ľudského albumínu rozpustíme za tepla v 10 ml 0,1 M CH ₃ COONa a doplníme na objem 100 ml destilovanou vodou) 3. 0,1 M kyselina octová 4. 1 M kyselina octová 5. 96 % etanol						
Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nastavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka						
Postup:	Do série šiestich skúmaviek pipetujeme roztoky podľa nasledujúcej tabuľky:						
TABUĽKA 1.9		1	2	3	4	5	6
0,1 M CH ₃ COONa	[ml]	1	1	1	1	1	1
0,1 M CH ₃ COOH	[ml]	0,12	0,25	0,5	1	2	–
destilovaná H ₂ O	[ml]	1,88	1,75	1,5	1	–	1,6
1 M CH ₃ COOH	[ml]	–	–	–	–	–	0,4
		premiešať					
0,4 % albumín	[ml]	1	1	1	1	1	1
etanol	[ml]	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
		premiešať nechať 10 min stáť určiť optickú hustotu pri 540 nm referenčná kyveta obsahuje destilovanú vodu					
pH		5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
optická hustota pri 540 nm							
	Za izoelektrický bod albumínu sa považuje pH hodnota, pri ktorej má roztok najvyššiu hodnotu optickej hustoty.						
Vyhodnotenie:	Zostrojíme závislosť optickej hustoty pri 540 nm od pH. Body na grafe preložíme polynómom druhého, príp. tretieho stupňa.						
Záver:	Uvedieme nami zistenú hodnotu izoelektrického bodu ľudského albumínu.						