

TÉMA	BIELKOVINY
Úloha 5:	Frakcionácia bielkovín vaječného bielka
Princíp:	<p>Jednou z najčastejšie používaných metód na frakcionáciu zmesi bielkovín je ich postupné zrážanie zvyšovaním iónovej sily roztoku pridávaním neutrálnych anorganických solí pri vhodnom pH. Tento postup je výhodný najmä pre veľké objemy a bielkoviny sa nenedenaturujú pri vysokých koncentráciách solí. Získaná zrazenina bielkoviny však obsahuje vysoké percento soli, ktorá sa musí odstrániť zdlhovou dialýzou. Na zrážanie (vysoľovanie) bielkovín sa takmer výlučne používa dobre rozpustný síran amónny. Iné soli (chlorid sodný, síran sodný, fosfáty, atď.) sa používajú len v zvláštnych prípadoch. Koncentrácia síranu amónneho sa vyjadruje stupňom nasýtenia (saturácia) roztoku; nasýtený roztok má stupeň sýtenia 1. Vyjadrovanie saturácie v percentách môže viesť k zámene s hmotnostným zlomkom (w), ktoré vyjadruje množstvo látky v gramoch na 100 g roztoku.</p> <p>Koncentrácia síranu amónneho sa zvyšuje pridaním buď nasýteného roztoku, alebo pevnej soli. Prvý spôsob je jednoduchší a zaručuje rovnomernejšie zvyšovanie koncentrácie, ale dá sa použiť len pre nižšie stupne nasýtenia. Druhý spôsob dovoľuje dosiahnuť vyššie stupne nasýtenia. Soľ je potrebné pridávať po malých množstvách a vyčakať, až sa rozpustí, aby sa roztok sýtil rovnomerne. Po pridaní celého vyrátaného množstva síranu amónneho necháme roztok vždy určitú dobu postáť, aby zrážanie prebehlo kvantitatívne. Len potom zrazeninu odcentrifugujeme alebo odfiltrujeme. Jednoduchým príkladom popísanej metódy je frakcionácia ovoglobulínov a ovoalbumínu vaječného bielka. Nasýtením roztoku bielka do stupňa 0,5 sa vyzráža globulínová frakcia, albumín ostáva v roztoku. Albumín sa vyzráža nasýtením filtrátu do stupňa 0,9.</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. vaječný bielok 2. nasýtený roztok síranu amónneho (536,34 g síranu na 1000 ml roztoku pri 20 °C, čo predstavuje 4,06 M roztok) 3. kryštalický síran amónny 4. koncentrovaná kyselina octová
Materiál:	univerzálne indikátorové papieriky pre pH 0 – 12, kadička s objemom 100 ml, odmerný valec s objemom 50 ml, pinzeta, lyžička, sklenená tyčinka, centrifugačné skúmavky, centrifúga, gáza
Postup:	<p>Bielko oddelíme od žltka a pinzetou z neho odstránime hrubé častice. Odmerným valcom odmeriame 25 ml bielka a prelejeme do kadičky. Po malých dávkach a za neustáleho miešania k nemu pridávame rovnaký objem (25 ml) nasýteného roztoku síranu amónneho a miešame ďalších 5 minút. Roztok so zrazeninou (ovoglobulíny) prelejeme do centrifugačnej skúmavky a centrifugujeme 10 minút pri 3000 ot/min (1000 g). Supernatant obsahujúci ovoalbumín prelejeme cez gázu do odmerného valca a stanovíme jeho objem. Zrazeninu ovoglobulínov odstránime.</p> <p>Pokračujeme tým, že upravíme pH supernatantu (ovoalbumín) koncentrovanou kyselinou octovou na hodnotu približne 5 (4 – 6 kvapiek kyseliny na 40 – 45 ml supernatantu). Potom do tohto roztoku pridáme za stáleho miešania vypočítané a navážené množstvo kryštalického síranu amónneho (30 g síranu na 100 ml supernatantu). Po jeho úplnom rozpustení necháme suspenziu stáť najmenej 30 minút. Vytvorenú zrazeninu ovoalbumínu centrifugujeme 10 minút pri 6000 ot/min (4000 g). Supernatant zlejeme a zrazeninu rozpustíme v 30 ml</p>

	destilovanej vody. Odmeriame celkový objem tohto roztoku a hodnotu zapíšeme do zošita. V prípade potreby roztok prefiltrujeme a maximálne 15 ml z neho prelejeme do dialyzačnej trubice s membránou, ktorú ponoríme do kadičky s objemom 600 ml obsahujúcej destilovanú vodu (viď úloha 6).
Úloha 6:	Dialýza bielkovín
Princíp:	<i>Dialýza patrí k najjednoduchším biochemickým metódam separácie látok na základe rôznej veľkosti ich molekúl. Využíva difúziu nízkomolekulových látok cez polopriepustnú membránu (nepriepustnú pre veľké molekuly) z roztoku s vyššou koncentráciou do roztoku s nižšou koncentráciou. Molekuly bielkovín, ktorých častice majú rozmery od niekoľko nanometrov do 200 nm, majú v roztoku niektoré vlastnosti koloidov, t.j. ich častice neprechádzajú pre svoju veľkosť otvormi dialyzačných membrán. Dialýza umožňuje v biochémii napr. jednoduché oddelenie solí od roztoku bielkovín (pri vysolovaní bielkovín síranom amónnym). Najčastejšie sa využíva tam, kde chceme vysokomolekulové látky zbaviť nízkomolekulových nečistôt. V minulosti sa k príprave membrán využívali koloidum, celofán alebo membrány zvieracieho pôvodu (črevá, vaječná blanka, mechúry). V súčasnej dobe sú komerčne dostupné umelé membrány v tvare dlhej trubice rôzneho priemeru a s vhodnou veľkosťou pórov.</i>
Reagencie:	1. 1 M dusičnan bárnatý 2. roztok ovoalbumínu z úlohy 5
Materiál:	dialyzačná trubica s membránou, kadička s objemom 600 ml, magnetické miešadlo, stojan
Postup:	15 ml roztoku ovoalbumínu z úlohy 5 prenesieme do dialyzačnej trubice, ktorú upevníme k laboratórnemu stojanu a ponoríme do kadičky s destilovanou vodou. Rýchlosť dialýzy závisí od koncentračného spádu (na začiatku je najrýchlejšia, postupne sa spomaľuje), počtu a veľkosti pórov v membráne, hrúbky membrány, elektrických vzťahov medzi membránou a difundujúcimi časticami, ďalej od veľkosti plochy membrány a objemu roztoku, od teploty. Počas dialýzy vodu v kadičke miešame pomocou magnetického miešadla, čím dialýzu urýchľujeme. Priebeh dialýzy môžeme sledovať zrážaním síranových aniónov dusičnanom bárnatým vo vode: $\text{SO}_4^{2-} + \text{Ba}^{2+} \rightarrow \text{BaSO}_4(\text{s})$ Asi po hodinovej dialýze roztok použijeme na stanovenie koncentrácie bielkovín biuretovou metódou (viď úloha 7).
Úloha 7:	Stanovenie koncentrácie bielkovín biuretovou metódou
Princíp:	<i>Biuretovu reakciu dávajú peptidy a bielkoviny v dôsledku prítomnosti peptidových väzieb (–CO–NH–). Je pomenovaná podľa zlúčeniny biuret, ktorá dáva rovnaké fialové sfarbenie ako bielkoviny a peptidy. Reakcia je založená na tvorbe tetraamóniovej soli s komplexne viazanou meďou. Metóda je rýchla a spoľahlivá. Výsledky pre jednoduché roztoky bielkovín sú v dobrej zhode s výsledkami iných metód. V prípade skúmania vzoriek s vyšším obsahom lipidov sú namerané hodnoty o niečo vyššie ako hodnoty zodpovedajúce skutočnému stavu. V tom prípade sa odporúča vzorku prečistiť napr. vyzrážaním.</i>
Reagencie:	1. biuretové činidlo 2. štandardný roztok sérovej bielkoviny (ľudský albumín) s koncentráciou 1 g/100 ml 3. dialyzovaná vzorka vaječnej bielkoviny
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 ľudského albumínu podľa tabuľky 1.10 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do siedmej skúmavky pipetujeme namiesto štandardu 1 ml roztoku dialyzovanej bielkoviny z úlohy 6 . V prípade vysokej hodnoty absorbančie môžeme vzorku primerane riediť.						
TABUĽKA 1.10	0	1	2	3	4	5	vzorka
štandard albumínu [ml]	–	0,2	0,6	1	1,5	2	–
dialyzovaná vzorka [ml]	–	–	–	–	–	–	1
destilovaná H ₂ O [ml]	2	1,8	1,4	1	0,5	–	1
biuretové činidlo [ml]	4	4	4	4	4	4	4
	premiešať nechať 20 min reagovať určiť absorbančiu pri 540 nm						
množstvo bielkoviny v skúmavke [mg]	0	2	6	10	15	20	x
absorbančia pri 540 nm	–						
Vyhodnotenie:	Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5) zostrojíme kalibračný graf (závislosť absorbančie štandardného roztoku ľudského albumínu pri 540 nm od množstva) a z neho určíme množstvo ovoalbumínu v mg na 1 ml dialyzovanej vzorky (x) . Vypočítame celkové množstvo ovoalbumínu (v mg) vo vaječnom bielku (vynásobením hodnoty odčítanej z grafu objemom roztoku ovoalbumínu po pridaní destilovanej vody na rozpustenie zrazeniny pred dialýzou). Túto hodnotu vydáme objemom použitého bielka (25 ml), čím získame koncentráciu ovoalbumínu v bielku (v mg/ml).						
Záver:	Uvedieme koncentráciu ovoalbumínu vo vaječnom bielku (v mg/ml).						