

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.4

Izolace laktalbuminu a dialýza

Jméno:	
Obor:	Datum provedení:

TEORETICKÝ ÚVODIzolace α -laktalbuminu

Mléko obsahuje několik proteinů zahrnující kaseiny (fosfoproteiny), β -laktoglobulin, α -laktalbumin, albumin a imunoglobuliny. α -laktalbumin má molekulovou hmotnost 14,2 kDa a obsahuje 129 aminokyselin. V mléku se vyskytuje v koncentraci kolem 1 mg/ml a je nezbytnou komponentou systému pro syntézu laktózy. Abundantní proteiny mléka jsou kaseiny. Ty mohou být odstraněny precipitací okyselením mléka na pH 4.6 při zvýšené teplotě a následnou centrifugací. Zbývající supernatant nazývaný syrovátkou obsahuje převážně α -laktalbumin (14 kDa) a β -laktoglobuliny. Tyto proteiny mohou být následně od sebe odděleny pomocí gelové chromatografie.

Gelová chromatografie

Gelová chromatografie patří mezi základní chromatografické metody, kdy vlastní technika je založená na dělení molekul především podle jejich velikosti, i když tvar a hydratace molekuly mají také určitý vliv. Jako stacionární fáze se používají porézní gelové částice s definovanou velikostí pórů sloužící jako molekulové síto. Molekuly větší než póry gelu nemohou pronikat do pórů a procházejí přes kolonu, zatímco malé molekuly pronikají do pórů gelu. Velké molekuly tedy procházejí kolonou rychleji, malé poté pomaleji, i když v praxi se mohou také uplatňovat i jiné interakce mezi částicemi (adsorpční, polární, apod.). Separované látky se v rámci separace na koloně rozdělují podle rozdělovacího koeficientu K_d (1), kdy u malých molekul se blíží jedné a u velkých molekul 0.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.4
Izolace laktalbuminu a dialýza

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_s} \quad (1)$$

V_e – eluční objem

V_0 – objem mobilní fáze

V_s – objem kapaliny v pórech

V této úloze bude pomocí gelové chromatografie izolován α -laktalbuminu (14 kDa). Proteiny bude separován na Sephadexu-G50, jednom z nejpoužívanějších gelů, který je tvořen dextranskem zesíťovaným pomocí epichlorhydrinu.

Dialýza

Dialýza využívá difúze nízkomolekulárních látek přes dialyzační membránu s definovanou velikostí pórů, která je nepropustná pro látky s molekulovou hmotností vyšší, než je velikost pórů. Hnací silou dialýzy je koncentrační gradient dialyzované látky. V okamžiku, kdy se koncentrace látek procházejících membránou na obou stranách vyrovnají, se proces zastaví. Rychlost dialýzy závisí na koncentračním spádu (zpočátku je nejrychlejší, postupně se zpomaluje), který je především určen poměrem objemů roztoků látky vně a uvnitř membrány. Rychlost dialýzy dále závisí na teplotě, velikosti pórů, na síle membrány a na velikosti její plochy. Průběh dialýzy velmi urychluje míchání a častá výměna vnější kapaliny (dialyzátu). Dokonalé odstranění nízkomolekulárních látek dialýzou trvá až několik desítek hodin.

V této úloze bude dialýzou rozdělena směs dvou barevných látek - Blue Dextranu (rozpuštěný barevný derivát dextranskem s relativní molekulovou hmotností cca 2.000.000) a hexakvanoželezitanu (relativní molekulová hmotnost = 376,37).

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.4
Izolace laktalbuminu a dialýza

PRAKTICKÁ ČÁST

A. Dialýza

Postup práce:

Stanovení miligramového absorpčního koeficientu hexakynoželezitanu

1. Odeberte 5 ul roztoku hexakynoželezitanu a doplňte objem vzorku (pipetou) destilovanou vodou na 1 ml.
2. Změřte absorbanci vzorku při vlnové délce 420 nm proti vodě. Naměřenou hodnotu absorbance zapište.

Vyhodnocení:

Vypočtete miligramový absorpční koeficient hexakynoželezitanu (délka optické dráhy byla 1 cm) a, doplňte fyzikální rozměr:

A_{420}	$c \text{ (mmol.l}^{-1}\text{) K}_3\text{[Fe(CN)]}_6$	ϵ

Dialýza

1. Smíchejte 0,5 ml roztoku Blue Dextranu a 0,5 ml (nezředěného) roztoku hexakynoželezitanu.
2. Dialyzační trubici uzavřete na jednom konci svorkou a naplňte připraveným vzorkem. Uzavřete i druhý konec trubice svorkou, vložte ji do kádinky naplněné 200 ml vody a míchejte na elektromagnetické míchače.
3. Každých 15 minut odeberte z kádinky cca 1 ml dialyzátu, změřte jeho absorbanci při vlnové délce 420 nm proti vodě (odebraný vzorek vraťte zpět do kádinky).
4. Po 2 hodinách pozorujte barvu vzorku uvnitř dialyzační trubice a barvu roztoku v kádince.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.4
Izolace laktalbuminu a dialýza

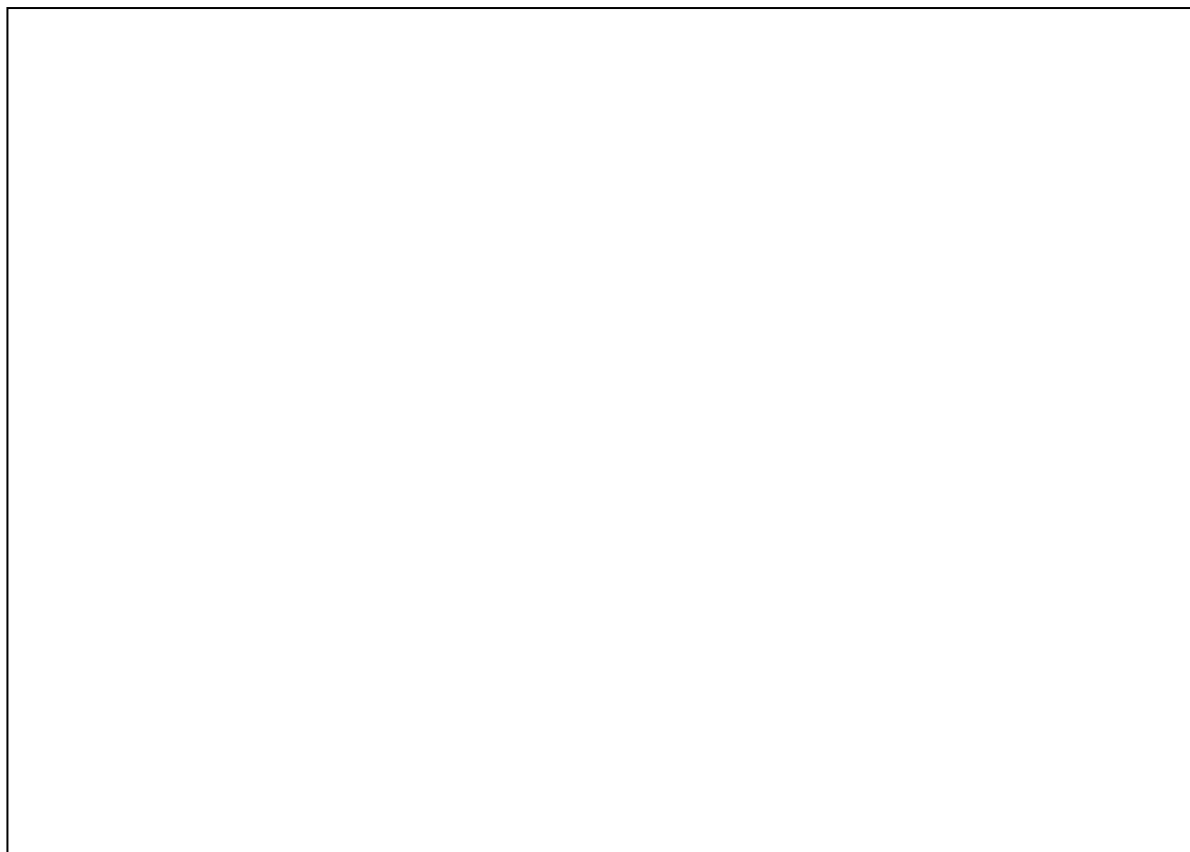
Vyhodnocení:

Čas [min]	A ₄₂₀
0	
15	
30	
45	
60	
75	
90	
105	
120	

Do grafu zakreslete průběh dialýzy (závislost A₄₂₀ na době dialýzy) a popište.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.4
Izolace laktalbuminu a dialýza



B. Příprava syrovátky

Postup práce:

1. Odměřte do 50 ml centrifugační zkušavky 25 ml polotučného mléka a centrifugujte 15 minut při 7 500 x g (centrifuga Eppendorf).
2. Po stočení odstraňte lipickou vrstvu plavající nahoře a supernatant odlijte do malé 50 ml kádinky.
3. Pomocí kyseliny chlorovodíkové upravte pH supernatantu na hodnotu 4.6 ve dvou krocích:
 - a) Nejprve upravte pH na hodnotu přibližně 5 pomocí 5M HCl (3-4 kapky).
 - b) Poté finálně upravte pH na hodnotu 4.5 pomocí 0.5M HCl.
4. Následně sražený roztok v kádince inkubujte za stálého míchání po dobu 15 minut při 37°C.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.4

Izolace laktalbuminu a dialýza

5. Poté přelijte sraženinu do 50 ml centrifugační zkumavky a centrifugujte 15 minut při 7 500 x g (centrifuga Eppendorf).
6. Odeberte supernatant a přečistěte ho filtrací přes 0.22 µm stříkačkový filtr.

C. Gelová chromatografie

Postup práce:

1. Odzátkejte kolonu naplněnou matricí Sephadex-G50 a nechte pufr odkapat, až hladina v koloně dosáhne matrice.
2. Pomocí pipety naneste po kapkách 2.0 ml supernatantu přečištěného filtrací.
3. Po nanesení nechte supernatant vsáknout do kolony, až hladina v koloně dosáhne matrice. Poté pomocí pipety naneste po kapkách 2.0 ml pufru a kolonu zazátkujte.
4. Začněte jímat frakce do 10 ml zkumavek po 2 ml, kdy průtok nastavte na 1-2 kapky/sekundu. Celkem nasbírejte 15 frakcí.
5. Poté si do 16 zkumavek napipetujte 2.0 ml činidla Bradfordové a postupně přidejte do zkumavek po 100 µl jednotlivých frakcí a zkumavky promíchejte na vortexu. Do poslední 16 zkumavky přidejte 100 µl vody. Tato zkumavka bude při měření absorbance sloužit jako slepý vzorek.
6. Inkubujte zkumavky 15 minut na stole a poté změřte absorbance při 590 nm, kdy jako blank použijte zkumavku s vodou.

Vyhodnocení:

Do grafu poté zakreslete průběh chromatografie na koloně naplněné matricí Sephadex G-50, kdy na osu x vyneste proteklý objem a na osu y absorbanci při 590 nm. Pozorovaný výsledek zdůvodněte.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.4
Izolace laktalbuminu a dialýza

