

# FRAKCIONACE A IZOLACE PROTEINŮ

## Princip:

Působením vysokých koncentrací solí (např.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ) se bílkoviny srážejí. Tento vratný děj je vyvolán jednak neutralizací náboje bílkovinných částic, jednak dehydratací bílkovinných molekul.

Užitím vhodných koncentrací soli lze jednotlivé bílkoviny dělit. Globuliny se srážejí při polovičním nasycení síranem amonným, albuminy teprve při úplném nasycení roztoku.

## Úkol:

Rozhodněte, který z neznámých vzorků obsahuje pouze albuminy a který směs albuminů a globulinů.

## Pracovní postup:

Zkumavky A a B obsahují po 3 ml vzorku s obsahem buď pouze albuminů nebo albuminů a globulinů.

- 1) Do každé zkumavky přidejte 3 ml nasyceného roztoku  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a zamíchejte. Vznikl z poloviny nasycený roztok síranu amonného.
- 2) Počkejte 5 minut a pak vyhodnoťte zákal. Měl by se objevit ve zkumavce obsahující globuliny.
- 3) Přidávejte do obou zkumavek postupně krystaly pevného síranu amonného a míchejte, dokud se krystaly nepřestanou rozpouštět. Zákal vznikne i v dosud čirém roztoku, ve druhém se stane intenzivnějším.

## Vyhodnocení:

Rozhodněte, ve které zkumavce je pouze albumin a kde je směs albuminů a globulinů.

# STANOVENÍ CELKOVÝCH BÍLKOVIN V SÉRU

## Princip:

Peptidové vazby bílkovin vytvářejí se síranem mědnatým v alkalickém prostředí komplexy vhodné k fotometrickému stanovení při 545 nm.

## Roztoky a činidla:

- biuretové činidlo (15mM CuSO<sub>4</sub>, 18mM Na<sub>2</sub>EDTA v 0,1M NaOH) **Pozor – žíravina!**
- standardní roztok bílkoviny o známé koncentraci (bude napsána na tabuli)

## Pracovní postup:

Připravte vzorky podle následující tabulky (biuretové činidlo přidejte do všech až na závěr a okamžitě promíchejte):

	vzorek	standard	blank
sérum (ml)	0,1	–	–
standard (ml)	–	0,1	–
destilovaná voda (ml)	–	–	0,1
biuretové činidlo(ml)	3,0	3,0	3,0

Inkubujte 12 minut při laboratorní teplotě. Allow the samples to incubate for 12 minutes at room temperature. Potom změřte absorbanci vzorku i standardu proti blanku ( $A_{\text{vzorek}}$  a  $A_{\text{standard}}$ ) při 545 nm.

Vypočítejte koncentraci vzorku a doplňte do tabulky níže.

## Výpočet:

$$C_{\text{vzorek}} = \frac{A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{standard}}} \cdot C_{\text{standard}} =$$

**Normální hodnoty:** 65–87 g/l

## Výsledky:

	sérum	standard
absorbance		
<b>KONCENTRACE</b>		

# CELKOVÉ BÍLKOVINY V PLODOVÉ VODĚ

## Princip:

Peptidové vazby reagují v zásaditém prostředí s měďnatými ionty za vzniku modrofialového zbarvení (biuretová reakce). Folin-Ciocalteuovo fenolové činidlo zesiluje zbarvení oxidací tyrosylových zbytků fosfomolybdenanovými a fosfo wolframovanými ionty, takže se dají stanovit i velmi nízké koncentrace bílkovin. Stanovení se provádí fotometricky při vlnové délce 720 nm.

## Roztoky a činidla:

- roztok I: 20 g uhličitanu sodného, 0,5 g vinanu sodno-draselného v 1 litru 0,1 M NaOH
- roztok II: 1 g síranu měďnatého (hydratovaného) v 1 l destilované vody
- **pracovní roztok:** připraví se smícháním 45 ml roztoku I a 5 ml roztoku II
- **Folin-Ciocalteuovo fenolové činidlo:** připravuje se složitou procedurou komerčně. K přípravě 1 litru je třeba 100 g  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 25 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 50 ml 85% kyseliny fosforečné, 100 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové, 150 g  $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 5 kapek bromu a destilovaná voda. Před použitím se ředí destilovanou vodou v poměru 1:2.
- **standardní roztok bílkoviny** o známé koncentraci (bude napsána na tabuli)

## Pracovní postup:

Připravte vzorky podle následující tabulky a ihned je zamíchejte.

	vzorek	standard	blank
pracovní roztok (ml)	5	5	5
plodová voda (ml)	0.05	–	–
standard (ml)	–	0.05	–
destilovaná voda (ml)	–	–	0.05

Počkejte 15 minut a přidejte do každé zkumavky 0,5 ml of the Folin-Ciocalteuova činidla a dobře promíchejte.

Nechte vzorky inkubovat 30 minut při teplotě laboratoře. Pak změřte absorbanci vzorku i standardu proti blanku ( $A_{\text{vzorek}}$  and  $A_{\text{standard}}$ ) při 720 nm.

Spočítejte koncentraci proteinů ve vzorku a zapište do tabulky níže.

**Výpočet:** 
$$C_{\text{vzorek}} = \frac{A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{standard}}} \cdot C_{\text{standard}} =$$

**Normální hodnoty:** 4–9.5 g/l (závisí na týdnu gestace)

**Výsledky:**

	<b>plodová voda</b>	<b>standard</b>
absorbance (A)		
<b>KONCENTRACE</b>		