

Stanovení proteinů

Princip elektroforetických metod

SDS-PAGE elektroforéza

předmět Chemické laboratorní metody v analýze potravin
KA 2340/4-8up

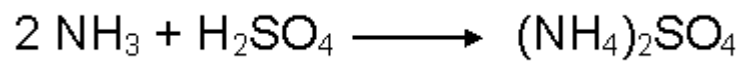
MVDr. Michaela Králová, Ph.D.



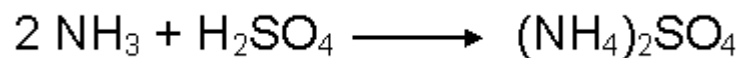
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Stanovení obsahu celkového dusíku a bílkovin podle Kjeldahla – referenční metoda

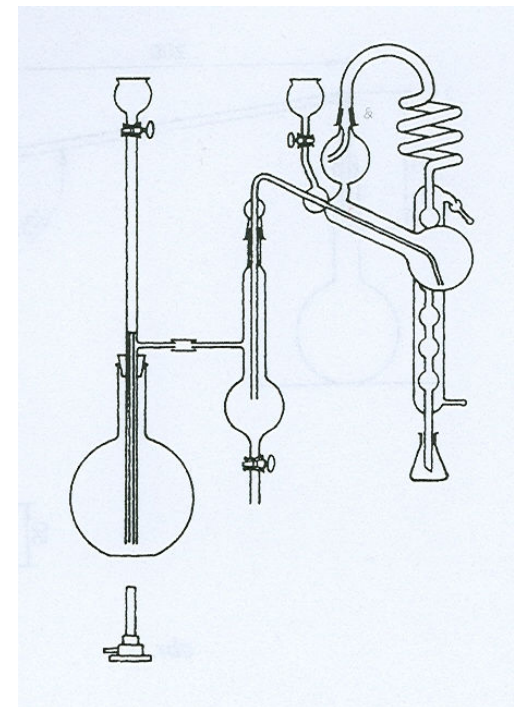
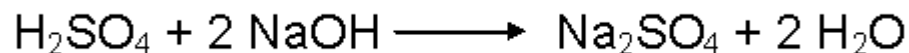
- mineralizace



- destilace



- titrace



Automatizované metody dle Kjeldahla

- **mineralizace**
(digesční jednotka, elektricky vyhřívané bloky)
- **destilace**
(destilační jednotka)
- **titrace**
(automatické titrace)

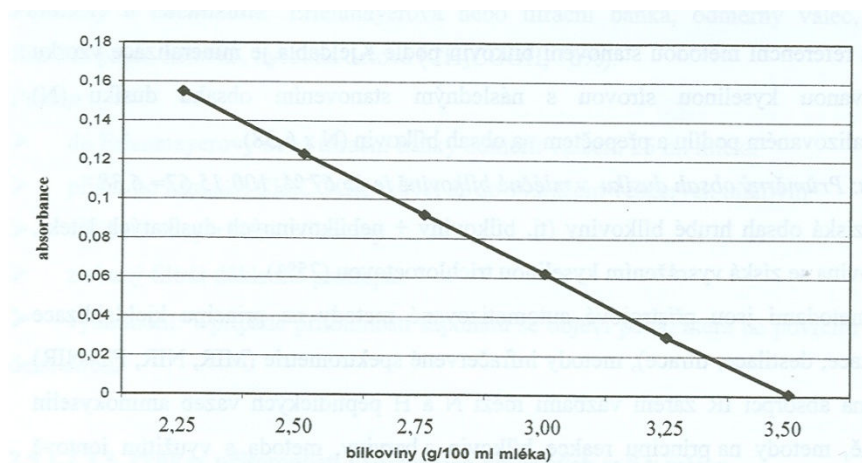


Metody na principu reakce bílkovin s barvivou

- barvivo + bílkovina \longrightarrow nerozpustný komplex
- kalibrační přímka (absorbance, koncentrace)

př. metoda s Amidočerní 10B

rutinní metoda



Janšťová a kol. (2009)

- automatizace

Metody IR spektrometrie

absorbce IR záření vazbami mezi N-H a C-N

- MIR

- NIR



foto autor



www.foss.dk

Separační metody

- chromatografie
- elektroforéza



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Elektromigrační metody

- elektrokinetické jevy (elektroforézy, elektroosmóza)
- v prostředí obsahujícím roztok s nabitými částicemi a pevné povrchy stýkající se s roztokem, které mohou nést elektrické náboje, se vytvářejí elektrické dvojvrstvy
- stejnosměrné elektrické pole, poruší rovnováhu v rozložení nábojů a vyvolá jejich pohyb

Elektroforéza

- po aplikaci napětí se nabité částičky pohybují k opačně nabité elektrodě
- v gelové elektroforéze se při separaci uplatňuje vedle elektroforetické pohyblivosti molekulově síťový efekt



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

SDS PAGE

- elektroforéza komplexů denaturovaných polypeptidů s anionickým detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS).
- navázáním SDS se nábojové rozdíly mezi různými proteiny téměř úplně potlačí, komplexy protein – SDS jsou v neutrálním a alkalickém prostředí silně negativně nabitě a putují k anodě.
- procházejí-li gelem o vhodné porozitě, je jejich pohyblivost dána téměř výhradně velikostí molekuly.
- srovnáním s pohyblivostí standardů o známé molekulové hmotnosti lze tak snadno a relativně přesně určovat molekulové hmotnosti proteinů, resp. jejich podjednotek

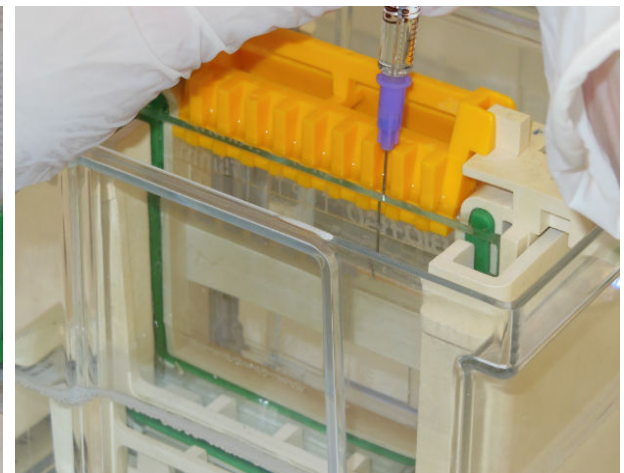
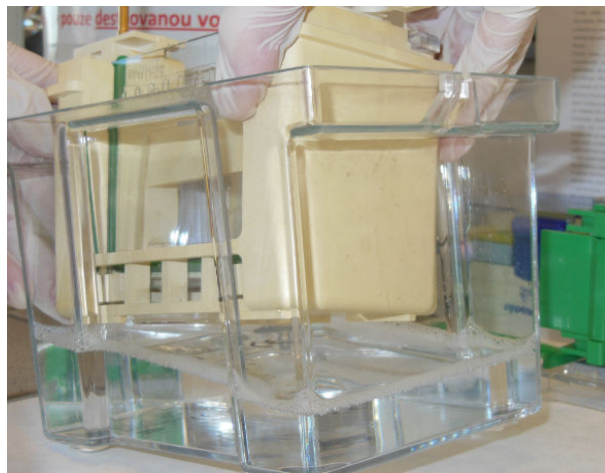
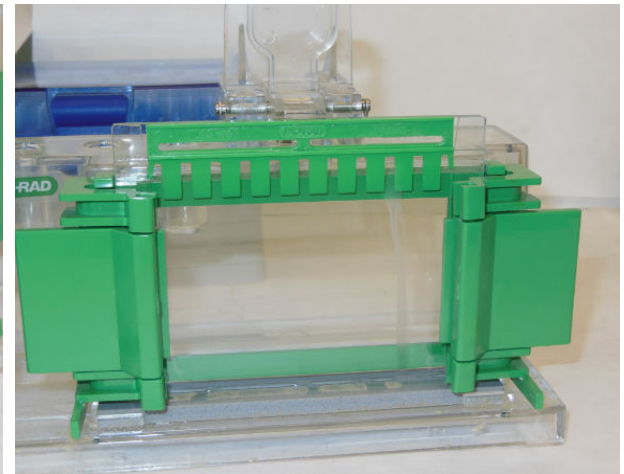
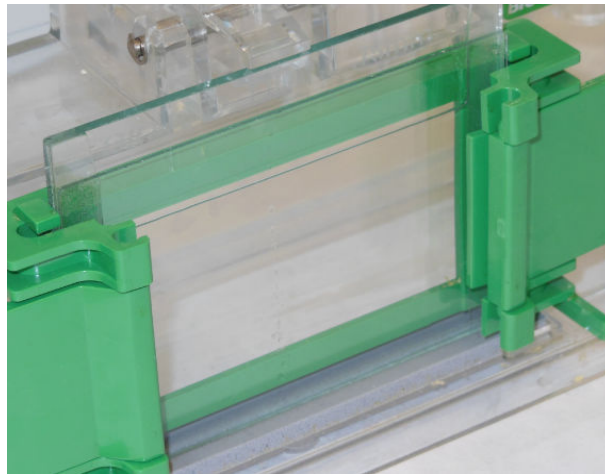
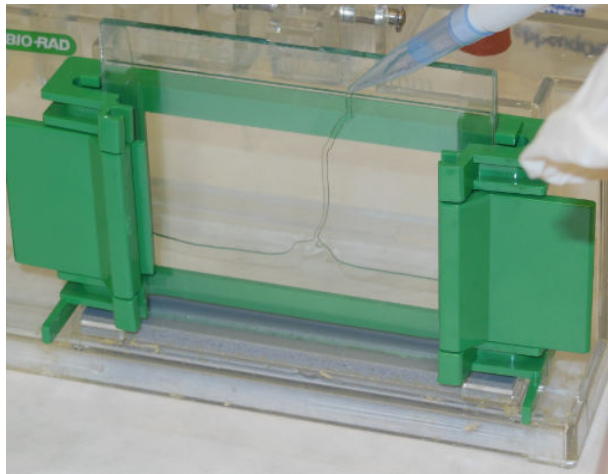
Příprava vzorků

- odstředění
- vysrážení
- lyofilizace (kasein)
- přidavek redukujícího pufu
- tepelný záhřev na 100 °C

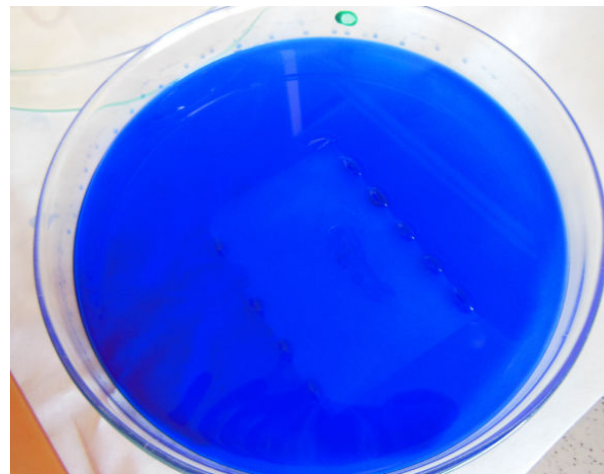
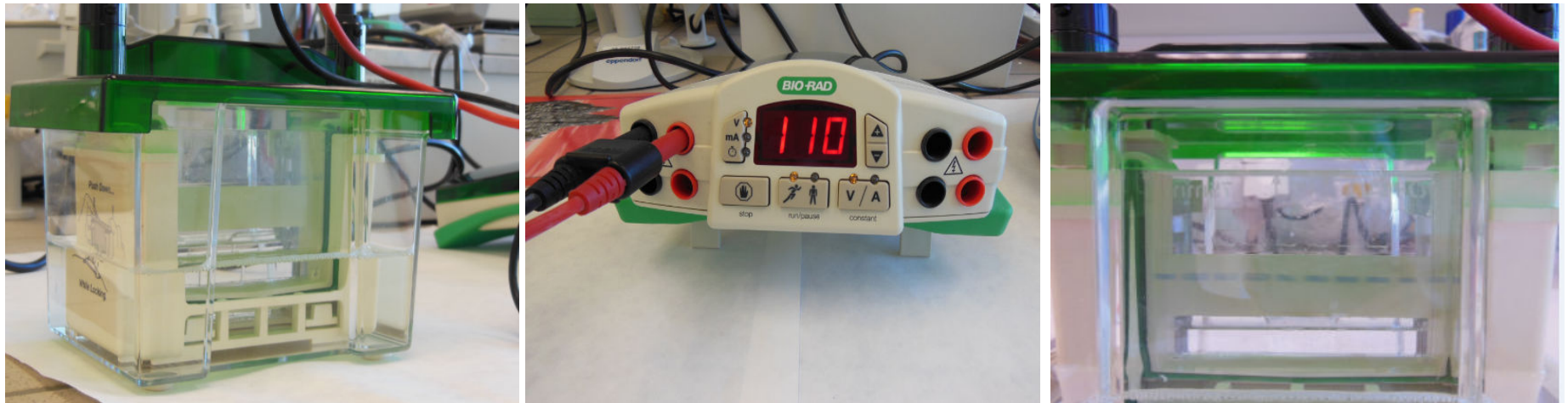


Foto autor

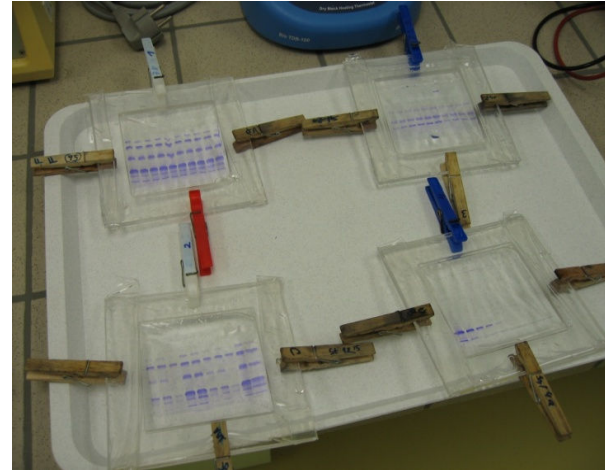
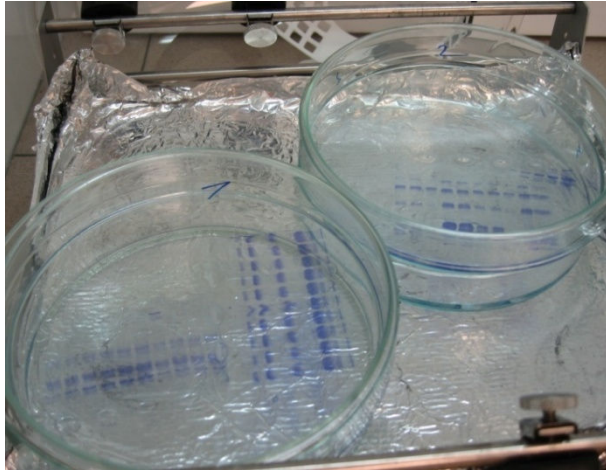
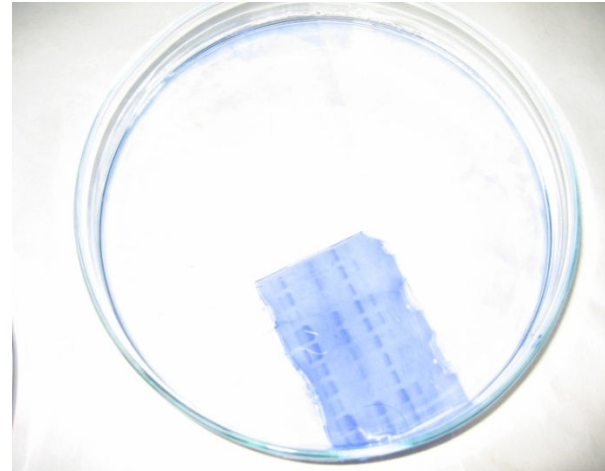
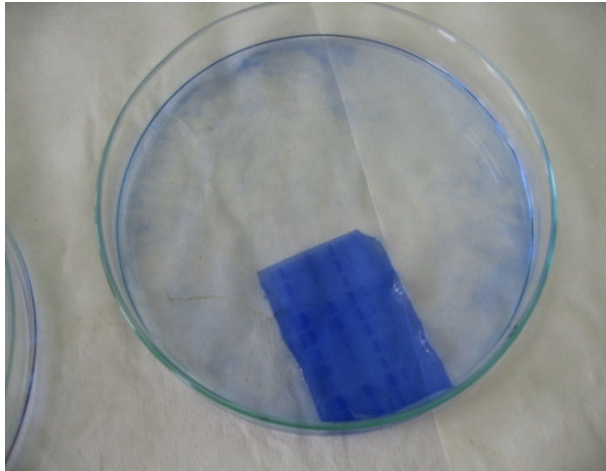
Příprava gelů, aplikace vzorků



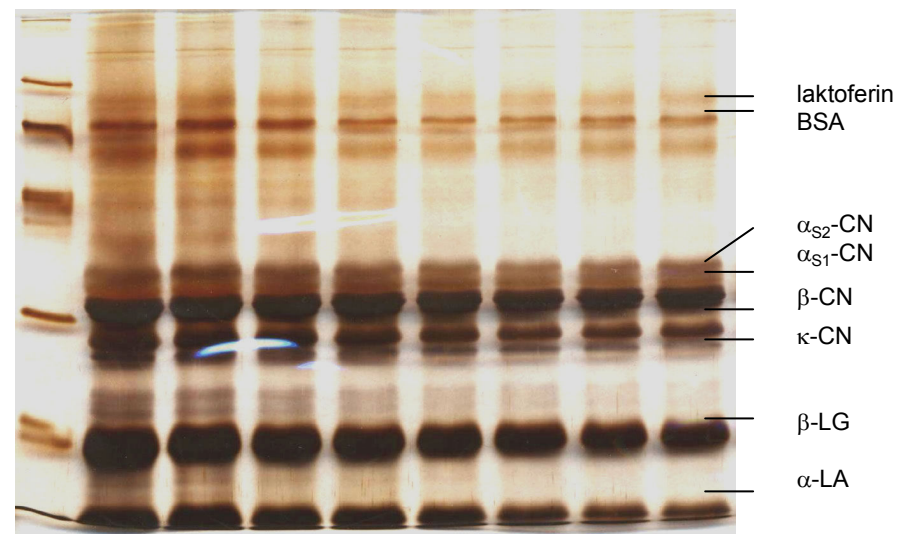
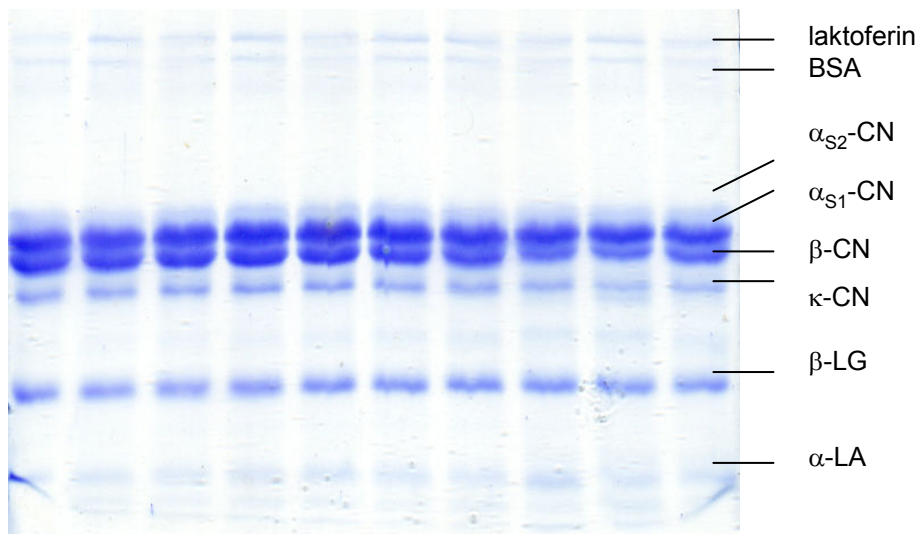
Elektroforéza, barvení gelů



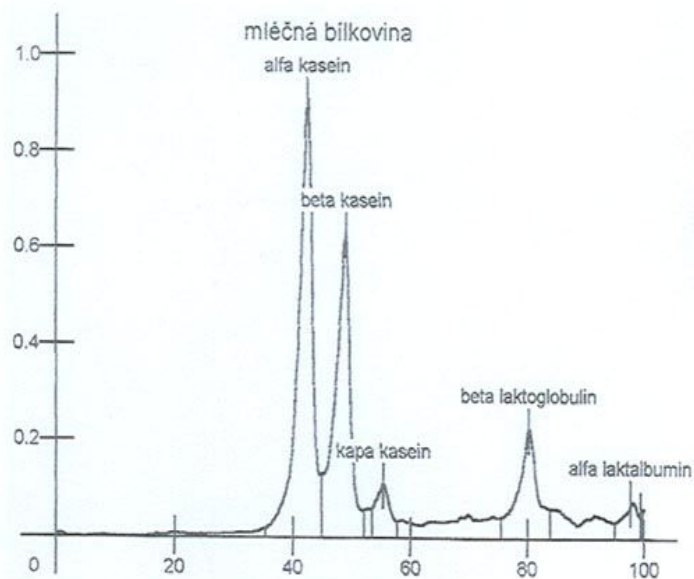
Odbarvení a sušení gelů



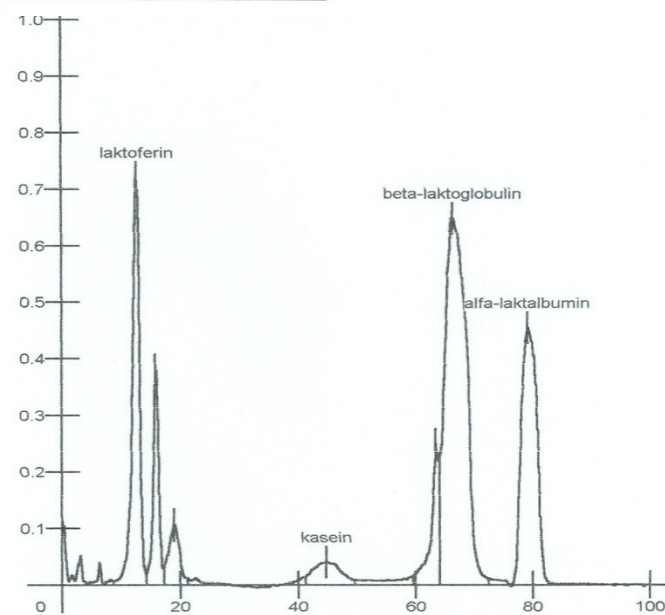
Vyhodnocování gelů



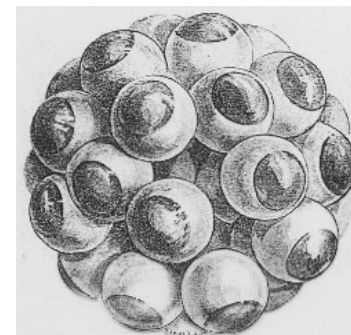
Vyhodnocování gelů



mléčná bílkovina :				
Jméno	Poloha	Amplituda	Plocha	.. v %
alfa kasein	42.373	0.910	2.5996	35.43
beta kasein	48.870	0.628	1.8691	25.48
kapa kasein	55.367	0.109	0.3148	4.29
beta laktoglobulin	80.226	0.224	0.8812	12.01
alfa laktalbumin	97.740	0.076	0.2409	3.28
	99.435	0.047	0.0134	0.18



Mléčné proteiny



bílkovina	Mr (kDa)	počet aminokyselin			počet PO ₄	c (g.l ⁻¹)	genetické varianty
		celkem	Pro	Cys			
<i>kasein</i>							
α _{s1} -kasein	23 164	199	17	0	8	10	A,B,C,D,E,F,G,H
α _{s2} -kasein	25 388	207	10	2	10-13	2,6	A,B,C,D
β-kasein	23 983	209	35	0	5	9,3	A ¹ ,A ² ,A ³ ,B,C,D,E,F,G
κ-kasein	19 038	169	20	2	1	3,3	A,B,C,E,F ^s ,F ^l ,G ^s ,G ^e ,H,I,J
<i>syrovátkové bílkoviny</i>							
β-LG	18 277	162	8	5	0	3,2	A,B,C,D,E,F,H,I,J
α-LA	14 175	123	2	8	0	1,2	A,B,C
sérový albumin	66 267	582	28	35	0	0,4	-
Ig	1 430 000- 1 030 000		8,4 %	2,3 %	-	0,8	-