



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Aktivita KA 2340/4-8up

### Stanovení bílkovin v mléce pomocí SDS PAGE

(elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s přidavkem dodecyl sulfátu sodného)

vypracovala: MVDr. Michaela Králová, Ph.D.

#### Princip:

Metoda je založena na elektroforéze 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.

#### Postup

##### Příprava vzorků

###### *Mléko*

- odstředění
- naředění
- přidavek redukujícího pufru
- var
- nanesení vzorků na elektroforetický gel

###### *Kasein*

- vysrážení kyselinou octovou na pH 4,6
- odstranění tuku promytím (dichlormethan-voda)
- odstředění
- lyofilizace
- rozpuštění v Tris
- odstředění
- přidavek redukujícího pufru
- var
- nanesení vzorků na gel

###### *Syrovátka*

- naředění
- přidavek redukujícího pufru
- var
- nanesení na gel

##### Elektroforéza

- upevnění skel do stojánku
- aplikace separačního gelu
- převrstvení isobutylalkoholem
- odsátí isobutylalkoholu
- převrstvení gelu ekvilibračním roztokem
- odsátí ekvilibračního roztoku
- aplikace zaostřovacího gelu



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



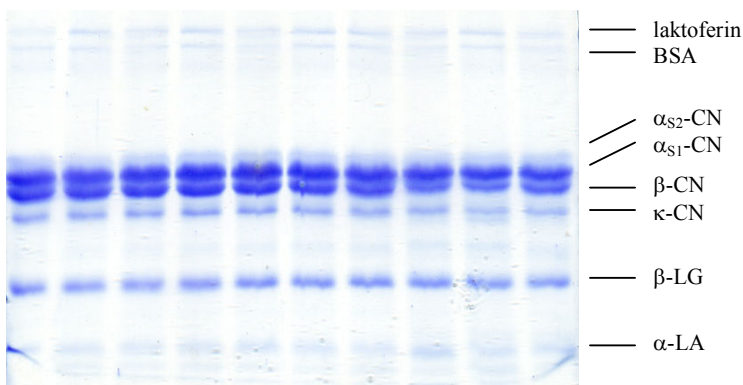
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

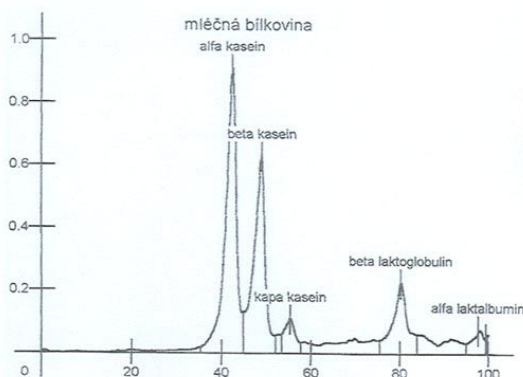
- zasunutí plastového hřebenu na vytvoření jamek pro vzorky
- odstranění hřebenu
- upevnění skel s gely do stojanů a vložení do kyvety
- naplnění anodového i katodového prostoru kyvety elektrodoým puřrem
- nanesení vzorků
- nasazení víka
- připojení ke zdroji napětí 110 V
- po skončení elektroforézy vyndání skel s gely
- sundání gelů
- barvení gelů
- odbarvení gelů
- sušení gelů
- skenování gelů
- vyhodnocení

**Obrázek:** Gel barvený Coomassie brilliant blue R (Autor: Králová)



Popis: BSA – bovinní sérový albumin, CN – kasein, LG- laktoglobulin, LA- laktalbumin

**Graf:** Vyhodnocení gelů pomocí programu ElfoMan 2.6 – vzorek mléka



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

### Literatura

VORLOVÁ, L., KRÁLOVÁ, M., BORKOVCOVÁ, I., JANŠTOVÁ, B., NAVRÁTILOVÁ, P., BARTÁKOVÁ, K. *Chemie potravin. Praktická cvičení*. 1. vyd. Brno: VFU Brno, 2012, 165 s. ISBN 978-80-7305-645-2.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### Úkoly

*Uveďte principy metod pro stanovení bílkovin v mléce:*

1) Stanovení obsahu celkového dusíku a bílkovin podle Kjeldahla – referenční metoda:

2) Metody na principu reakce bílkovin s barvivou (spektrofotometrie):

3) IR spektrometrie:

4) Vyjmenujte separační metody:



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## 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 nabitá částice pohybují k opačně nabitým elektrodám
- v gelové elektroforéze se při separaci uplatňuje vedle elektroforetické pohyblivosti molekulově síťový efekt

**Elektroosmóza** – po aplikaci napětí se v křemenné nebo skleněné kapiláře pohybuje voda k záporné elektrodě

**Elektroforetická pohyblivost**  $\mu_e$  určité nabitá částice je rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Jsou-li na začátku separace částice v jednom místě, dostávají se během separace dopředu nabitá částice, které mají větší pohyblivost, a opoždějí se částice s menší pohyblivostí. Tím dochází k jejich oddělení.

Na nabitou částici o náboji  $Q$  působí v elektrickém poli o intenzitě  $E$  dvě síly: elektrická síla  $F_1$ , která ji uvádí do pohybu, a odpor viskózního prostředí  $F_2$ , který ji brzdí.

V roztocích slabých elektrolytů jsou vedle sebe disociované (nabité) a nedisociované (nenabité) molekuly. Podíl nabitých částic je určen stupněm disociace  $\alpha$ . Molekula takového elektrolytu proto vykazuje **efektivní elektroforetickou pohyblivost** danou součinem  $\alpha \cdot \mu_e$ . Disociaci slabých kyselin a zásad lze měnit volbou pH prostředí, a tím také ovlivňovat separaci těchto látek.

**Kapilární elektroforéza** -kapilára je naplněna základním elektrolytem, který vede proud. Její konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem, společně s elektrodami z inertního materiálu. Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí. Aplikace malých objemů vzorku.

Detektor (fotometrický)

Elektroforeogram

### Separační techniky

**Kapilární zónová elektroforéza** (kapilární elektroforéza) ve volném roztoku je separace založená na rozdílech v náboji analytu a provádí se jako volná elektroforéza bez nosiče v tenké kapiláře.

**Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie** se používá k separaci neutrálních sloučenin a využívá povrchové aktivity micel

**Kapilární gelová elektroforéza** využívá molekulově síťového efektu rozpuštěných látek v prostředí gelu

**Kapilární isoelektrická fokusace** souží k separaci amfolytů v gradientu pH

**Kapilární elektrochromatografie** využívá k pohybu mobilní fáze elektroosmotického toku a separace nastává na silikagelu jako stacionární fázi. Separační selektivita této metody je kombinací elektroforetického a chromatografického procesu.



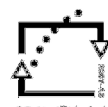
evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Tabulka:** Mléčné bílkoviny

bílkovina	Mr (kDa)	počet aminokyselin			počet PO <sub>4</sub>	c (g.l <sup>-1</sup> )	genetické varianty
		celkem	Pro	Cys			
<i>kasein</i>							
α <sub>s1</sub> -kasein	23 164	199	17	0	8	10	A,B,C,D,E,F,G,H
α <sub>s2</sub> -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 <sup>1</sup> ,A <sup>2</sup> ,A <sup>3</sup> ,B,C,D,E,F,G
κ-kasein	19 038	169	20	2	1	3,3	A,B,C,E,F <sup>s</sup> ,F <sup>l</sup> ,G <sup>s</sup> ,G <sup>e</sup> ,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	-

### Literatura

NG-KWAI-HANG, KF. Milk proteins: Heterogeneity, fractionation and isolation. In Roginski et al. *Encyclopedia of Dairy Science*. Amsterdam: Academic press, 2003, vol. 3, 1881-1894. ISBN 0-12-227238-2.

KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.