UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w Lublinie
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

Katedra Biochemii
ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
Tel. 081-445-66-08

Metody frakcjonowania białek

Zadanie 1. Odsalanie białek metodą sączenia molekularnego (chromatografii żelowej) na kolumnie wypełnionej Sephadeksem G-50.

Celem zadania jest rozdział białek surowicy metodą wysalania. A następnie rozdział otrzymanej mieszaniny globulin i $(NH_4)_2SO_4$ metodą sączenia molekularnego.

Wykonanie. Do probówki wirówkowej odmierzyć po 1 cm^3 surowicy oraz nasyconego siarczanu amonu. Zmieszać i odstawić na 5 min.

Wytrącony osad globulin wirować przez 10 min. przy użyciu siły 2000 x g. Supernatant zlać, a pozostały osad białka rozpuścić w 1 cm^3 0,9% NaCl.

Uzyskany w ten sposób roztwór globulin nanieść metodą wsączania na kolumnę wypełnioną Sephadeksem G-50 i prowadzić rozdział chromatograficzny.

Zbierać 10-kroplowe frakcje eluatu do kolejnych ponumerowanych probówek, po czym dla każdej frakcji przeprowadzić próbę na obecność białka i jonów siarczanowych.

Schemat zbierania frakcji:

1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
2	4	6	8	10	12	14	16	18	20

FRAKCJE ZBIERAĆ DO MOMENTU GDY 3 KOEJNE DAJĄ WYNIK NEGATYWNY NA JONY SO_4^{2-}

Obsługa kolumny chromatograficznej

1. Sprawdzić czy w zbiorniku z fazą ruchomą jest wystarczająca ilość płynu (minimum 2/3 objętości zbiornika).
2. Sprawdzić, czy faza ruchoma przepływa przez kolumnę, jeżeli zawór na dole kolumny jest zakręcony odkręcić go i odczekać co najmniej 10 minut.
3. Zamknąć zawór na dole kolumny, zamknąć zawór na przewodzie doprowadzającym fazę ruchomą na szczyt kolumny.
4. Rozłączyć wężyk doprowadzający fazę ruchomą na szczyt kolumny od igły wystającej z korka, uważać aby nie wyrwać korka z kolumny.
5. Umieścić w igle korpus strzykawki.
6. Odmierzyć pipetą 1 cm^3 próby i przenieść do korpusu strzykawki.
7. Otworzyć zawór wylotową kolumny i poczekać aż próba wsączy się na kolumnę. Zamknąć zawór wylotowy kolumny.

8. Wyjąć korpus strzykawki, założyć na igłę wężyk doprowadzający fazę ruchomą. Otworzyć zawór na wężyku, sprawdzić szczelność połączeń.
9. Przygotować probówki do zbierania frakcji.
10. Otworzyć wylot kolumny i zbierać kolejne frakcje do przygotowanego zestawu probówek.

Próba na białko (biuretowa). Do ok. 0,5 cm^3 eluatu (10 kropli) dodać 0,5 cm^3 odczynnika miedziowego. Roztwór w obecności białka przybiera fioletową barwę. Zanotować intensywność zabarwienia w tabeli.

Próba na jon siarczanowy. Do ok. 0,5 cm^3 eluatu (10 kropli) dodać 0,5 cm^3 0,25 mol/dm^3 $BaCl_2$. W przypadku obecności jonów siarczanowych wytrąca się biały osad siarczanu baru. Zanotować intensywność zmętnienia w tabeli.

Opracowanie wyników. Na papierze milimetrowym wykreślić osie układu XY. Na osi odciętych (X) odkładać kolejne numery frakcji, a na osi rzędnych (Y) intensywność zabarwienia tych frakcji lub ich zmętnienie w jednostkach umownych:

0 – brak zabarwienia lub zmętnienia,
+ – słabe zabarwienie lub zmętnienie,
++ – silne zabarwienie lub zmętnienie,
+++ – bardzo silne zabarwienie lub zmętnienie.

Nr frakcji	Próba na białko	Próba na jon siarczanowy	Nr frakcji	Próba na białko	Próba na jon siarczanowy