APLIKOVANÁ BIOLÓGIA I · PRACOVNÝ ZOŠIT

Extrakcia proteínov zo semien jačmeňa

Extrakcia SDS tlmivým roztokom → centrifugácia → zrážanie proteínov vymrazeným acetónom → uloženie pri −20 °C

ROZTOKY A VZORKY

- **Semená jačmeňa** 0,5 g → 3 × 0,1 g
- **SDS tlmivý roztok** 3 × 1,5 ml — 2 % SDS · 10 % glycerol · 50 mM DTT · 40 mM Tris-HCl, pH 6,8
- **Acetón 80 %, vymrazený (−20 °C)** 3 × (4·V + 1 ml) ≈ 3 × 7 ml

POMÔCKY

mlynček · analytické váhy · centrifugačné skúmavky 15 ml (PP) s uzáverom – 6 ks · automatické pipety · trepačka · kadičky · chladená centrifúga · mraznička −20 °C

ČAS

≈ 3 h

z toho 2 h trepanie a zrážanie

Pracujte v triplikáte – každý krok robte paralelne v 3 skúmavkách (1, 2, 3) a všetky hodnoty zapisujte do záznamového hárku na konci.

POSTUP

1 Pomeľte semená



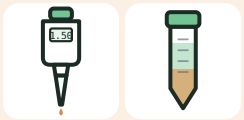
Na mlynčeku pomeľte **0,5 g** semien jačmeňa. **Zaznamenajte odrodu.**

2 Navážte rozdrvené semená do 3 skúmaviek



Do každej z troch 15 ml skúmaviek navážte **0,1 g** semien. Skúmavky označte 1, 2, 3 a odrodou.

3 Pridajte SDS tlmivý roztok



Do každej skúmavky pridajte **1,5 ml** SDS tlmivého roztoku a skúmavku uzavrite.

4 Extrahujte na trepačke



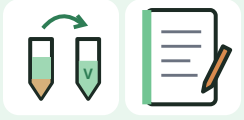
Prerušované trepanie **1 h** pri laboratórnej teplote a otáčkach 120 RPM.

5 Centrifugácia 1 – odstránenie nerozpusteného podielu



6000 g · **10 min** · laboratórna teplota.
Na dne zostanú nerozpustené proteíny, nad ňou proteínový extrakt.

6 Preneste extrakt a zapíšte objem (V)



Zo supernatantu odoberte **čo najviac** extraktu do novej 15 ml skúmavky. Neporušte proteíny. **Zapíšte odpipetovaný objem V.**

⚠ BEZPEČNOSŤ · PRÁCA · LIKVIDÁCIA

Obilný prach

Pri mletí dráždi dýchacie cesty, je možný alergén. Mlynček otvoriť až po usadení prachu; po mletí ho vyčistiť štetcom, nie fúkaním.

SDS tlmivý roztok

Obsahuje SDS (H315 · H319 · H335) a DTT (H302 · H315 · H319) – škodlivý pri požití, dráždi kožu, oči a dýchacie cesty; DTT silne zapácha.

- Nitrilové rukavice a okuliare.
- Pipetovať len automatickou pipetou.

SDS pení – pri miešaní netrepať naprázdno, pipetovať pomaly.

Trepanie

- Skúmavky **tesne uzavrieť** a uložiť do stojana trepačky; pri poliatí utrieť a vymeniť rukavice.

Centrifúga

Vyvážiť – 3 skúmavky triplikátu rozmiestniť symetricky alebo pridať vyvažovaciu skúmavku s rovnakou hmotnosťou vody.
Veko otvoriť až po úplnom zastavení rotora.

Odpad po extrakcii

- Skúmavky so zvyškom semien a SDS pufru → **pevný chemický odpad**.
- Zvyšky SDS/DTT tlmivého roztoku → **tekutý chemický odpad**, nie do výlevky.

Proces extrakcie proteínu



7 Pridajte 4-násobný objem vymrazeného acetónu



Pridajte **4 V** acetónu **80 %** vychladeného na **−20 °C**.

Príklad: V = 1,2 ml → 4 × 1,2 = **4,8 ml** acetónu. Celkový objem ≈ 6 ml sa do 15 ml skúmavky zmestí.

8 Zrážajte proteíny



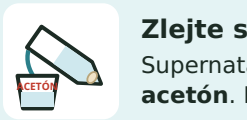
Skúmavky uzavrite a nechajte **1 h** pri **−20 °C**. Roztok sa zakalí, proteíny sa vyzrážajú.

9 Centrifugácia 2 – oddelenie zrazeniny



6000 g · **10 min** · **+4 °C**

10 Zlejte supernatant



Supernatant opatrne zlejte do **odpadovej nádoby na acetón**. Proteíny zostanú na dne.

11 Premyte, označte a uložte



Pridajte **1 ml** vymrazeného acetónu **80 %** a proteíny rozsuspendujte prepipetovaním. Skúmavky **dobre označte** (odroda, číslo opakovania, dátum, meno) a uložte pri **−20 °C**.

Acetón 80 %

H225 · H319 · H336 · EUH066 – veľmi horľavý; dráždi oči; pary spôsobujú ospalosť a závraty; vysušuje pokožku.

- Dávkovať **len v digestore**, fľašu hneď uzavrieť.
- Acetón preniká nitrilom za menej ako minútu – po poliatí rukavice **ihneď vymeniť**.
- Žiadny plameň, varič ani iskry v blízkosti.
- Len skúmavky z **PP**; polystyrén acetón rozpúšťa.

Acetón v mrazničke

- Len **laboratórna mrazníčka**.
- Skúmavky tesne uzavreté, v stojane, aby sa neprevrhli.

Centrifugácia acetónu

- Uzávery dotiahnuť, skúmavky **vyvážiť**; centrifúgu vopred vychladiť na +4 °C.
- Po centrifugácii skúmavky otvárať **v digestore**.

Acetónový supernatant

- Zliať do **odpadovej nádoby na acetón** (nehalogénované organické rozpúšťadlá). Nie do výlevky.

Zlievať pomaly, aby sa neuvoľnili proteíny; nádobu ihneď uzavrieť.

Uloženie pri −20 °C

- Len laboratórna mrazníčka. Štítok musí odolať acetónu (liehová fixka na PP, nie papierová nálepka).

Záznamový hárok do protokolu

Odroda jačmeňa:	Opakovanie 1	Opakovanie 2	Opakovanie 3
Navážka (g)			
Objem extraktu V (ml)			
Objem acetónu 4·V (ml)			
Vzhľad / poznámka			

Použitá literatúra

Dupont et al., (2011) https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-10

Podporené projektom

KEGA 012UCM-4/2025