



SZÉRUMFEHÉRJÉK MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSA ÉS FRAKCIONÁLÁSA

Szerző: Dr. Kádas János
2016

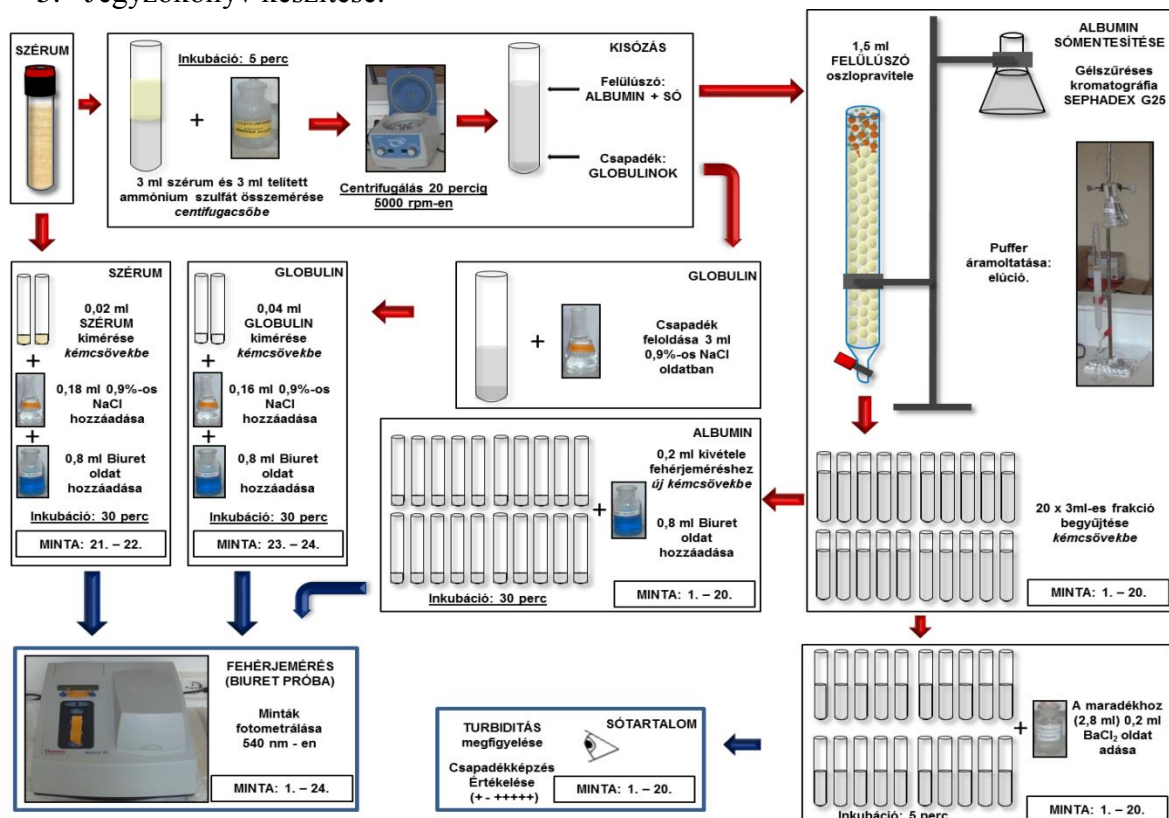
1. A gyakorlat célja

A gyakorlat során a vérérszékum összetételét vizsgáljuk meg különböző technikákkal. Először a szérumglobulinokat kisózzuk, majd centrifugálással szeparáljuk. Az albumint a precipitáció során használt sótól gélszűrési kromatográfiával elválasztjuk. A frakciók sótartalmát turbiditási mérésel határozzuk meg. A gyakorlat során a szérum, a gélszűrés során szedett frakciók, valamint a visszaoldott globulinok mennyiségének meghatározásához Biuret reagenst alkalmazunk. Brómkrezolbíbor reagenst használunk az albumin specifikus detektálásához.

A gyakorlaton második részében, demonstráció keretében, tisztított albumin és gamma globulin mintákat, valamint szérum mintát cellulóz acetát membrán elektroforézissel vizsgáljuk.

2. Gyakorlati feladatok

1. Globulinok kisóváása vérszérumból - ammónium-szulfátos precipitáció.
2. Albumin sómentesítése gélszűréssel.
3. Fehérjetartalom meghatározása különböző technikákkal – referenciasorok elkészítése, ábrázolás, számítások.
4. Szérumfehérjék elektroforézise cellulóz acetát membránon (demonstráció).
5. Jegyzőkönyv készítése.





3. Elméleti kérdések

1. Hasonlítsd össze a vérplazmát és a szérumot:

.....
.....
.....
.....

2. Melyek a vérplazma fő fehérje frakciói?

.....
.....
.....
.....

3. Mi történik a fehérjék kisózása során?

.....
.....
.....
.....

4. Mi a gélszűrési kromatográfia elve?

.....
.....
.....
.....

5. Hasonlítsd össze a Biuret reakciót és a Brómkrezolbíboros fehérje meghatározást!

.....
.....
.....
.....

6. Hogy határozzuk meg a frakciók sótartalmát?

.....
.....
.....
.....

7. Mi a cellulóz acetát membrán elektroforézis elve?

.....
.....
.....
.....



1. Feladat: Globulinok kisóváása vérszérumból - ammónium-szulfátos precipitáció

Az első feladat során a szérumblobulinokat telített **ammónium-szulfát oldattal** kisózzuk, majd centrifugálással szeparáljuk. A felúlszó tartalmazza majd az albumint, a csapadék pedig a globulinokat. Elválasztás után a csapadék 0,9%-os NaCl oldatban visszaoldható.

Anyagok:

- humán szérum
- telített ammóniumszulfát-oldat
- 0.9 % NaCl-oldat

Eszközök:

- automata pipetták hegyekkel
- centrifugacsövek
- üveg kémcsövek

Mérés:

1. Pipetázzunk egy centrifugacsöbe **3 ml** szérumot és **3 ml** telített ammóniumszulfát-oldatot.
2. Rázzuk össze, majd inkubáljuk szobahőmérsékleten **5 percig**.
3. Centrifugáljuk **20 percig**, 5000 rpm-en.
4. A keletkező felúlszót (ALBUMIN) öntsük át egy kémcsöbe.
5. A centrifugában maradó csapadékot oldjuk vissza 3 ml 0,9 %-os NaCl oldatban (GLOBULINOK).

Megfigyelés:

- becsüljük meg a keletkező felúlszó mennyiségét: ml

2. Feladat: Albumin sómentesítése gélszűréssel

Az albumint a precipitáció során használt sótól gélszűréses kromatográfiával, **Sephadex G25 gélszűrő** oszlopon választjuk el. A gélszűrés során, az oszlopon NaCl oldatot áramoltatunk, frakciókat szedünk.

Anyagok:

- albumin minta az első feladatból
- 20 cm-es Sephadex G-25 oszlop
- 0.9 % NaCl-oldat

Eszközök:

- automata pipetták hegyekkel
- üveg kémcsövek
- kémcsőállvány
- kromatográfiás oszlop állványa



Az elválasztás előkészítése:

- ✓ próbáljuk ki, hogyan kell a 0.9 %-os NaCl-oldatot tartalmazó lombikot az oszlophoz csatlakoztatni
- ✓ próbáljuk ki, mennyire kell az oszlop alján lévő csapot megnyitni ahhoz, hogy az eluátum egyenletesen szedhető legyen
- ✓ **FIGYELEM! A géloszlopon mindig maradjon folyadékréteg, és soha ne kerüljön az oszlopba levegő,** mert az nem csak az elválasztást rontja, hanem a gél szerkezetét is roncsolhatja
- ✓ mossuk az oszlopot a 0.9 %-os NaCl-oldat folyamatos áramoltatásával
- ✓ készítsünk elő egy kémcsőállványba 20 db megszámozott tiszta kémcsövet a frakcióknak (csövek - **MINTA 1. – 20.**)
- ✓ egy kémcsőbe mérjünk ki 3 ml desztillált vizet azért, hogy tudjuk milyen térfogatú frakciókat szedjünk

Elválasztás:

1. Eresszük le az oszlopot úgy, hogy a gél tetején egy vékony folyadékréteg maradjon.
2. Zárjuk el az oszlopot az alsó szeleppel.
3. Rétegezzünk az oszlopra 1,5 ml ALBUMIN mintát az **1. feladatból**.
4. Alul megnyitva a csapot, várjuk meg míg az oldat behatol a gélbe.
5. Mossuk le az üvegcső falára tapadt mintát is 5 ml 0.9 % NaCl-oldattal.
6. Csatlakoztassuk az oszlopot a 0.9 % NaCl-oldatot tartalmazó edényhez és kezdjük meg a NaCl-oldat átáramoltatását.
7. Szedjünk 20 frakciót, 3 ml átáramlott eluátum folyadékkal: **MINTA 1. – 20.**

3. Feladat: Fehérjetartalom meghatározása különböző technikákkal – referenciasorok készítése, ábrázolás, számítások

1. Fehérje mennyiségi meghatározása Biuret reakcióval

A gyakorlat során a szérum, a gélszűrés során szedett frakciók, valamint a visszaoldott globulinok mennyiségének meghatározásához a Biuret reakciót használjuk.

Anyagok:

- fehérje standard (10mg/ml Bovine szérum albumin (BSA))
- 0.9 % NaCl-oldat
- Biuret reagens (6 g *K-Na-tartarát*, 1,5 g *CuSO₄·5H₂O*, 30 g *NaOH*, 1 g *KI* 1000 ml desztillált vízben oldva)
- FRAKCIÓK a 2. feladatból
- Kiindulási humán SZÉRUM minta
- GLOBULIN minta az 1. feladatból
- Desztillált víz

Eszközök:

- automata pipetták hegyekkel
- üveg kémcsövek
- kémcsőállvány
- spektrofotométer, küvetták



a) **Készítsünk fehérje referenciasort ismert koncentrációjú fehérje oldatból (10 mg/ml BSA):**

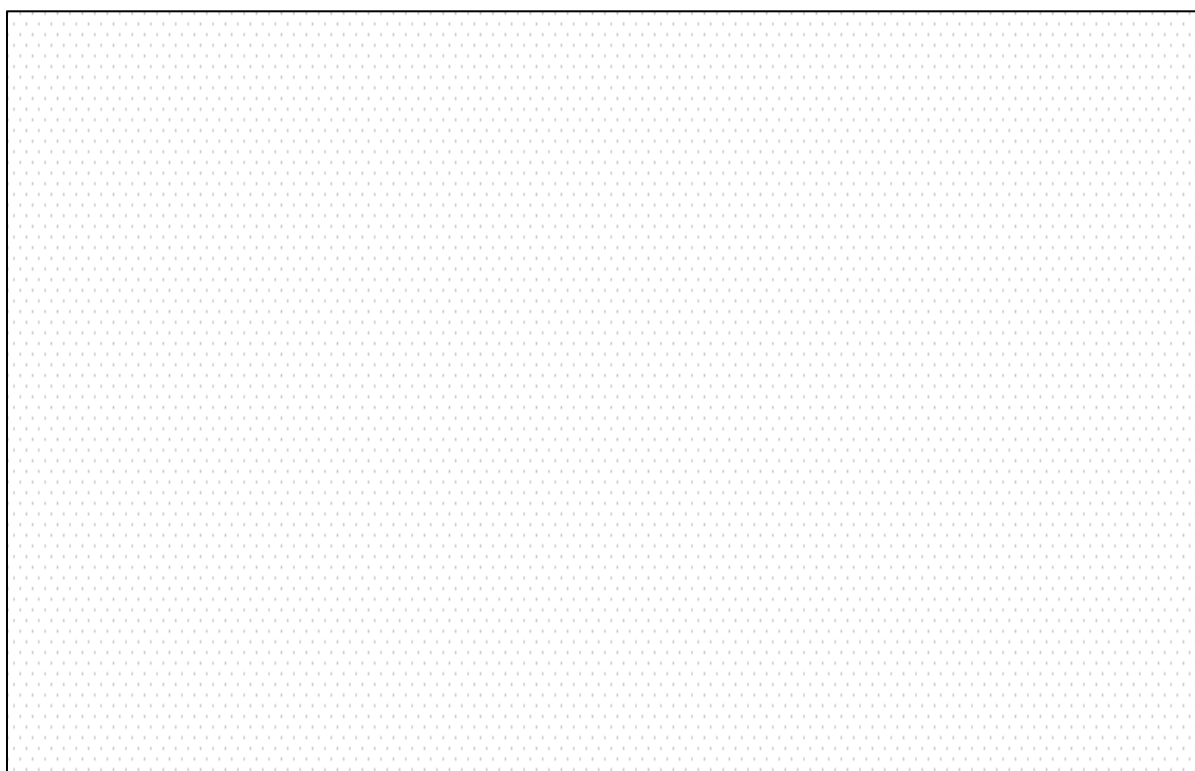
1. Készítsünk elő 5 db kémcsövet.
2. Mérjük össze a következő oldatokat:

Referencia minták	1. cső	2. cső	3. cső	4. cső	5. cső Vak
10 mg/ml fehérje standard. (ml)	0,050	0,100	0,150	0,200	-
0.9 % NaCl-oldat (ml)	0,150	0,100	0,050	-	0,200
Biuret-reagens (ml)	0,800	0,800	0,800	0,800	0,800

3. A Biuret reagens bemérése után rázzuk össze a csövek tartalmát.
4. Inkubáljuk a mintákat **30 percig** szobahőmérsékleten.
5. Állítsuk a fotométer hullámhosszát 540 nm-re, majd nullázzuk desztillált vízzel.
6. Mérjük le a minták abszorbanciáját és jegyezzük fel:

Referencia minták eredményei	1. cső	2. cső	3. cső	4. cső	5. cső Vak
Bemért fehérje standard (ml) 10 mg/ml	0,050	0,100	0,150	0,200	-
Fehérje tartalom a csőben (mg)		1			0
A_{540}					
$A_{540} - A_{540 \text{ vak}}$					-

7. Ábrázoljuk az abszorbanciát ($A_{540} - A_{540 \text{ vak}}$ (y)) a csőben lévő fehérje mennyiségének függvényében (**Fehérje tartalom a csőben (mg)** (x)):





8. Illesszünk egyenest a pontokra, és számoljuk ki az egyenes meredekségét:

➤ egyenes meredeksége:

b) Albumin frakciók fehérjetartalma

1. Készítsünk elő 20 db kémcsövet.
2. Készítsük elő az **ALBUMIN frakciókat** a 2. feladtból.
3. Mérjük össze a következő mintákat az új kémcsövekbe:

MINTA:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Albumin-frakciókból (ml) (1-10)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Biuret-reagens (ml)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

MINTA:	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Albumin-frakciókból (ml) (11-20)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Biuret-reagens (ml)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

4. A Biuret reagens bemérése után rázzuk össze a csövek tartalmát.
5. Inkubáljuk a mintákat **30 percig** szobahőmérsékleten.
6. Mérjük le a minták abszorbanciáját, és jegyezzük fel.

➤ Számoljuk ki a minták albumin tartalmát (**MINTA 1 – 20**):

Albumin tartalom 0,2 ml-ben: $(A_{540} - A_{540\text{vak}}) / \text{egyenes meredeksége}$

A teljes albumin tartalom 3 ml-ben: (pl. ha 0.2 ml X mg-ot tartalmaz, akkor, 3ml: $3/0,2=15$, azaz $15 \times X$ mg fehérjét tartalmaz frakciónként

Minta Eredmények:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A_{540}										
$A_{540} - A_{540\text{vak}}$										
# Albumin tartalom 0,2 ml - ben (X mg)										
## Albumin tartalom 3 ml -ben (15 x X mg)										

Minta Eredmények	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A_{540}										
$A_{540} - A_{540\text{vak}}$										
# Albumin tartalom 0,2 ml - ben (X mg)										
## Albumin tartalom 3 ml -ben (15 x X mg)										

➤ Számoljuk ki az összes visszanyert albumin mennyiségét:

..... mg



c) Szérum minta fehérjetartalma

1. Készítsük elő a kiindulási **SZÉRUM** mintákat.
2. Mérjük össze a következő mintákat új kémcsövekbe:

MINTA:	21	22
Szérum (ml)	0,02	0,02
0.9 % NaCl-oldat (ml)	0,18	0,18
Biuret-reagens (ml)	0,8	0,8

3. A Biuret reagens bemérése után rázzuk össze a csövek tartalmát.
4. Inkubáljuk a mintákat **30 percig** szobahőmérsékleten.
5. Mérjük le a minták abszorbanciáját, és jegyezzük fel.

- Számoljuk ki a SZÉRUM minták fehérje tartalmát (**MINTA 21 – 22**):
#A fehérje tartalom kiszámítása: $(A_{540} \text{ átlag} - A_{540} \text{ vak}) / \text{meredekség}$;
##A teljes fehérje tartalom 1 ml szérumban: ha 0,02ml szérum Y mg fehérjét tartalmaz, akkor 1ml: $1/0,02=50$, azaz $50 \times Y$ mg fehérjét tartalmaz.

MINTA:	21	22
A_{540}		
A_{540} átlag		
A_{540} átlag - A_{540} vak		
#Fehérje tartalom 0,02ml-ben (Y mg)		
##Fehérje tartalom 1ml szérumban ($50 \times Y$ mg)		
3ml SZÉRUM fehérje tartalma (mg)		

d) Globulin minta fehérjetartalma

1. Készítsük elő a **GLOBULIN** mintát az 1. feladatból
2. Mérjük össze a következő mintákat új kémcsövekbe:

MINTA:	23	24
Globulin (ml)	0,04	0,04
0.9 % NaCl-oldat (ml)	0,16	0,16
Biuret-reagens (ml)	0,8	0,8

3. A Biuret reagens bemérése után rázzuk össze a csövek tartalmát
4. Inkubáljuk a mintákat 30 percig szobahőmérsékleten
5. Mérjük le a minták abszorbanciáját, és jegyezzük fel

- Számoljuk ki a GLOBULIN minták fehérje tartalmát (**MINTA 23 – 24**):
#A fehérje tartalom kiszámítása: $(A_{540} \text{ átlag} - A_{540} \text{ vak}) / \text{meredekség}$;
##A teljes fehérje tartalom 1 ml globulin frakcióban: ha 0,04 ml globulin Z mg fehérjét tartalmaz, akkor 1 ml: $1/0,04=25$, azaz $25 \times Z$ mg fehérjét tartalmaz.



MINTA:	23	24
A ₅₄₀		
A ₅₄₀ átlag		
A ₅₄₀ átlag - A ₅₄₀ vak		
#Fehérje tartalom 0,04 ml-ben (Z mg)		
##Fehérje tartalom 1 ml globulinban (25x Z mg)		
3ml GLOBULIN fehérje tartalma (mg)		

2. Albumin mennyiségi meghatározása Brómkrezolbíborral

A gyakorlaton brómkrezolbíbor (BCB) reagenst használunk az albumin specifikus kiméréséhez szérumból.

Anyagok:

- humán fehérje standard (10mg/ml)
- 0.9 % NaCl-oldat
- Brómkrezolbíbor (BCB) reagens (0.005 % brómkrezolbíbor – etanolban oldva)
- Kiindulási humán SZÉRUM minta
- Desztillált víz

Eszközök:

- automata pipetták hegyekkel
- üveg kémcsövek
- kémcsőállvány
- spektrofotométer, küvetták

a) Készítsünk fehérje referenciasort ismert koncentrációjú fehérje oldatból (10 mg/ml):

1. Készítsünk elő 5 db kémcsövet
2. Mérjük össze a következő oldatokat:

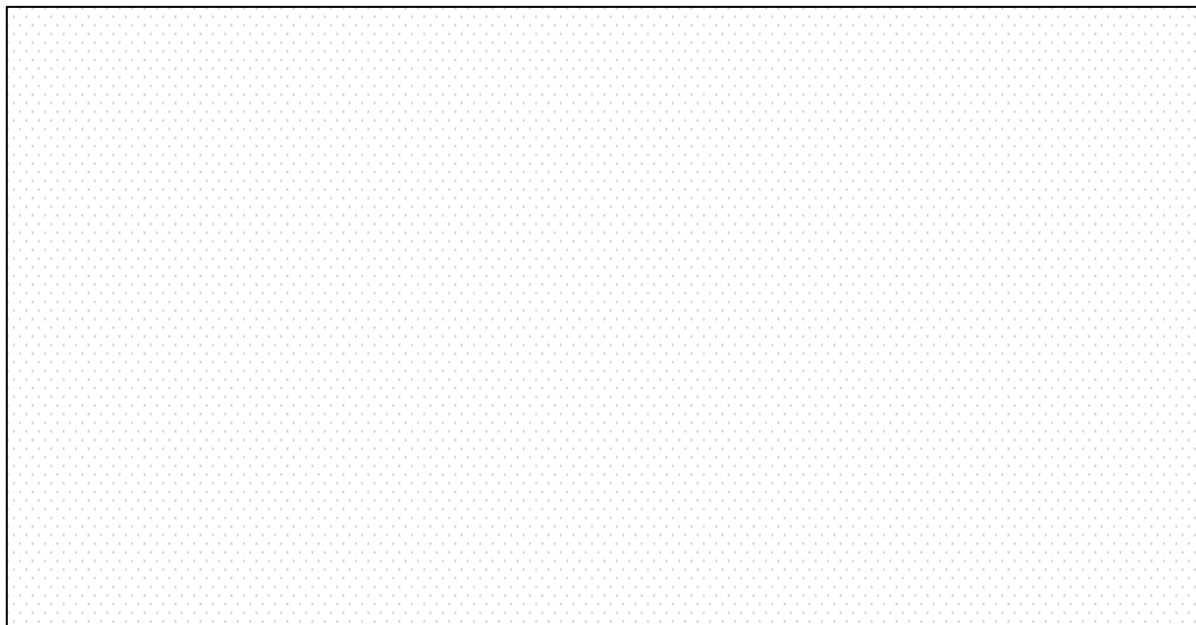
Referencia minták	1. cső	2. cső	3. cső	4. cső	5. cső Vak
10 mg/ml fehérje standard. (ml)	0,050	0,075	0,100	0,150	-
0.9 % NaCl-oldat (ml)	0,150	0,125	0,100	0,050	0,200
BCB - reagens (ml)	0,800	0,800	0,800	0,800	0,800

3. A BCB reagens bemérése után rázzuk össze a csövek tartalmát
4. Inkubáljuk a mintákat **5 percig** szobahőmérsékleten
5. Állítsuk a fotométer hullámhosszát 620 nm-re, majd nullázzuk desztillált vízzel
6. Mérjük le a minták abszorbanciáját, és jegyezzük fel:

Referencia minták eredményei	1. cső	2. cső	3. cső	4. cső	5. cső Vak
Bemért fehérje standard (ml) 10 mg/ml	0,050	0,075	0,100	0,150	-
Fehérje tartalom a csőben (mg)			1		0
A ₆₂₀					
A ₆₂₀ -A ₆₂₀ vak					-



7. Ábrázoljuk az abszorbanciát ($A_{620} - A_{620\text{vak}}$ (y)) a csőben lévő fehérje mennyiségének függvényében (**Fehérje tartalom a csőben (mg) (x)**):



8. Illesszünk egyenest a pontokra, és számoljuk ki az egyenes meredekségét:

➤ egyenes meredeksége:

b) Szérum minta albumintartalma

1. Készítsük elő a kiindulási **SZÉRUM** mintákat.
2. Mérjük össze a következő mintákat új kémcsövekbe:

MINTA:	25	26
Szérum (ml)	0,1	0,1
0.9 % NaCl-oldat (ml)	0,1	0,1
BCB - reagens (ml)	0,8	0,8

3. A BCB reagens bemérése után rázzuk össze a csövek tartalmát.
4. Inkubáljuk a mintákat **5 percig** szobahőmérsékleten.
5. Mérjük le a minták abszorbanciáját, és jegyezzük fel:

➤ Számoljuk ki a SZÉRUM minták albumin tartalmát:

#Az albumin tartalom kiszámítása: $(A_{620\text{átlag}} - A_{620\text{vak}}) / \text{meredekség}$;

##A teljes albumin tartalom 1 ml szérumban: ha 0,1ml szérum W mg fehérjét tartalmaz, akkor 1ml: $1/0,1=10$, azaz $10 \times W$ mg fehérjét tartalmaz.



MINTA:	25	26
A_{620}		
A_{620} átlag		
A_{620} átlag - A_{620} vak		
# Albumin tartalom 0,1 ml-ben (W mg)		
## Albumin tartalom 1 ml szérumban (10 x W mg)		
3ml SZÉRUM albumin tartalma (mg)		

3. A kromatográfiás frakciók sótartalmának meghatározása turbiditási méréssel

A frakciók sótartalmát bárium kloridon ($BaCl_2$) alapuló **turbiditási méréssel** határozzuk meg.

Anyagok:

- 10 %-os $BaCl_2$ -oldat (**MÉRGEZŐ!**)
- FRAKCIÓK a 2. feladatból

Eszközök:

- automata pipetták hegyekkel
- kémcsőállvány

Mérés:

1. Készítsük elő az **ALBUMIN frakciókat** a 2. feladatból (fehérje mérés után marad 2,8 ml minden frakcióban). Nem szükségesek új kémcsövek!
2. Adjunk minden frakcióhoz 0,2 ml $BaCl_2$ oldatot:
3. A $BaCl_2$ oldat bemérése után rázzuk össze a csövek tartalmát
 - figyeljük meg, hogy hol lép fel opálosodás, és a mértékét 5 fokozatú skálán értékeljük (+: víztiszta - +++++: nagyon opálos) és jegyezzük fel:

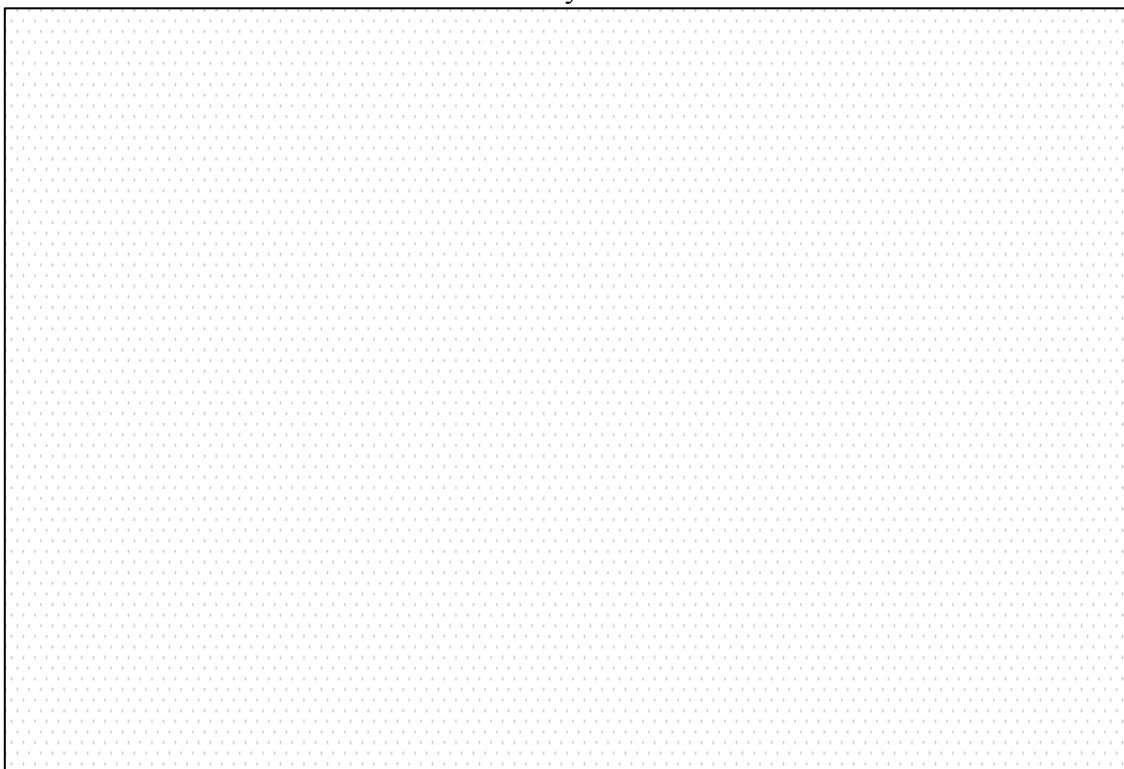
Eredmények:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zavarosodás (+ - +++++)										

Eredmények:	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Zavarosodás (+ - +++++)										



4. A gélszűrési kromatográfiából származó frakciók fehérjetartalmának, sótartalmának és a szérumfehérjék mennyiségének összehasonlítása:

- Készítsünk grafikont! X tengelyen ábrázoljuk a gélszűrési kromatográfiából származó frakciók sorszámát (1-20.) Bal oldali Y1 tengelyen a frakciók (1-20) Biuret reakcióval meghatározott fehérjemennyiségét (mg/3ml) és a jobb oldali y2 tengelyen a frakciókhoz tartozó turbiditási eredményeket:



- Értékeljük az eredményeket! Mennyire volt sikeres a sómentesítés?
.....
.....
.....
.....
- Milyen volt a **gélszűrés hozama**?
 - 3 ml kisózáshoz használt szérum albumin tartalma: BCB reakció eredménye alapján (3. 2.b):
.....**mg/3ml**
 - Kisózás utáni centrifugáláskor kapott felülúszó mennyisége és albumin tartalma (1. feladat)
.....**ml****mg/teljes kapott felülúszó (ml)**
 - A géltre felvitt 1.5 ml kisózási felülúszóban található albumin fehérjetartalma
.....**mg/1,5 ml 100%**
 - Összes visszanyert albumin (3.1.b)



4. Feladat: Szérumfehérjék elektroforézise cellulóz acetát membránon (DEMONSTRÁCIÓ)

A gyakorlaton a tisztított albumin és gammaglobulin mintákat, valamint a szérum mintát cellulóz acetát membrán elektroforézissel vizsgáljuk.

Anyagok:

- cellulóz-acetát-membrán
- futtató puffer (50 mM Na-veronál, 10 mM veronál, 60 mM TRIS, pH 8,6)
- szérum minta
- albumin minta
- gamma globulin minta
- brómfenolkékkel festett marker (albumin)
- amidofekete 10B festőoldat (0,5%; metanol:víz:ecetsav 5:4:1 arányban)
- mosóoldat (metanol:víz:ecetsav 5:4:1 arányban)

Eszközök:

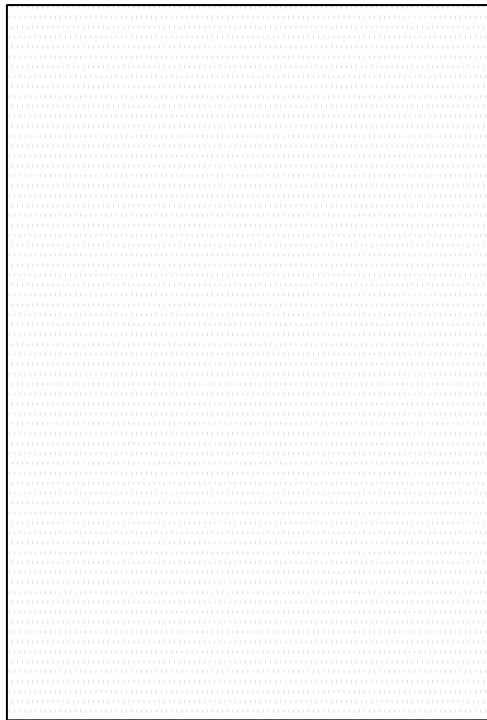
- automata pipetták hegyekkel
- tápegység
- elektroforézis készülék
- festőtálak, csipesz, szűrőpapír

Elválasztás:

- ✓ futtató pufferrel nedvesítsük be egyenletesen a cellulóz-acetát-membránt. A membránt két szűrőpapír közzé téve, itassuk le az oldat fölöslegét,
- ✓ helyezzük be a membránt a készülékbe úgy, hogy a két pólus között hidat képezzen,
- ✓ vigyük fel a mintákat kb. 0.5 cm-es sávokban a katód-oldalon (-), a szűrőpapírra fekvő résztől befelé kb. 1 cm-re,
- ✓ zárjuk le a készüléket és helyezzük feszültség alá,
- ✓ állítsuk az áramerősséget: 0.5 mA/cm membránszélességhez (4 cm széles membrán: 2 mA),
- ✓ az elektroforézis befejeztével áramtalanítsuk a készüléket és helyezze át a membránt a festékoldatba
- ✓ 5 perc festés után öblítsük le a membránt csapvízzel, majd helyezzük a mosófolyadékba, míg a membrán alapszíne fehér lesz.
- ✓ Végül öblítsük le a membránt csapvízzel és szárítsuk meg.



- Ábrázoljuk a kapott eredményt (jelöljük és nevezzük meg a mintákat, a fehérje sávokat, valamint a pólusokat, a futás irányát, mintafelvétel helyét):



- Értékeljük az eredményt:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....