

AUTOR:
Aleksandra KusiakOPIEKUN:
dr hab. Zenon Rajfur

16

Elektroforeza mleka w proszku z barwnikami spożywczymi na żelu poliakrylamidowym

1. Wprowadzenie

Elektroforeza jest to zjawisko wykorzystywane do rozdzielania mieszanin, stosowane w naukach biologicznych i chemicznych. Polega na migracji cząsteczek w żelu o określonym usieciowieniu- wielkości porów i ściśle zależy od stężenia poliakrylamidu. Im wyższe stężenie, tym gęstsze usieciowanie, a tym samym dokładniejszy rozdział cząsteczek o masie różniącej się nieznacznie. Cząsteczki migrują do przeciwnie naładowanej elektrody z różną szybkością zależną od wielkości cząsteczki oraz jej ładunku. W doświadczeniu elektroforezie poddano mleko w proszku wymieszane z barwnikiem spożywczym firmy *Dr. Oetker* w kolorze czerwonym, zielonym i niebieskim oraz poszczególne składniki mieszanin jako kontrole. Celem badania było wstępne sprawdzenie czy barwnik wpływa na strukturę białka.

2. Metoda

Przygotowano po dwa żele poliakrylamidowe rozdzielające o stężeniu 8% i 15% oraz żel zagęszczający. Roztwory żelu wprowadzono między dwie szklane płytki, żel rozdzielający na dół a zagęszczający na górę. Za pomocą specjalnego grzebienia, w żelu zagęszczającym, zrobiono studzienki. Zaczęto przygotowywać próbki przeznaczone do rozdzielu elektroforetycznego. Odważono 0,4 mg mleka w proszku, które wymieszano, w plastikowej próbówce typu eppendorf, z 200 μ l wody demineralizowanej oraz 2 μ l barwnika. Po dodaniu buforu w stosunku 1:1 próbówki umieszczono w wodzie

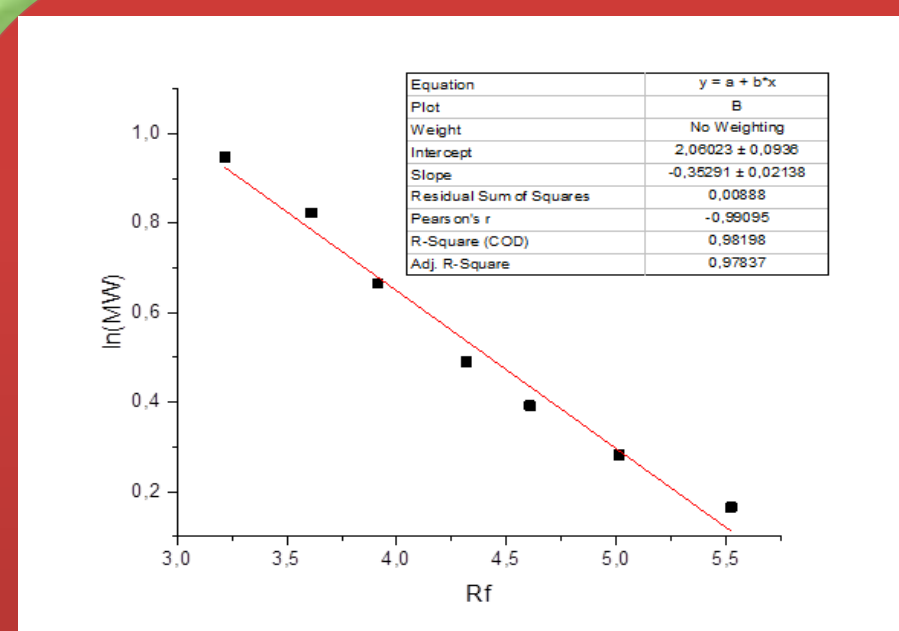
o temperaturze 100°C na 30 min w celu zdenaturowania białka. Gdy żele spolimeryzowały nałożono wcześniej przygotowane próbki w studzienki, za pomocą pipety półautomatycznej. Umieszczono po 10 μ l badanych roztworów oraz 1 μ l standardu masowego białek na każdy żel. Płytki z żelami zawierającymi próbki włożono do komory, w której przeprowadza się rozdział elektroforetyczny, wlało bufor do elektroforezy a następnie włączono zasilanie ustawiając napięcie 100 V. Po rozdzielaniu mieszaniny żele wyciągnięto z komory oraz z pomiędzy płytek i przepłukano w wodzie demineralizowanej a następnie wybarwiono techniką Coomassie Blue i przeanalizowano za pomocą programu ImageLab.



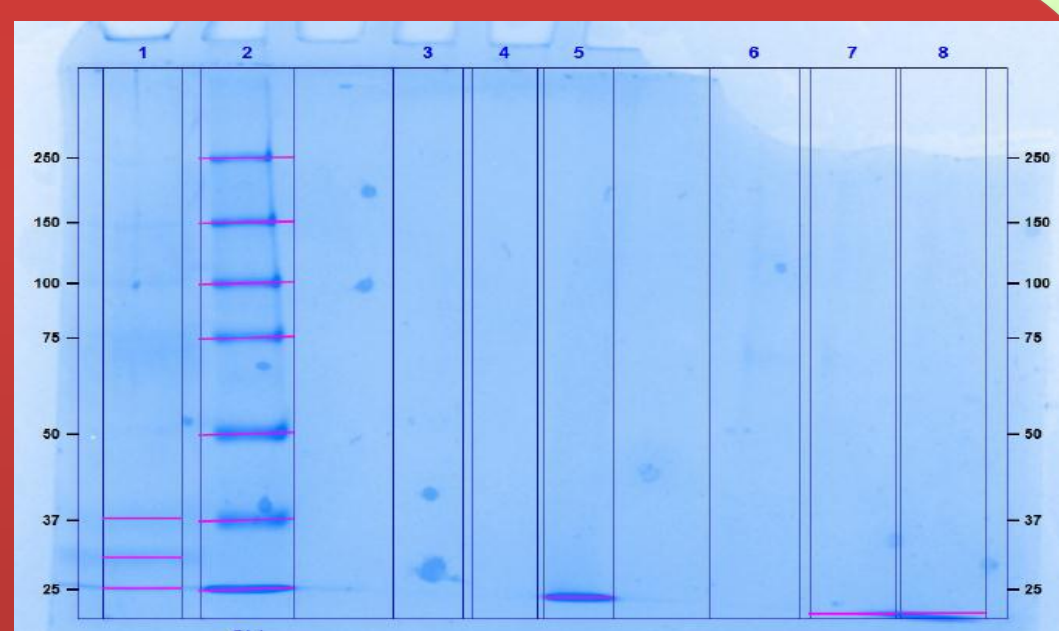
Rys.1: Zdjęcie żeli wraz z próbkami w komorze do przeprowadzania rozdzielu elektroforetycznego podczas trwania elektroforezy.

3. Wyniki

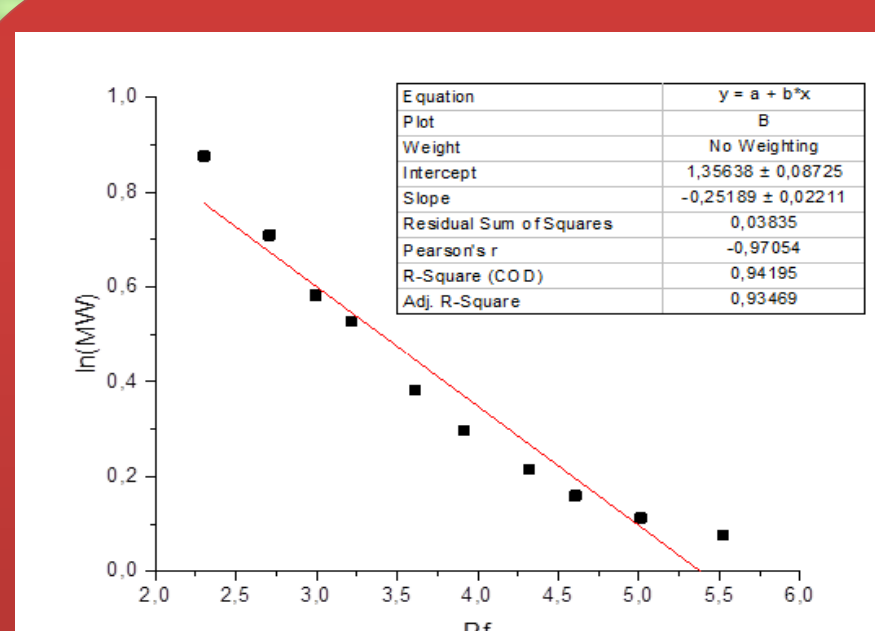
Na podstawie standardu masowego białek Precision Plus Protein™ Dual Color Standards wykonano wykres zależności logarytmu naturalnego masy cząsteczkowej $\ln(MW)$ od względnej ruchliwości R_f a następnie, metodą regresji liniowej, dopasowano do niego prostą o równaniu $y=ax+b$ będącą prostą kalibracyjną (Rys.2, Rys.4). Obliczono masę cząsteczkową mleka w proszku, która wyniosła $32,12 \pm 3,06$ kDa (Rys.2 Studzienka 1, Rys.5: Studzienka 2). Masa cząsteczkowa kazeiny znajdująca się w mleku wynosi od 20 do 43 kDa. Nie udało się ustalić masy barwników spożywczych, ponieważ uległy rozpuczeniu podczas barwienia. W żelu o większym stężeniu poliakrylamidu - 15%, rozdzielaniu uległy cząsteczki o masie poniżej 25 kDa dzięki większej porowatości ośrodka rozdzielającego. Próbki mleka w proszku z dodatkiem barwnika spożywczego nie rozdzieliły się w wyraźny prążek tak jak samo mleko w proszku (Rys.3: Studzienka 1, Rys.5: Studzienka 2) a wytworzyły smugę (Rys.3: Studzienka 7,8) wskazującą na degradację białka.



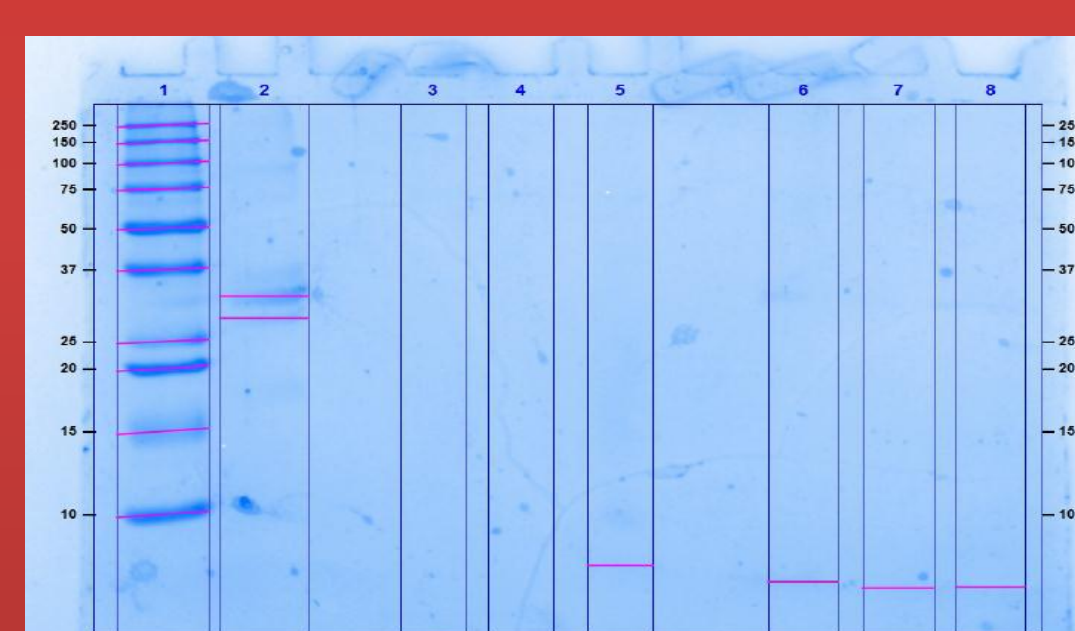
Rys.2: Wykres zależności logarytmu masy cząsteczkowej $\ln(MW)$ od względnej ruchliwości R_f z krzywą kalibracyjną dla żelu 8%



Rys.3: Zdjęcie wybarwionego żelu 8%. Studzienka: 1-mleko w proszku, 2-standard, 3-barwnik zielony, 4-barwnik niebieski, 5-barwnik czerwony, 6-mleko w proszku z barwnikiem zielonym, 7-mleko w proszku z barwnikiem niebieskim, 8-mleko w proszku z barwnikiem czerwonym



Rys.4: Wykres zależności logarytmu masy cząsteczkowej $\ln(MW)$ od względnej ruchliwości R_f z krzywą kalibracyjną dla żelu 15%



Rys.5: Zdjęcie wybarwionego żelu 15%. Studzienka: 1-standard, 2-mleko w proszku, 3-barwnik zielony, 4-barwnik niebieski, 5-barwnik czerwony, 6-mleko w proszku z barwnikiem zielonym, 7-mleko w proszku z barwnikiem niebieskim, 8-mleko w proszku z barwnikiem czerwonym

4. Wnioski

W celu rozdzielania białek o małych masach należy użyć żeli o dużym stężeniu poliakrylamidu, ponieważ takie żele charakteryzują się większą porowatością. Dodanie barwnika do mleka w proszku prawdopodobnie spowodowało jego degradację. Wskazują na to smugi widoczne na żelu po elektroforezie (Rys.3: Studzienka 7,8). Być może barwnik wpływa na strukturę białka i w trakcie denaturacji sprawia, że rozpada się na małe struktury. Otrzymane wyniki są zgodne z poprzednio publikowanymi rezultatami badań przeprowadzonych przez Purdue University [3] na sztucznych barwnikach spożywczych, które wykazały, że gdy są spożywane z żywnością regularnie w dużych ilościach mogą powodować uszkodzenia DNA czy aktywować komórki nowotworowe. Dodatkowo w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2010r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych mleko w proszku jest jednym z produktów, do którego nie można dodawać barwników

Literatura

[1] Instrukcja i materiały do ćwiczenia Z48 – PMFB

[2] <http://www.biomedical.pl/dieta-i-odzywianie/barwniki-spozywcze>

[3] <http://www.sciencenews.pl/spozywcze-barwniki-przyczyniaja-sie-do-dzieciacych-chorob>

[4] <http://www2.mz.gov.pl>