
Standardní referenční metoda ověřování pravosti odrůd jílku

Ing. Radka Marie Šašková

Princip metody

- separace bílkovin v semeni
 - nabitá částice se pohybuje v polyakrylamidovém gelu
 - řazení a intenzita proteinových proužků → „otisk prstů“ odrůd
-

Postup – časová náročnost

- příprava roztoků
 - extrakce proteinů
 - příprava gelů
 - separační
- } 1. den

-
- fokusační
 - elektroforéza
 - fixace a barvení
- } 2. den

-
- balení gelů
 - hodnocení
- } 3. den
-

Příprava roztoků

- extrakční roztok základní a ředěný
- elektroodový pufr
- pufr (pH 8,8 a pH 6,8)
- 10% SDS (dodecyl sulfát sodný)
- 1% APS (peroxodisíran amonný)
- akrylamid – separační, fokusační
- barvicí lázeň
- fixační roztok

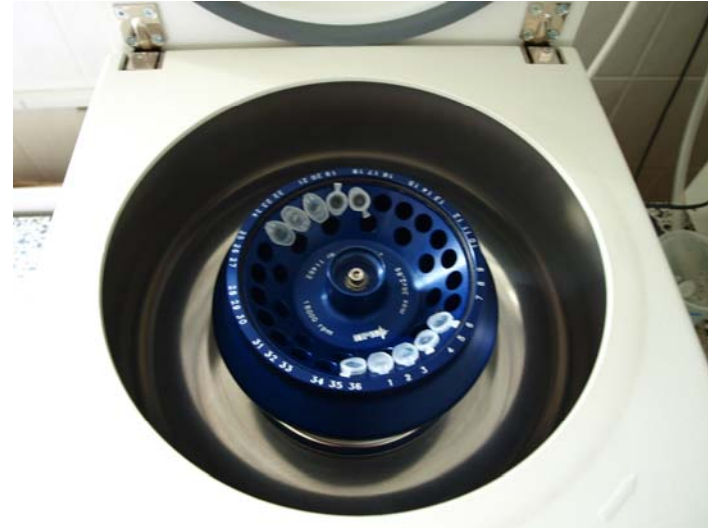
roztoky nutné
pro přípravu
gelů

Extrakce proteinů

- 80 mg navážit do kyvety
- 1 ml ředěného extrakčního roztoku
- extrakce probíhá **přes noc**
- vodní lázeň – 40 °C, 10 minut
- odstředění – 10 000 ot./min.; 5 minut

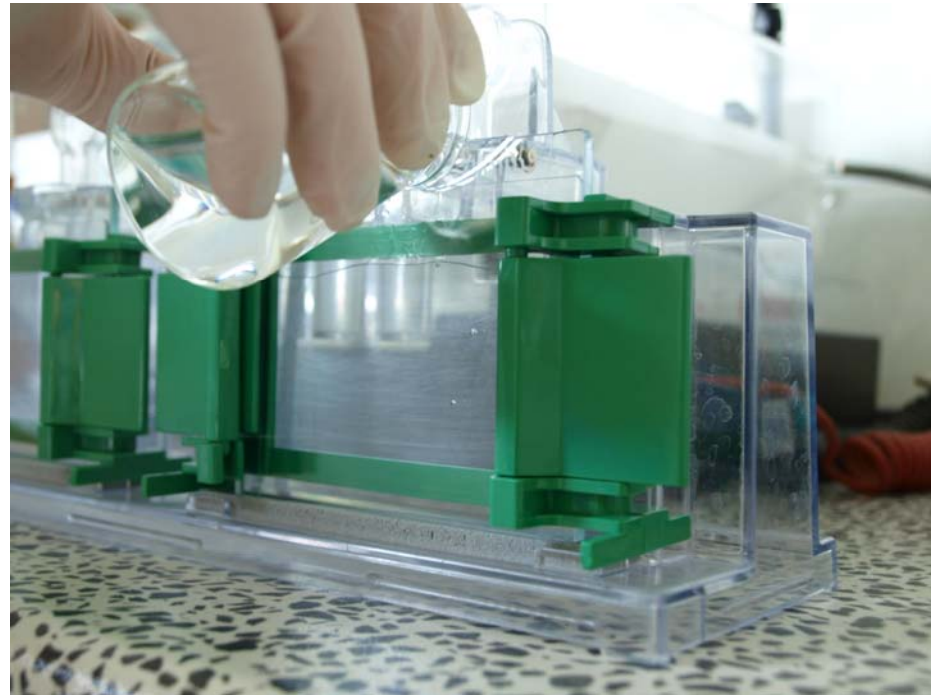


Extrakce proteinů



Příprava separačního gelu

- SLOŽENÍ:
 - pufr pH 8,8
 - akrylamid separační
 - 10% SDS
 - TEMED
 - 1% APS
- tloušťka – 1,5 mm
- převrstvit 2-butanolem
- polymerace 1 hodinu
- 3x promýt dest. vodou



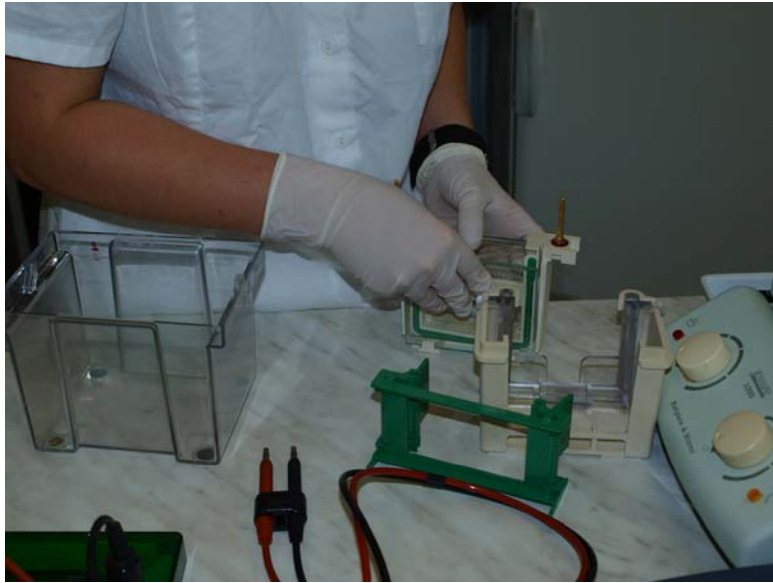
Příprava fokusačního gelu

- SLOŽENÍ:
 - pufr pH 6,8
 - akrylamid fokusační
 - 10% SDS
 - TEMED
 - 1% APS
- vložit hřebínky
- polymerace 2 hodinu
- promýt dest. vodou

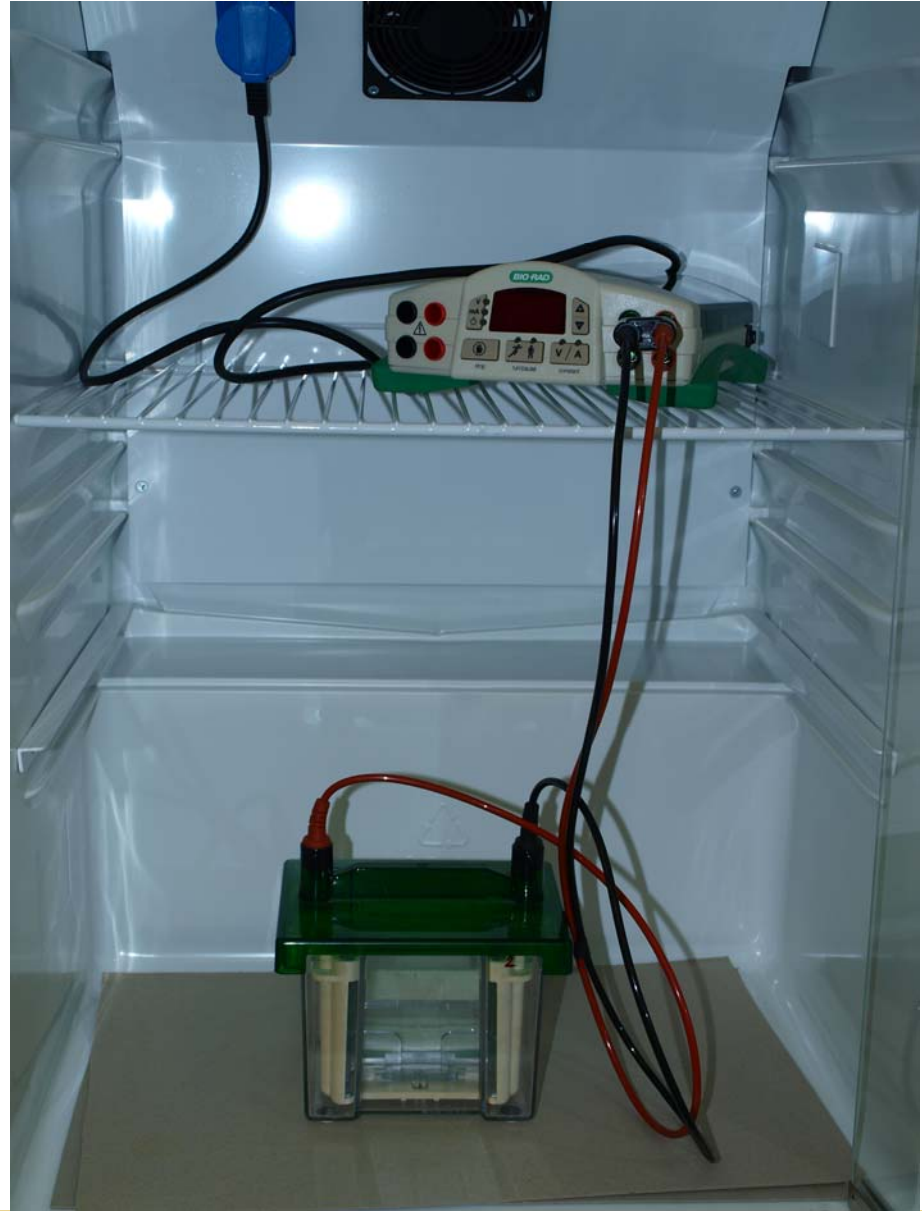


Elektroforéza

- gelové kazety upnout na elektroforetické jádro
 - extrakt do startovacích jamek – 10-15 μ l
 - zalít elektrodovým pufrem
 - připojit ke zdroji – stejnosměrný proud, stabilizované napětí
 - přechod fokus. a separač. gelu – zvednout proud na dvojnásobek
 - v termostatu – 15-20 °C
-







Fixace a barvení

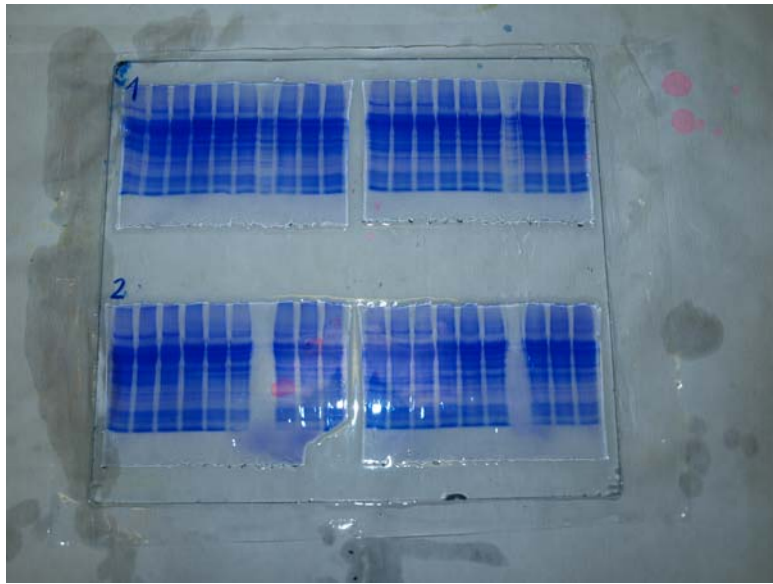
- oddělení fokusačního a separačního gelu ze skel
- ponoření do fixačního roztoku na 1 hodinu – 15% roztok TCA (kyselina trichlóroctová)
- 2x propláchnou v dest. vodě – 2x 5 minut
- ponoření do barvicí lázně – **přes noc**
- odbarvení pozadí gelu – ve vodě

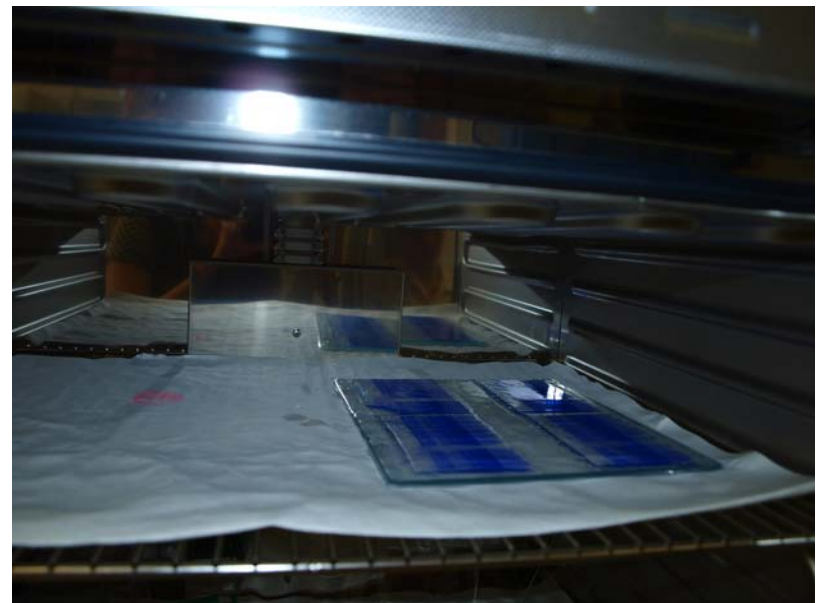
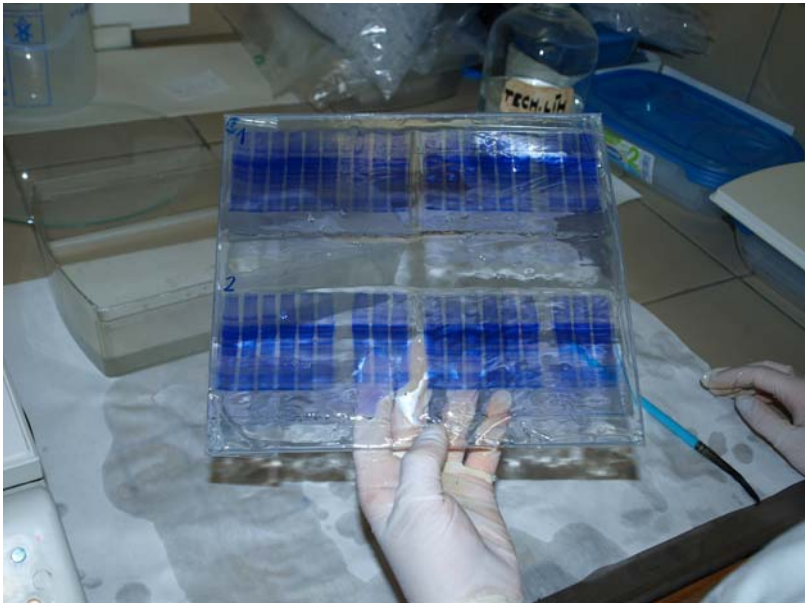
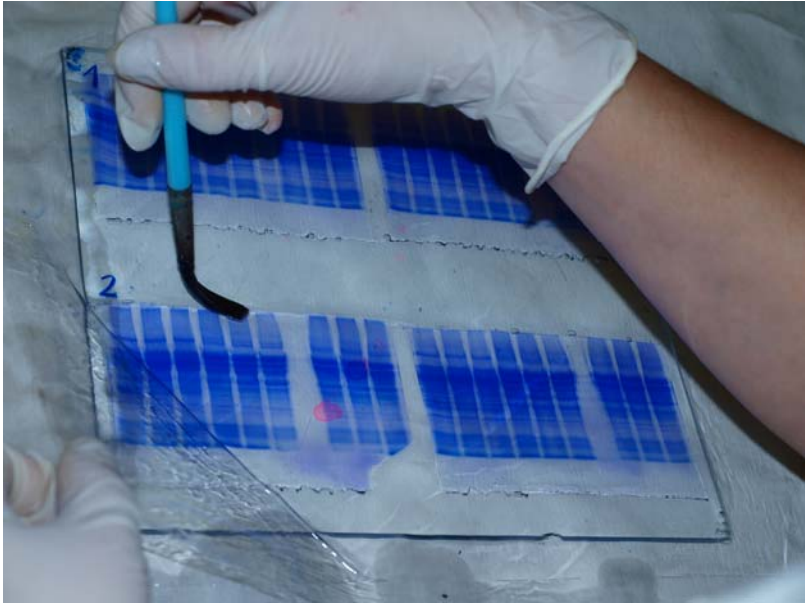


Balení gelů

- sycení celofánu – 10% glycerin, 30 minut
- sušení na skleněných deskách
- sušárna – 60 °C, cca 2 hodiny

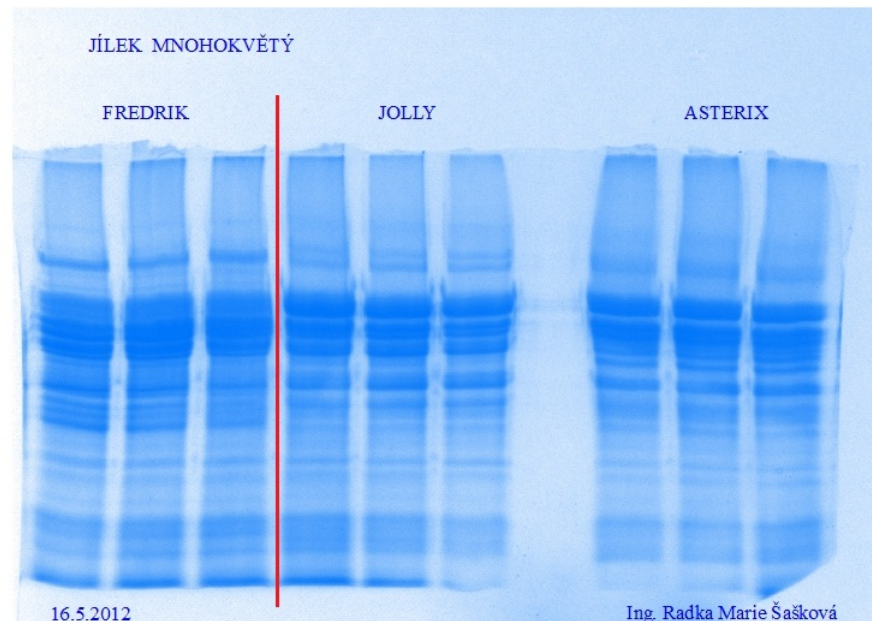






Hodnocení

- srovnání proteinového spektra se spektrem referenční odrůdy

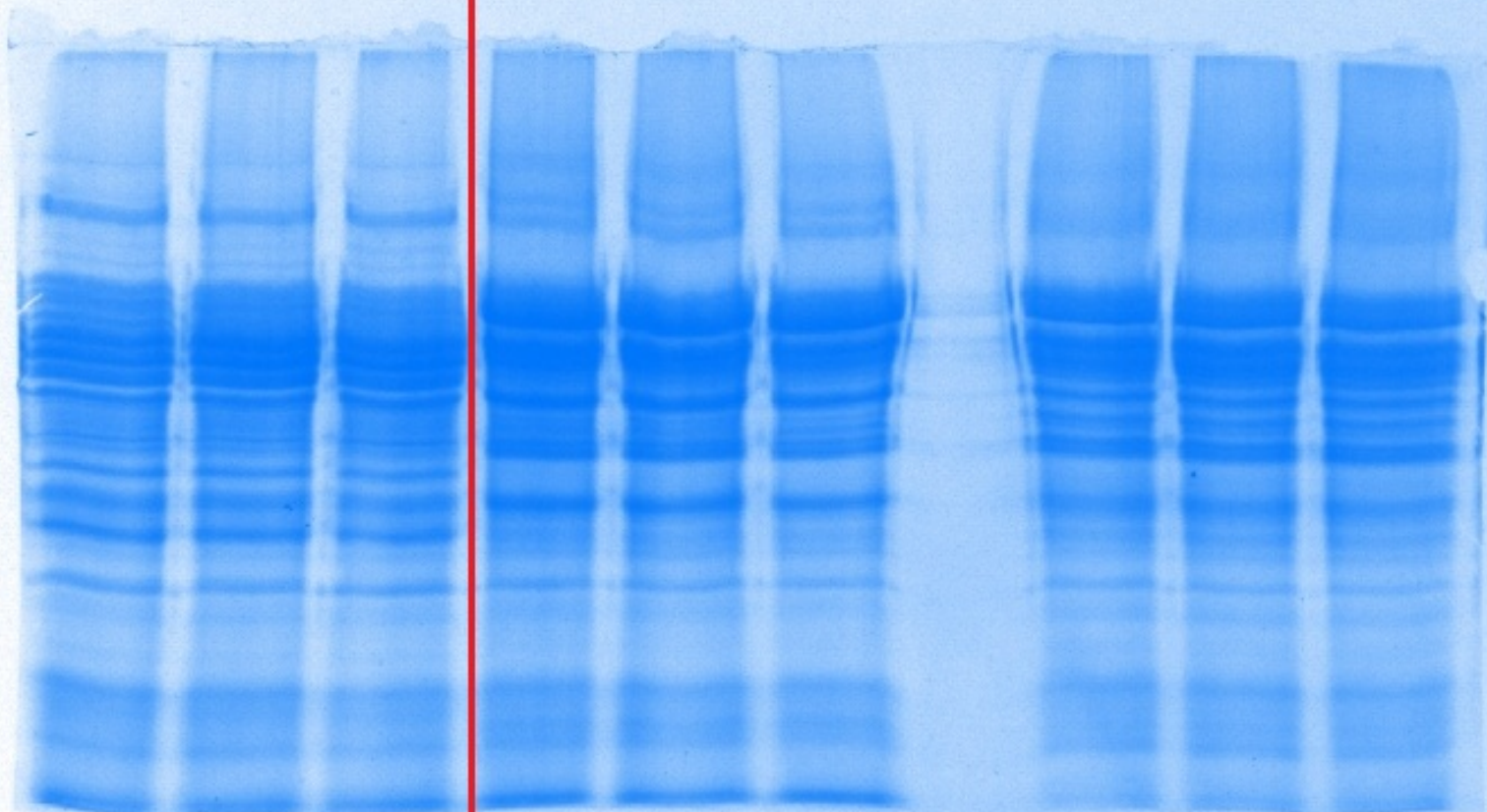


JÍLEK MNOHOKVĚTÝ

FREDRIK

JOLLY

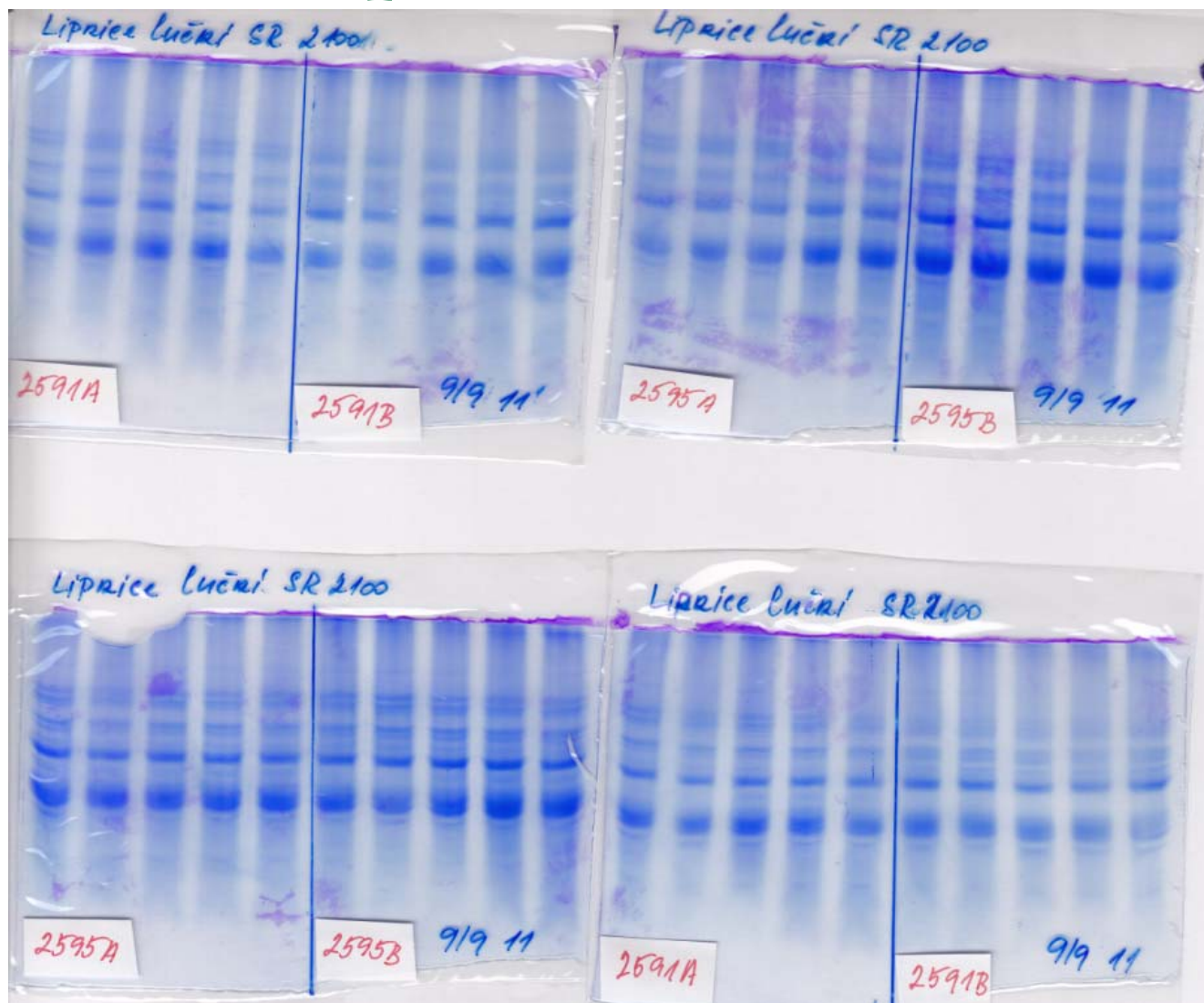
ASTERIX



16.5.2012

Ing. Radka Marie Šašková

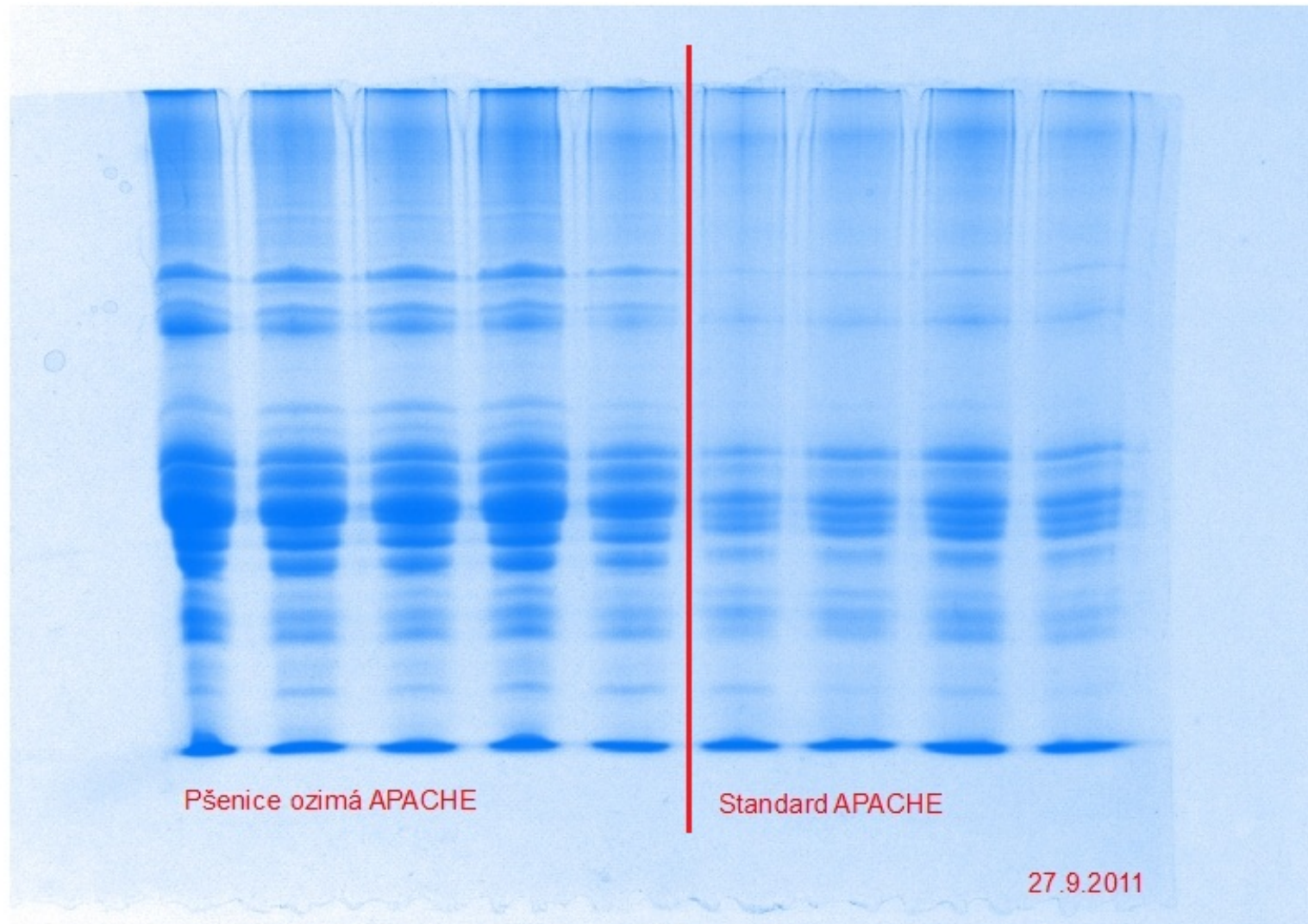
lipnice luční



Jiná elektroforetická stanovení v NRL OOS

- pšenice – gliadiny, gluteniny
 - ječmen – hordeiny
 - oves – aveniny
 - hrách – globuliny
 - jílěk
 - lipnice
 - brambory
 - kukuřice
-

Pšenice ozimá



Děkuji za pozornost
