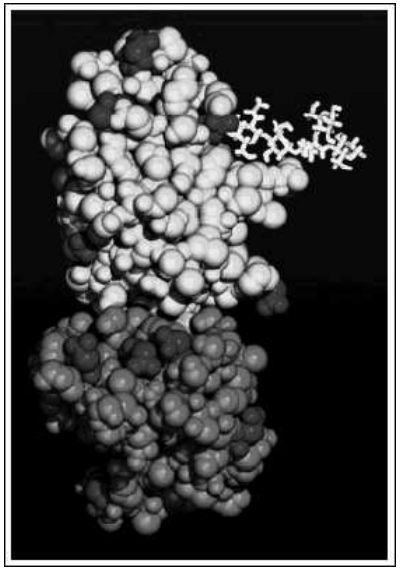
Srážecí metody

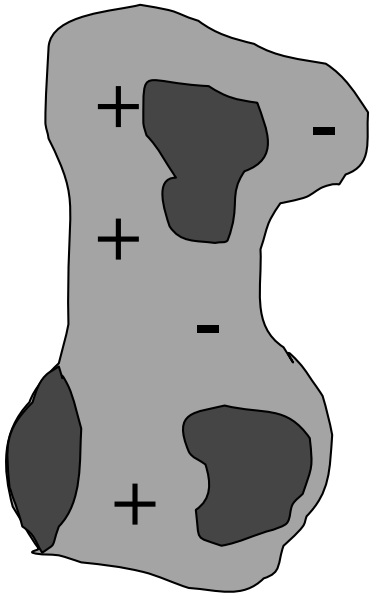
Srážení

- Nezaměňovat s denaturací – bílkoviny zůstávají v nativním stavu
- První metody používané pro separaci bílkovin – EtOH, $(NH_4)_2SO_4$
- Filtrace nahrazena centrifugací

Rozpustnost bílkoviny

- Vlastnostmi bílkoviny – distribuce hydrofobních a hydrofilních skupin na povrchu bílkoviny

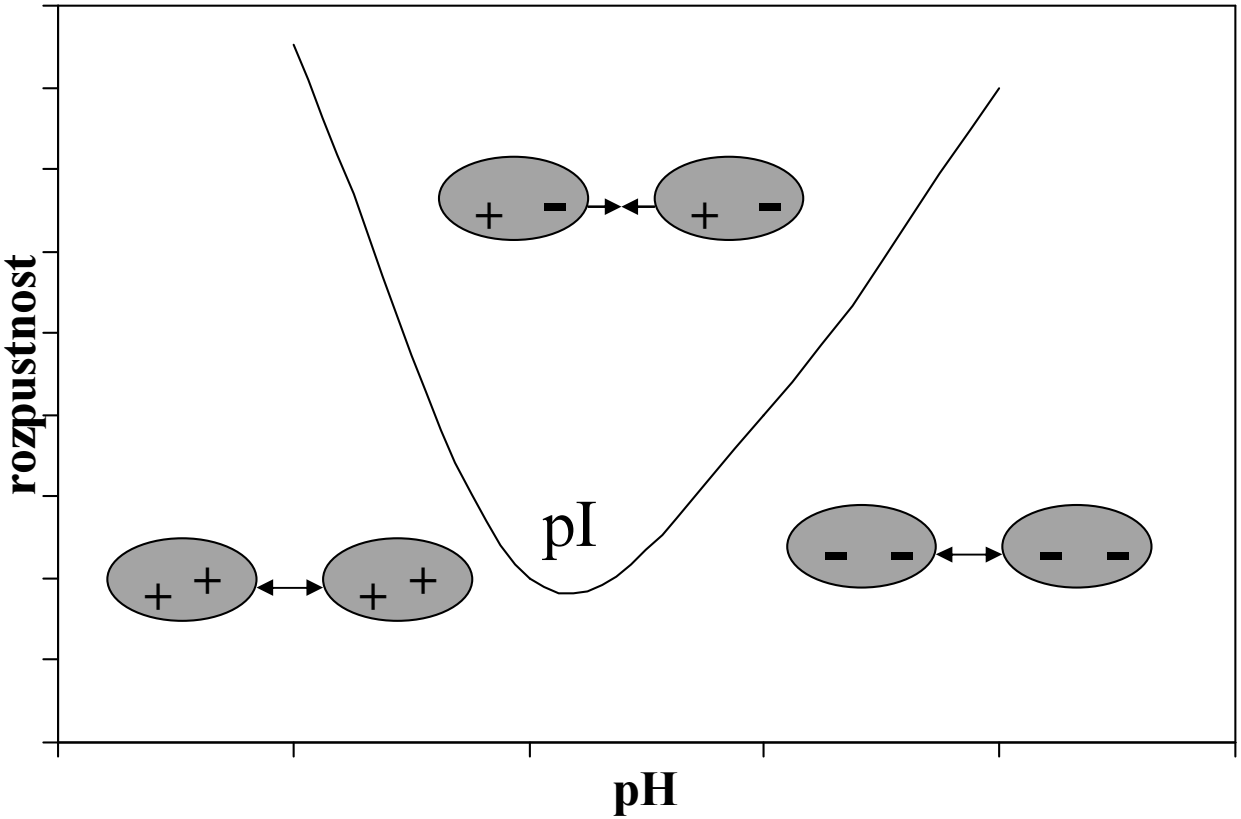




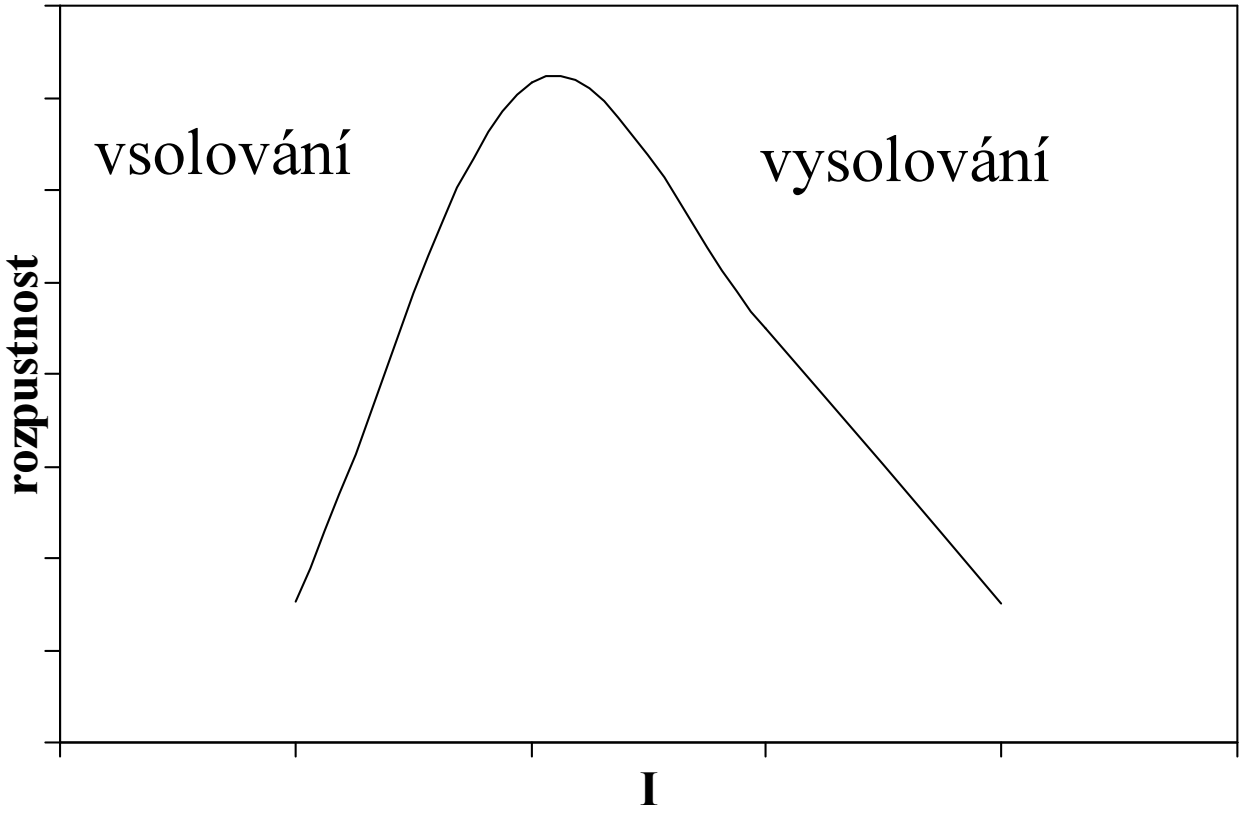
Rozpustnost bílkoviny

- Vlastnostmi roztoku – pH, iontová síla, org. rozpouštědla, org. polymery, teplota

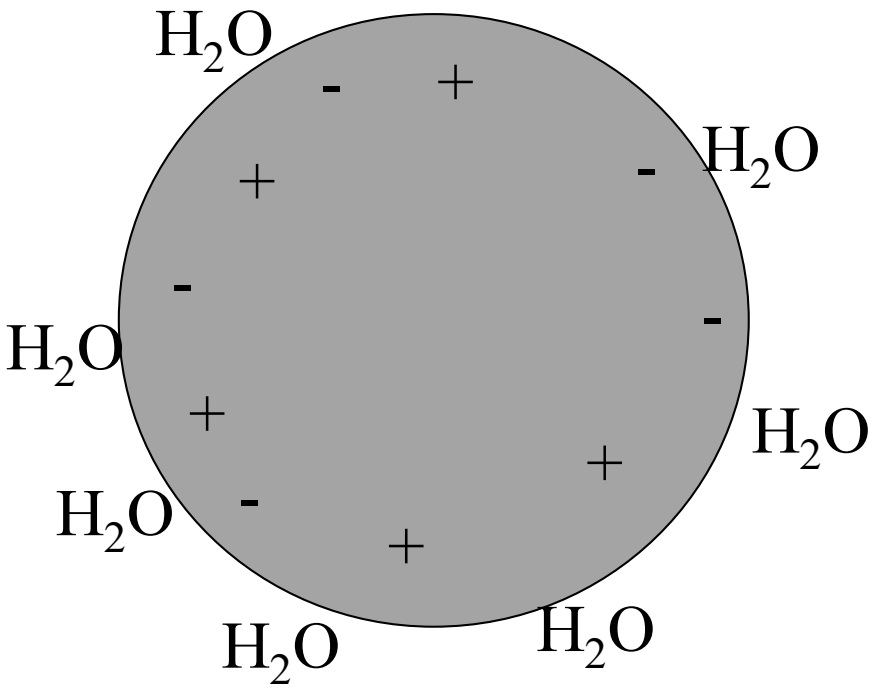
Izoelektrická precipitace



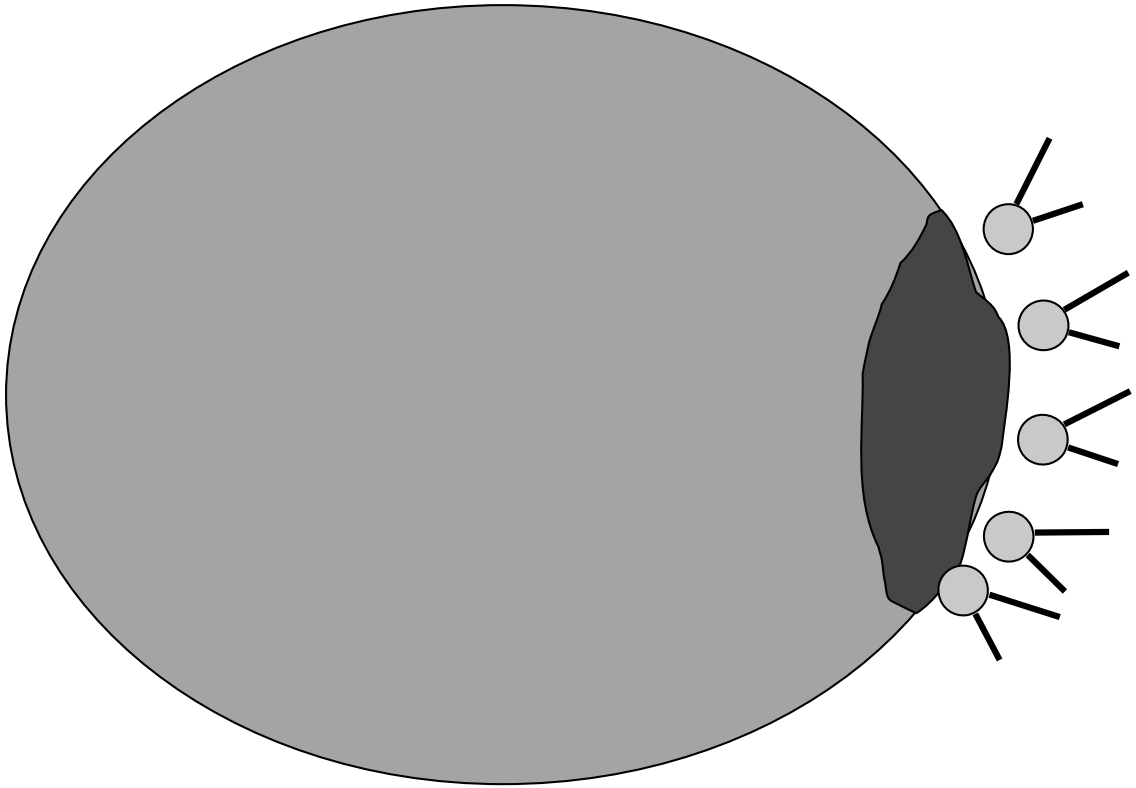
Srážení neutrálními solemi



Vsolování



Vysolování



Praktické aspekty

- Hofmeistrova řada

  <u>Anionty</u> ⟶

  SCN^-, J^-, ClO_4^-, NO_3^-, Br^-, Cl^-, Ac^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-}

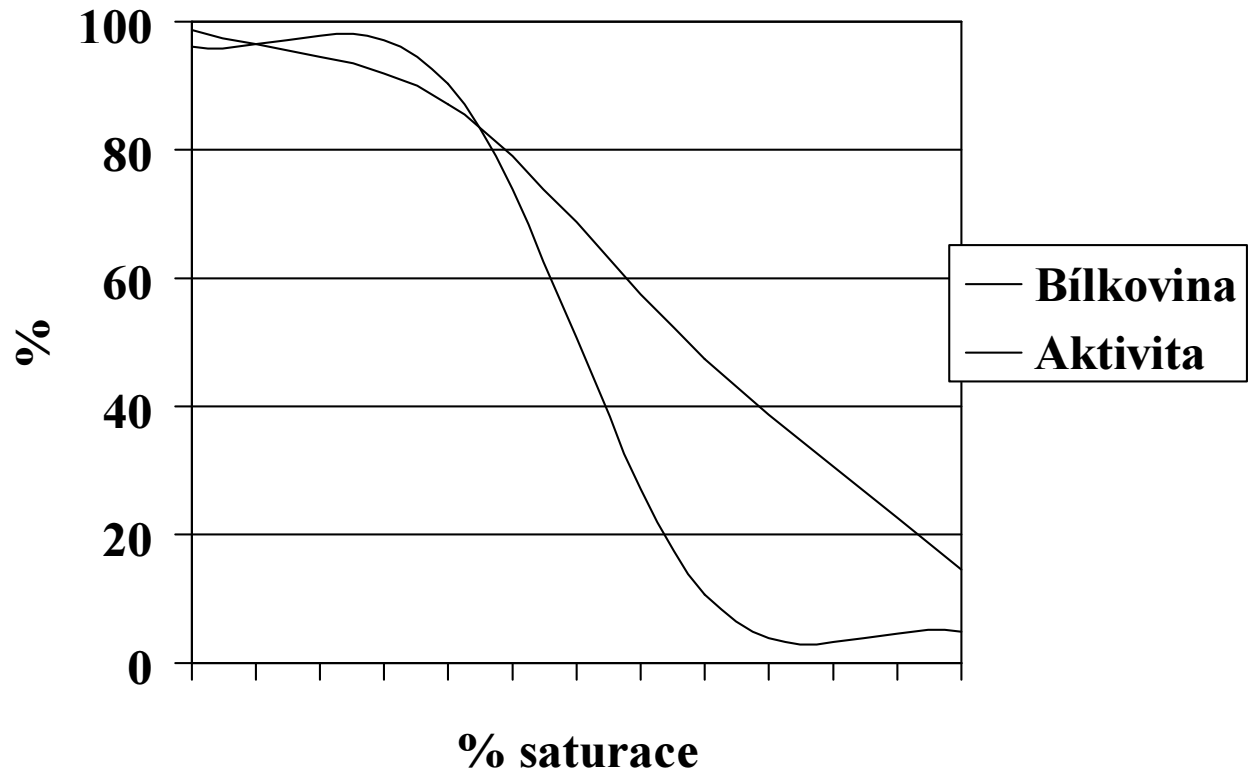
  <u>Kationty</u> ⟶

  Na^+, K^+, NH_4^+

$(NH_4)_2SO_4$

- Rozpustnost se málo mění s teplotou
- Saturovaný roztok 4 M - hustota 1,235g/cm^3 umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin (hustota 1,29 g/cm^3)
- Levný
- Stabilizuje bílkoviny
- Relativně čistý

Srážení - dvojstupňově



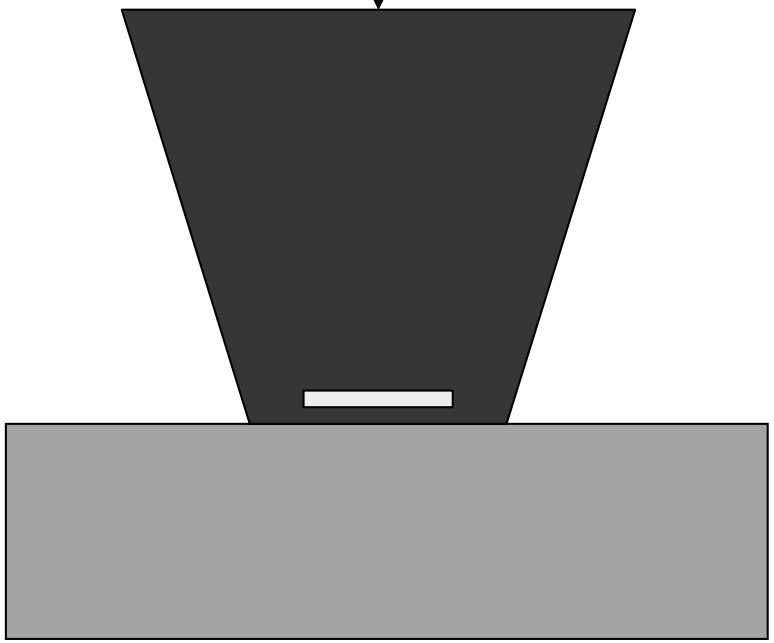
Přidané množství

- Tabulky
- Vzorce

$$g/l = \frac{533 \cdot (S_2 - S_1)}{100 - 0.3 \cdot S_2}$$

Provedení

Chlazení
Míchání 10-30’
Centrifugace



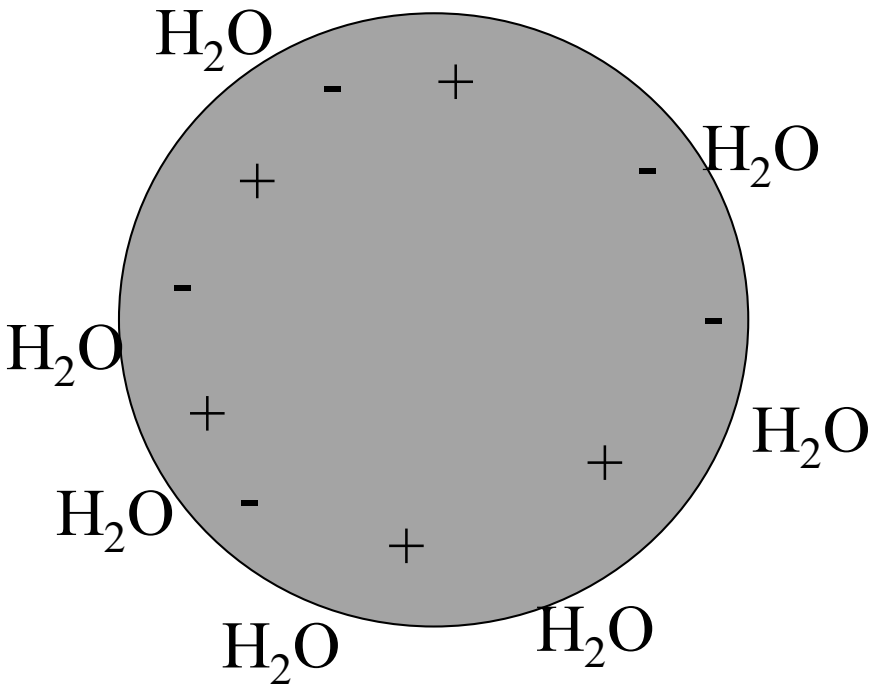
pevný $(NH_4)_2SO_4$
nebo
saturovaný roztok
$(NH_4)_2SO_4$

úprava pH
NH_4OH

El. míchačka

Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- Rozpouštědla ruší solvatační obal bílkoviny



Výběr rozpouštědla

- Kompletně mísitelné s vodou
- Nereaguje s bílkovinou
- Musí mít dobrý precipitační efekt

EtOH, aceton, MetOH, propanol, dioxan

Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- COHN – separace plazmatických bílkovin EtOH
- Nutno provádět při T < 0 ^{o}C, při větší teplotě dochází k denaturaci
- Dvojstupňově
- Přídavky z tabulky nebo podle vzorce

Srážení org.polymery

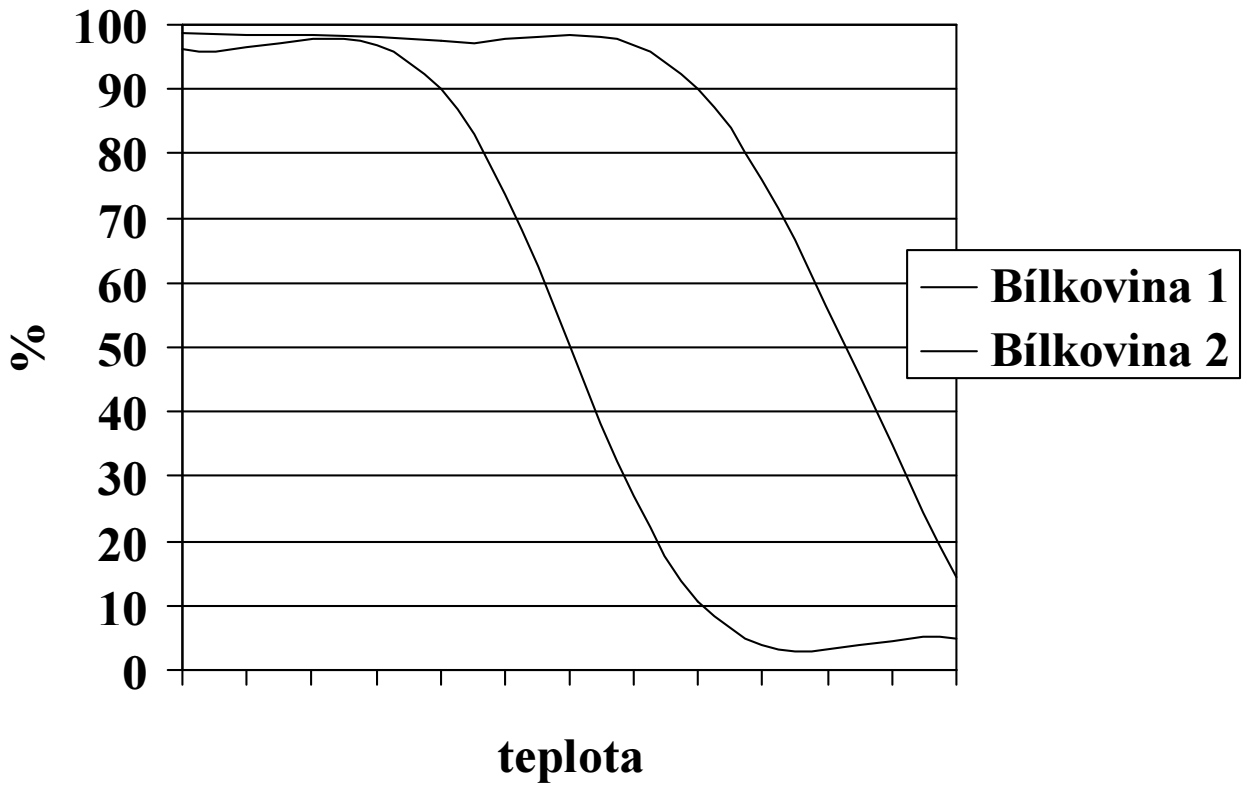
Princip identický s rozpouštědly

- DEAE dextran
- PEG
- Polyakrylová kyselina
- Rivanol
- Kaprylová kyselina

Srážení selektivní denaturací

- Při této metodě denaturujeme balastní bílkoviny, cílová bílkovina musí zůstat z 85 - 90 % v nativním stavu.
- Denaturační vlivy – T, pH, org. rozpouštědla
- Bílkovina musí nejen denaturovat i precipitovat

Tepelná denaturace



Tepelná denaturace

- Doba inkubace je důležitá pouze pro reprodukovatelnost – denaturační křivka se tím posouvá po teplotní ose, má význam pro vyhřívání větších objemů

- Přídavky některých látek (substráty, koenzymy, inhibitory) zvyšují stabilitu cílových bílkovin

- pH při tepelné denaturaci musí být přesně definováno
- Při vyšší teplotě běží více proteolýza

pH denaturace

- Provádět za definované teploty
- Změny pH dělat co nejrychleji
- Pro změny pokud možno nepoužívat silné kyseliny a zásady

pH 5	HAc	pH 8	Tris
pH 4	k.mléčná	pH 9	DEA
pH 2	H_3PO_4, H_2SO_4	pH 11	NaOH

- Extrémy pH – bílkovina silně ionizovaná a zůstává v rozpuštěném stavu → nutná zpětná úprava pH

Denaturace org.rozpouštědly

- Pří srážení organickými rozpouštědly –

  $T < 0\ ^{o}C$

- Pří denaturaci organickými rozpouštědly –

  $T = 20 – 30\ ^{o}C$

- Alkoholy s delšími alifatickými řetězci mají větší denaturační vliv
- T a pH musí být přesně definovány

EtOH, MetOH, aceton