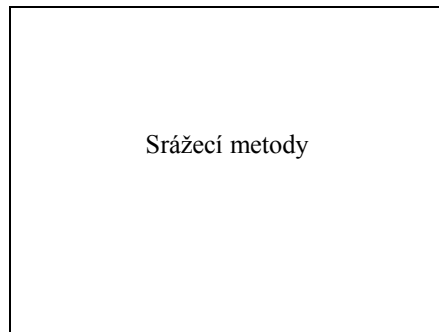
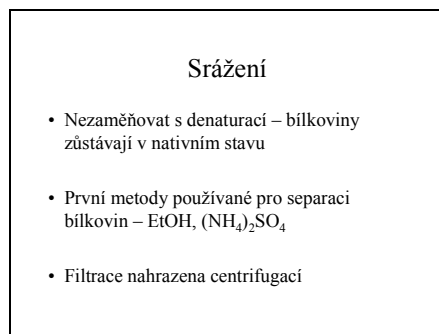


snímek 1



snímek 2



snímek 3

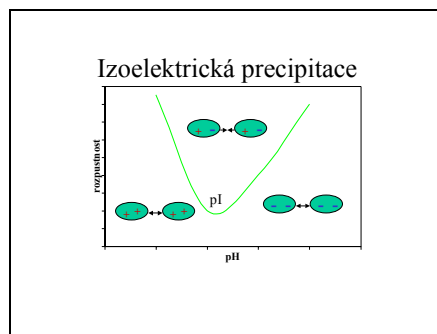


snímek 4

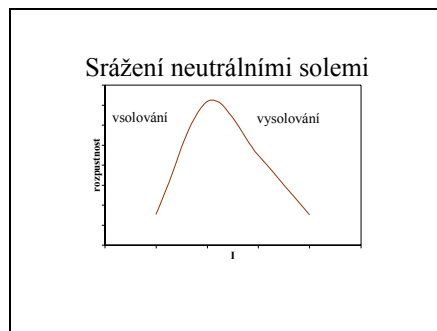
Rozpustnost bílkoviny

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

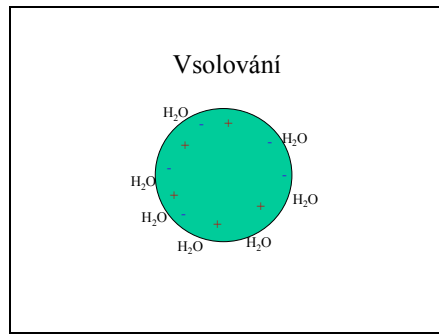
snímek 5



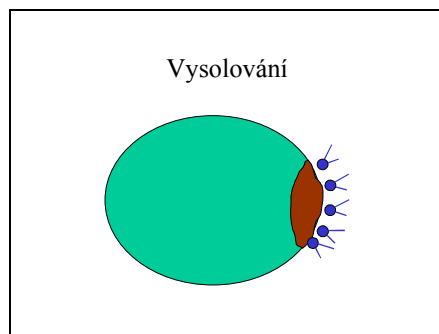
snímek 6



snímek 7



snímek 8



snímek 9

Praktické aspekty

- Hofmeisterova řada
Anionty →
SCN⁻, I⁻, ClO₄⁻, NO₃⁻, Br⁻, Cl⁻, Ac⁻, SO₄²⁻,
PO₄³⁻
Kationty →
Na⁺, K⁺, NH₄⁺

snímek 10

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

- Rozpuštnost se málo mění s teplotou
- Saturevaný roztok 4 M - hustota 1,235g/cm³ umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin (hustota 1,29 g/cm³)
- Levný
- Stabilizuje bílkoviny
- Relativně čistý

snímek 11

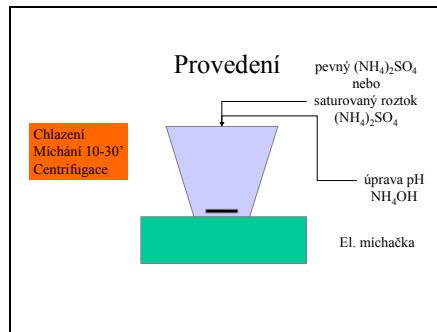


snímek 12

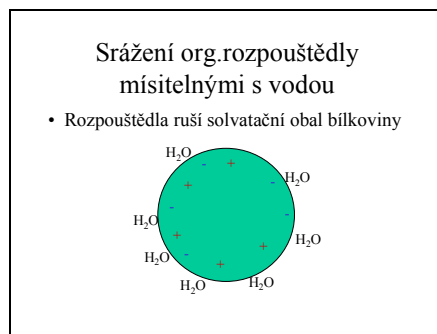
Přidané množství

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

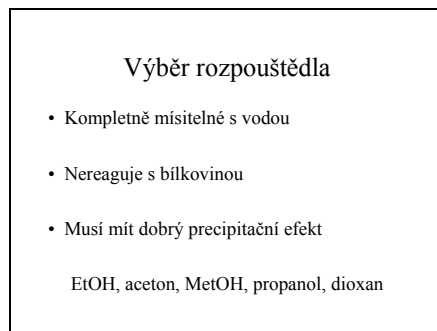
snímek 13



snímek 14



snímek 15



snímek 16

**Srážení org.rozpouštědly
mísitelnými s vodou**

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

snímek 17

Srážení org.polymery

Princip identický s rozpouštědly

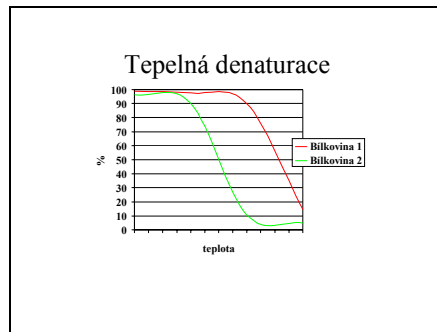
- DEAE dextran
- PEG
- Polyakrylová kyselina
- Rivanol
- Kaprylová kyselina

snímek 18

Srážení selektivní denurací

- 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

snímek 19



snímek 20

Tepelná denaturace

- Doba inkubace je důležitá pouze pro reprodukovatelnost – denaturační křivka se tím posouvá po teplotní ose, má význam pro vyhřívání větších objemů
- Přidávky některých látek (substráty, koenzymy, inhibitory) zvyšují stabilitu cílových bílkovin

snímek 21

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

snímek 22

pH denaturace

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

snímek 23

| | | | |
|------|---|-------|------|
| pH 5 | HAc | pH 8 | Tris |
| pH 4 | k.mléčná | pH 9 | DEA |
| pH 2 | H ₃ PO ₄ , H ₂ SO ₄ | pH 11 | NaOH |

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

snímek 24

Denaturace org.rozpouštědly

- Při srážení organickými rozpouštědly –
T < 0 °C
- Při denaturaci organickými rozpouštědly –
T = 20 – 30 °C
- Alkoholy s delšími alifatickými řetězci mají větší denaturační vliv
- T a pH musí být přesně definovány
EtOH, MetOH, aceton
