

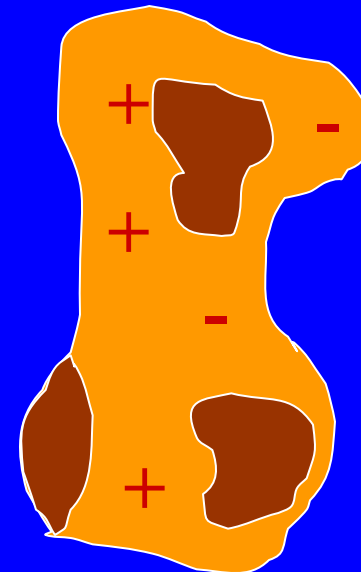
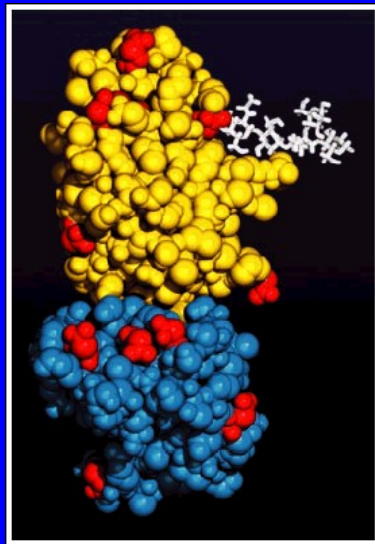
# Srážecí metody

# Srážení

- Nezaměňovat s denaturací – bílkoviny zůstávají v nativním stavu
- První metody používané pro separaci bílkovin – EtOH,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Filtrace nahrazena centrifugací

# Rozpusťnost bílkoviny

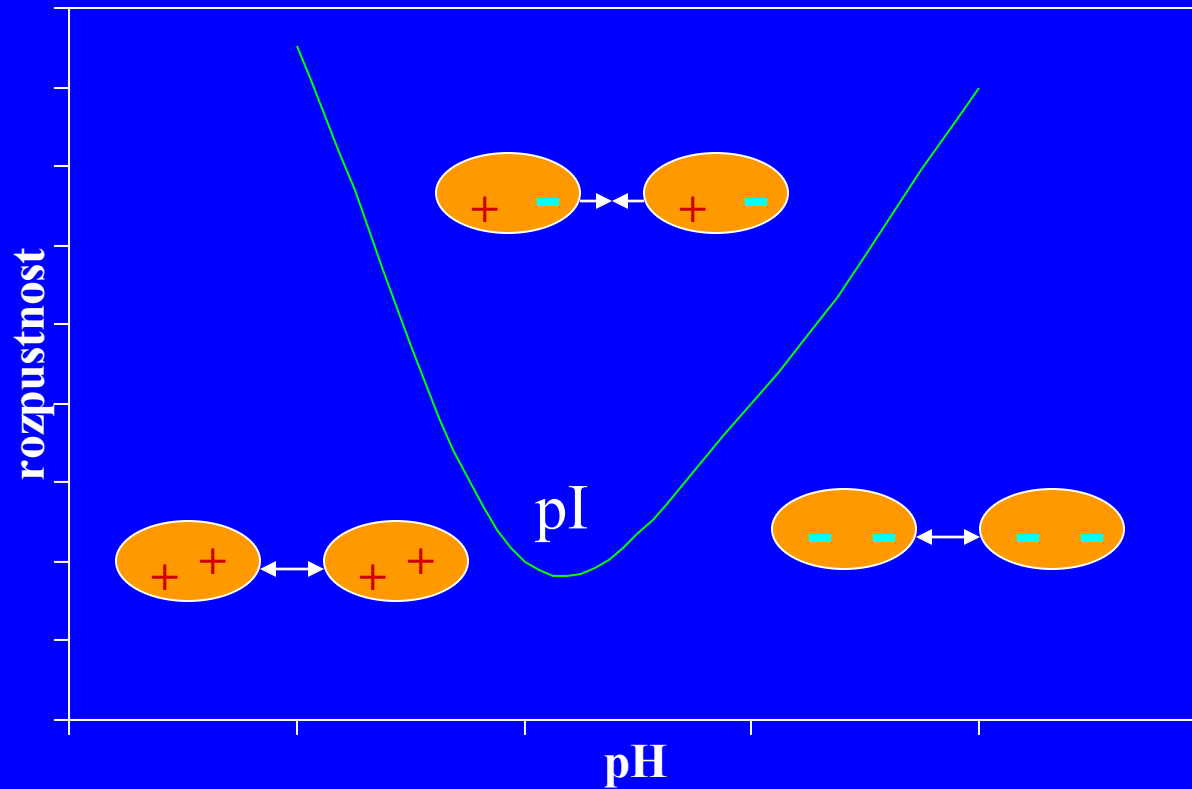
- Vlastnostmi bílkoviny – distribuce hydrofobních a hydrofilních skupin na povrchu bílkoviny



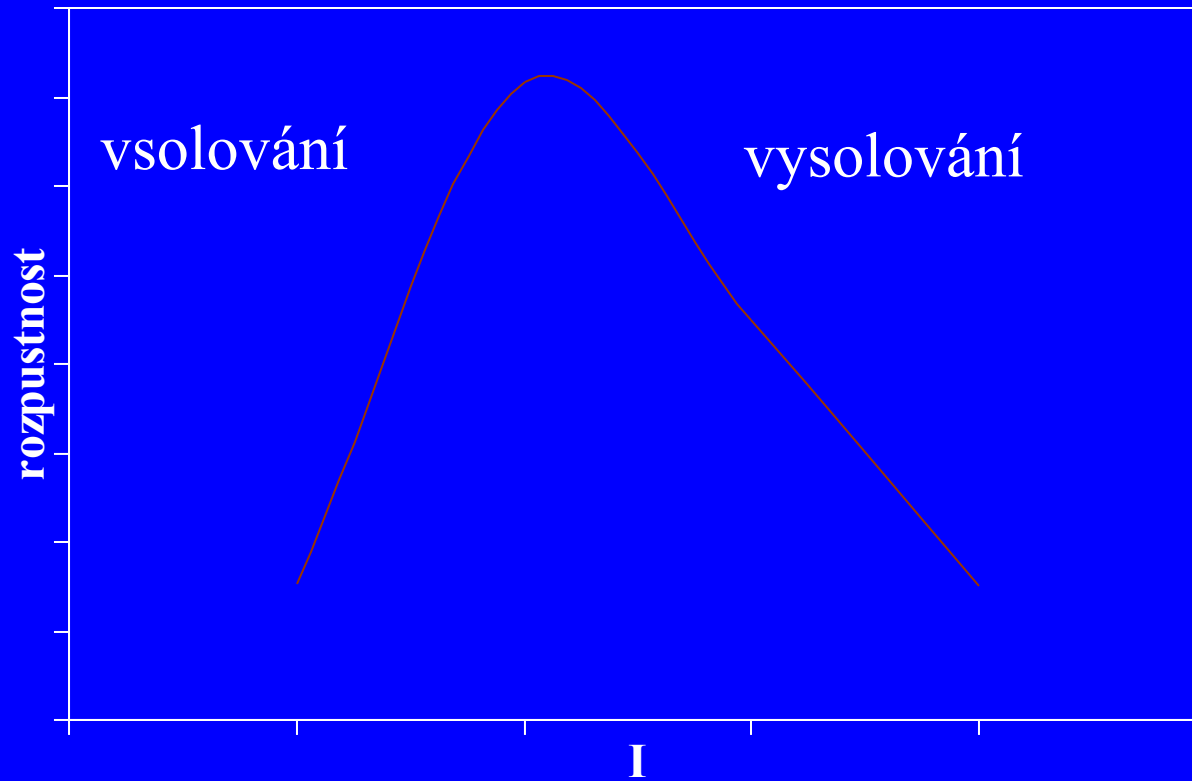
# Rozpusťnost bílkoviny

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

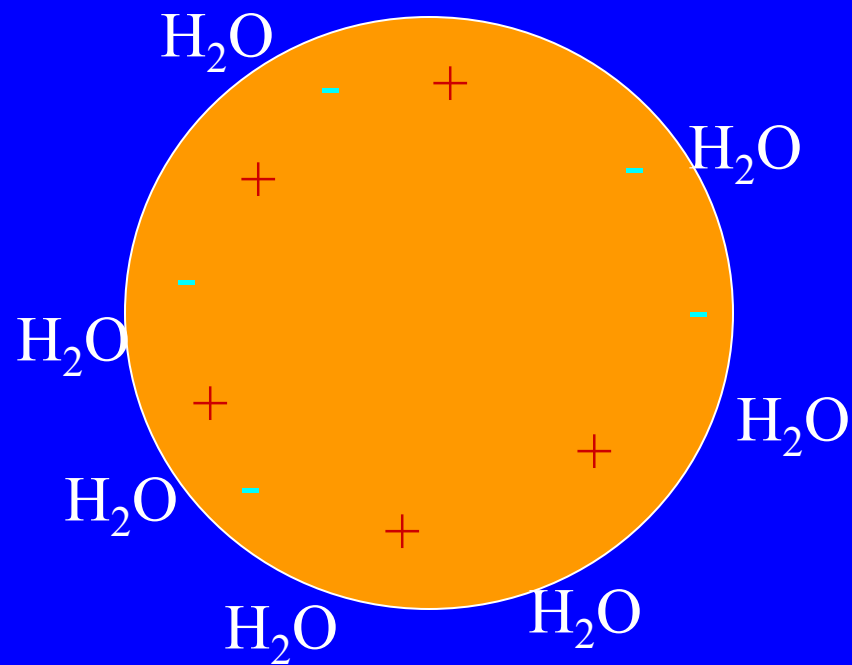
# Izoelektrická precipitace



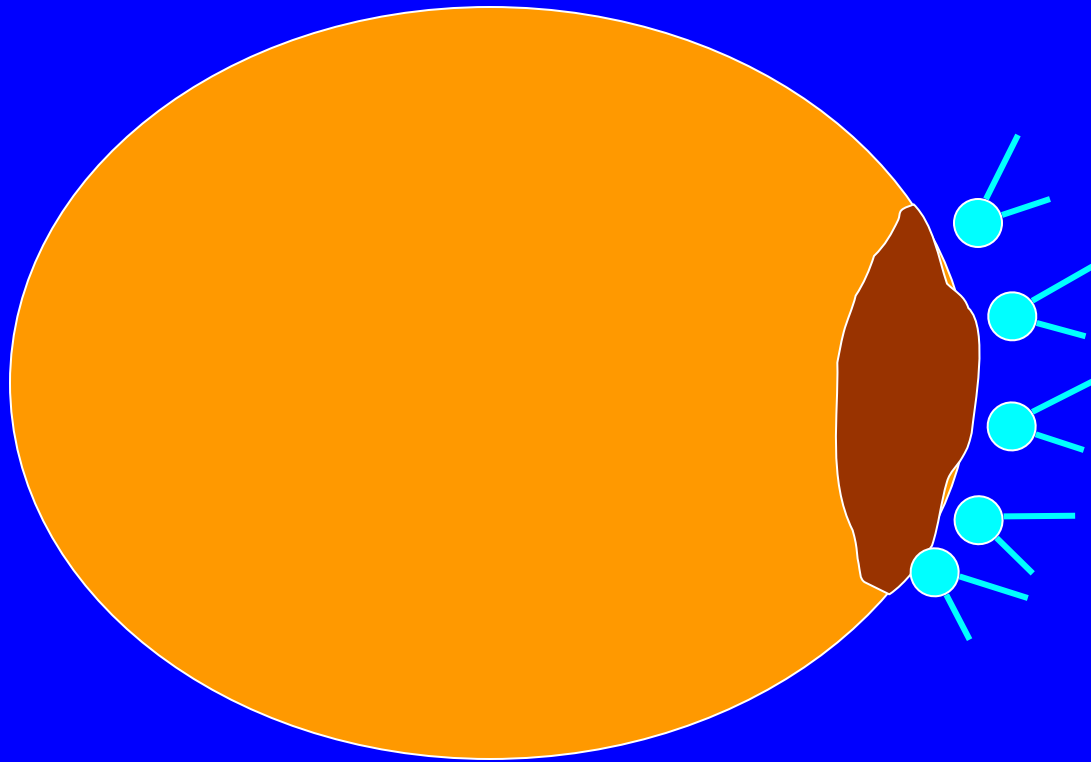
# Srážení neutrálními solemi



# Vsolování



# Vysolování





# Praktické aspekty

- Hofmeisterova řada

Anionty —————→

SCN<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ac<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>,  
PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>

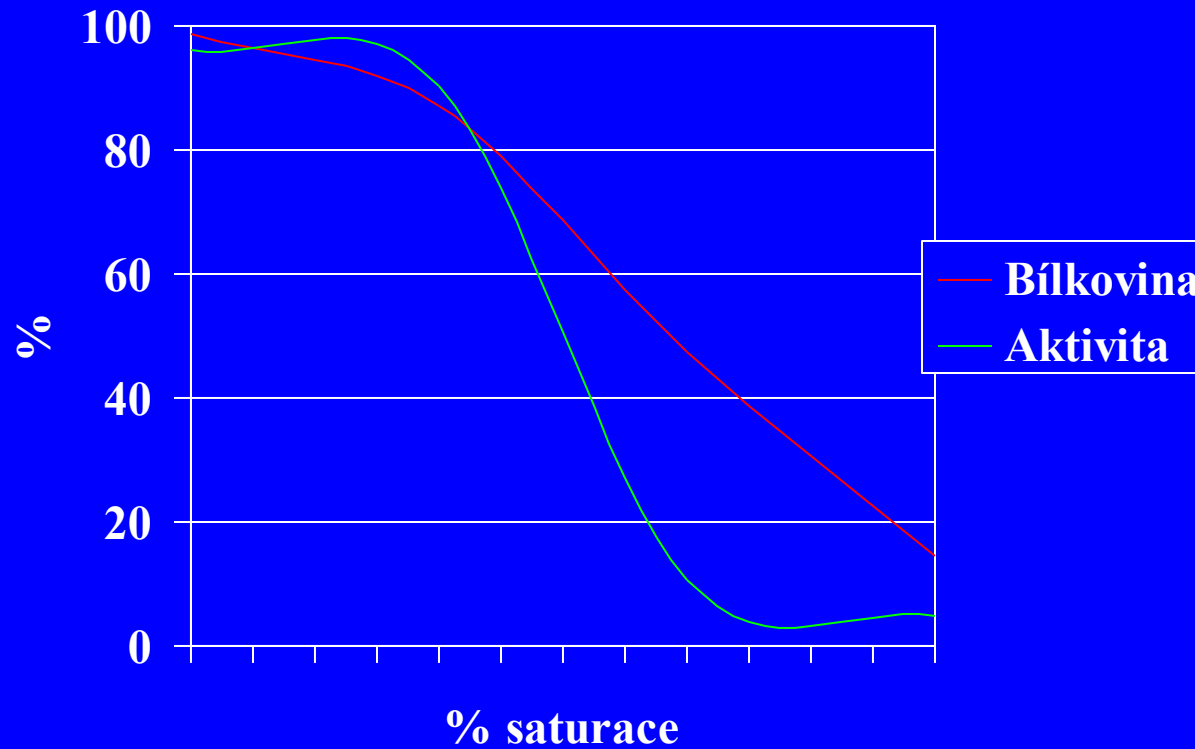
Kationty —————→

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>



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

# Srážení - dvojstupňově



# Přidané množství

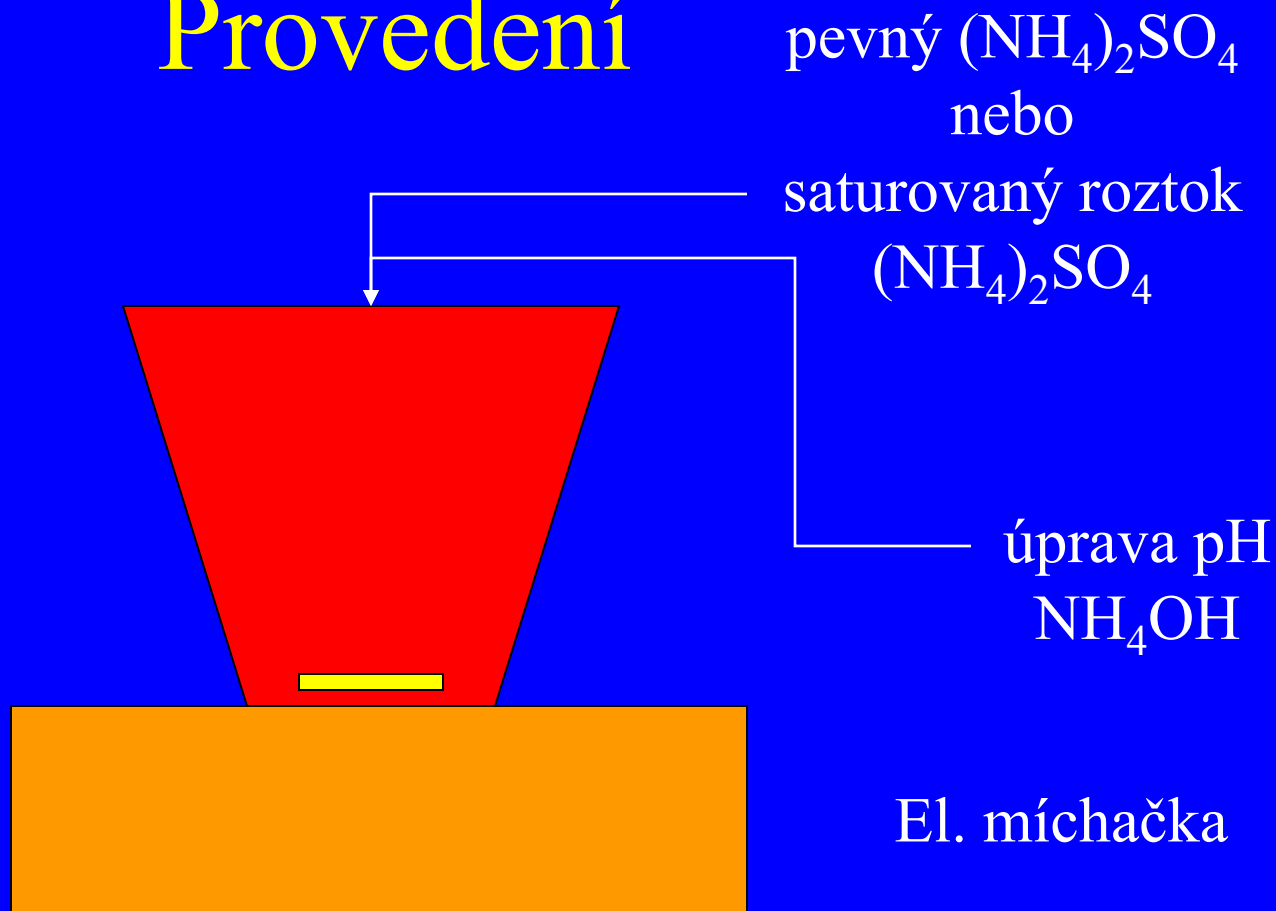
- Tabulky

- Vzorce

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

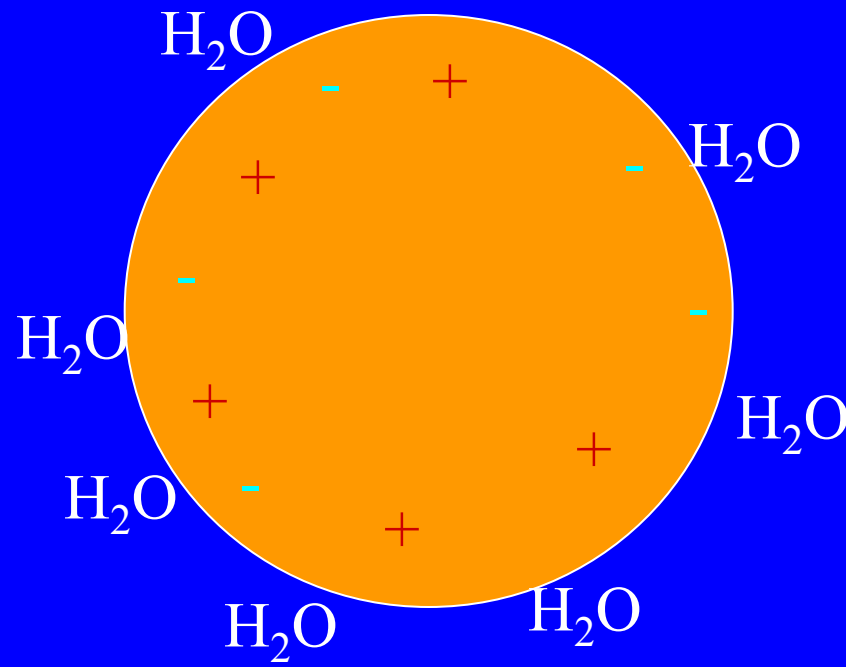
# Provedení

Chlazení  
Míchání 10-30'  
Centrifugace



# 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  $T < 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , při větší teplotě dochází k denaturaci
- Dvojstupňově
- Přídavky z tabulky nebo podle vzorce



# Srážení org.polymery

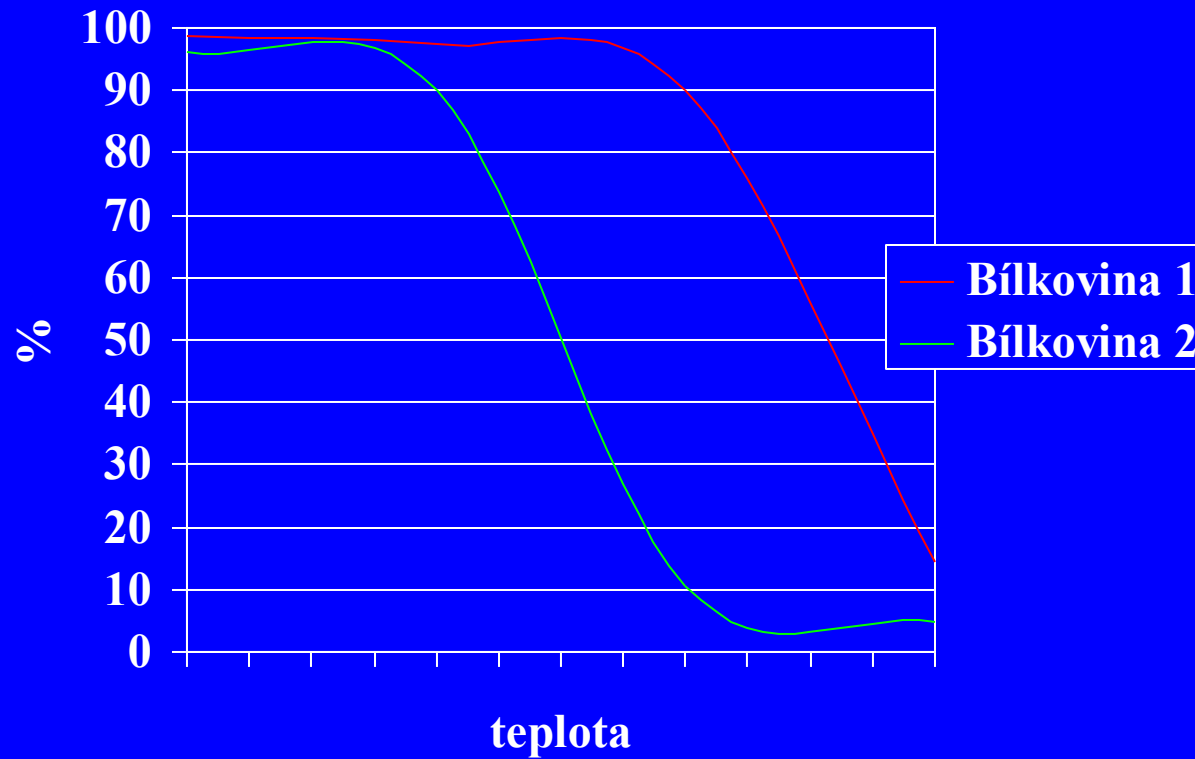
Princip identický s rozpouštědly

- 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 <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	pH 11	NaOH

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

# Denaturace org.rozpouštědly

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