

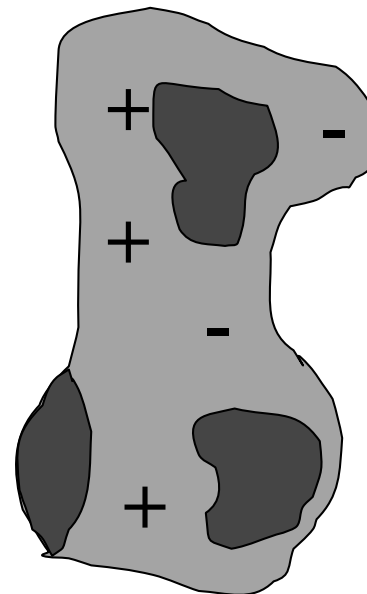
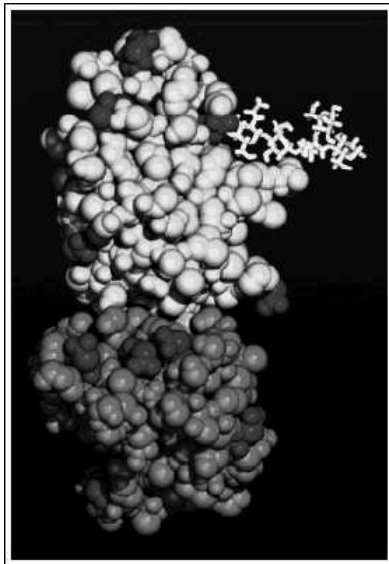
# Srážecí metody

# 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

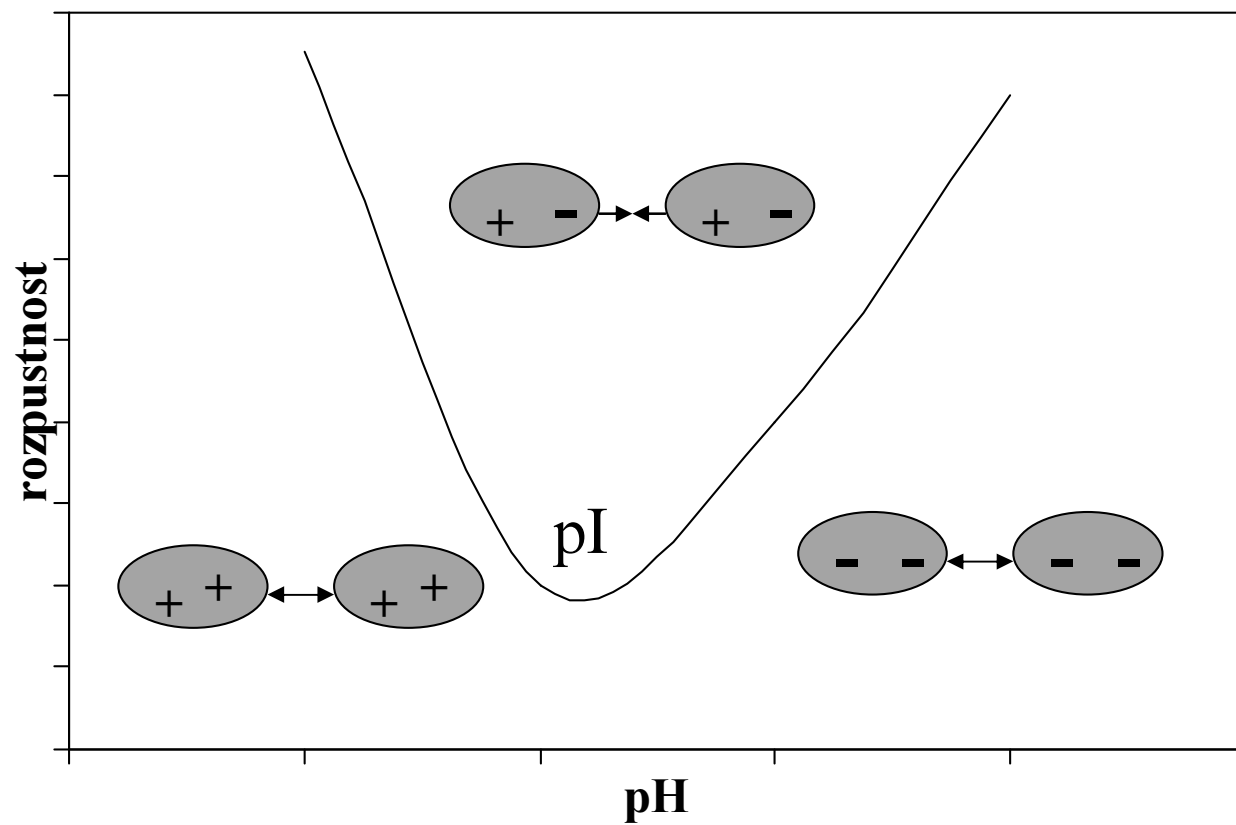
- Vlastnostmi bílkoviny – distribuce hydrofobních a hydrofilních skupin na povrchu bílkoviny



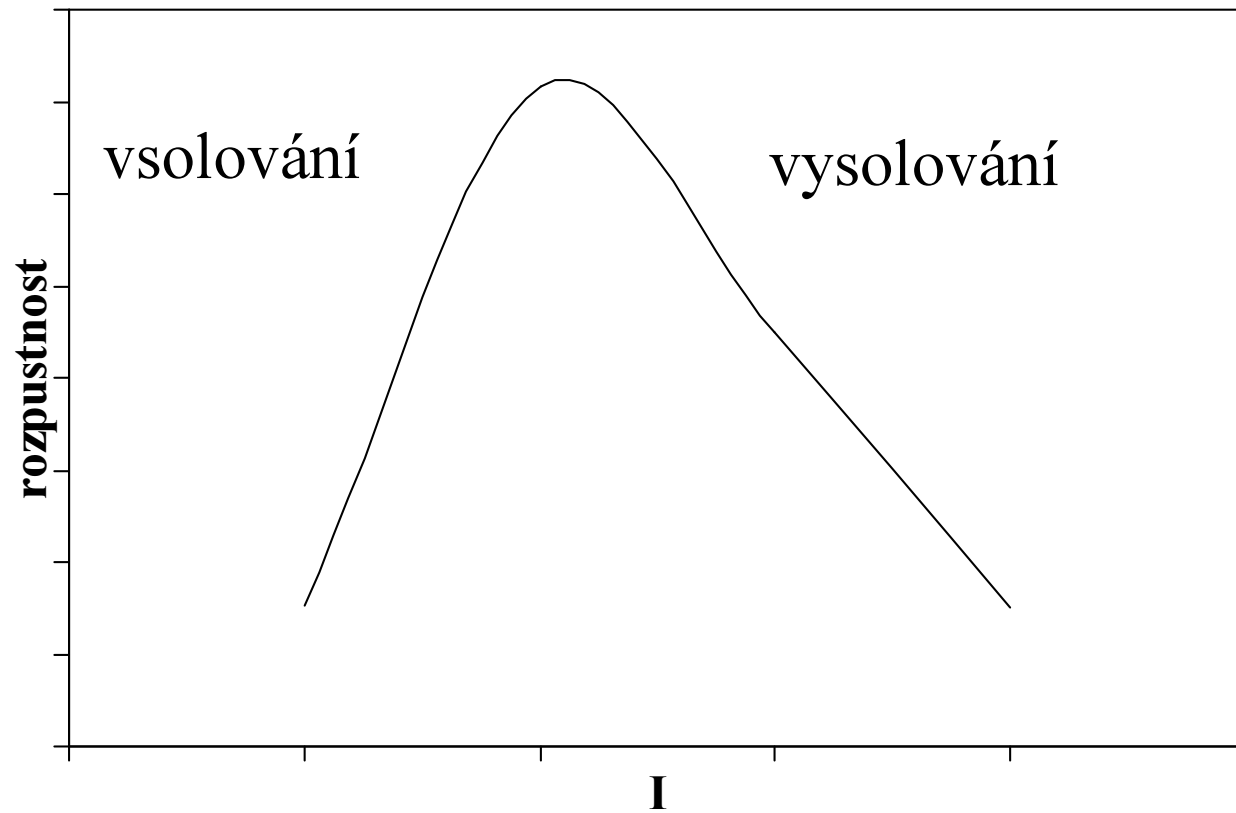
# Rozpusťnost bílkoviny

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

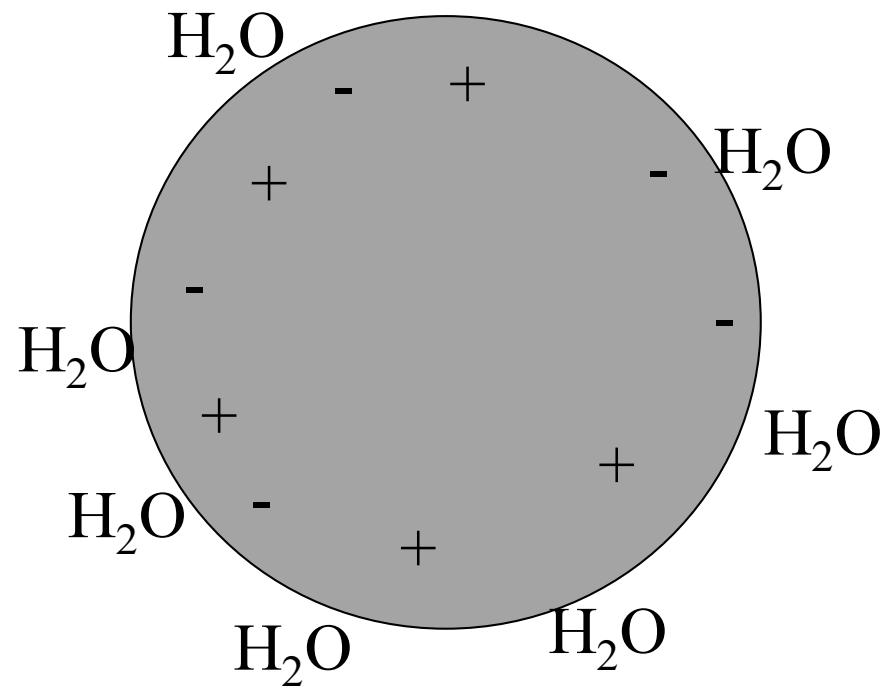
# Izoelektrická precipitace



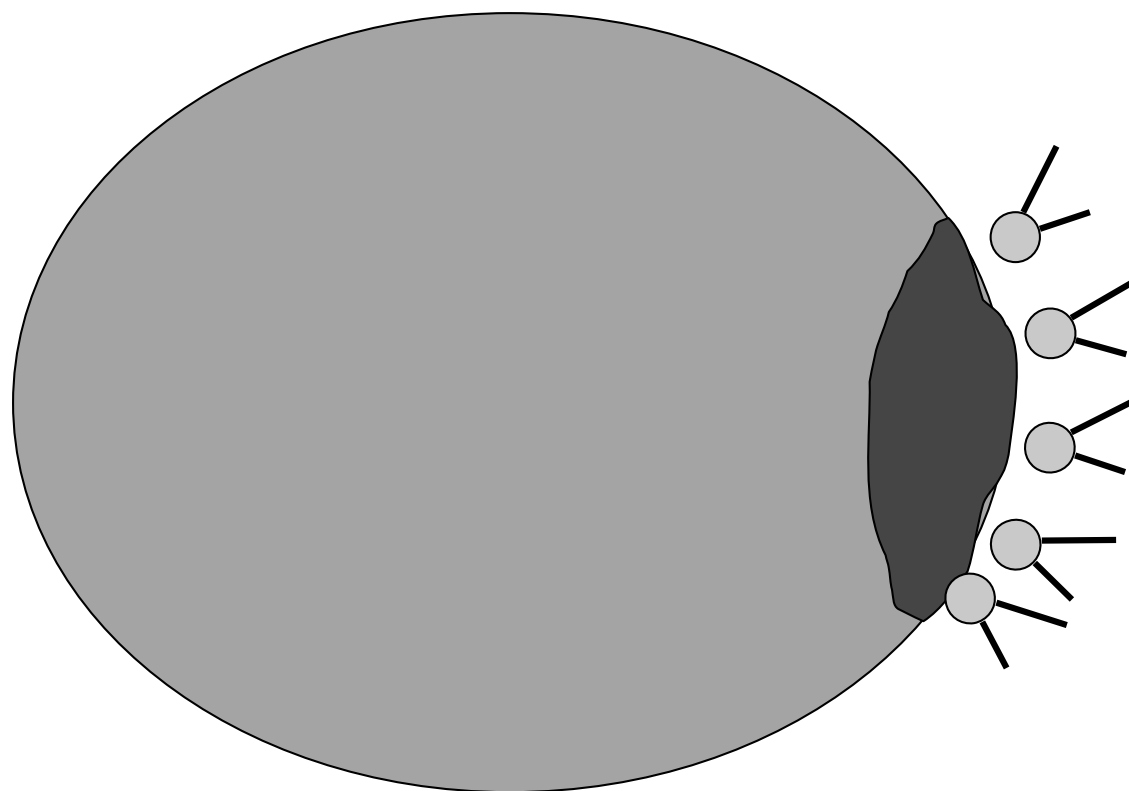
# Srážení neutrálními solemi



# Vsolování



# Vysolování





# Praktické aspekty

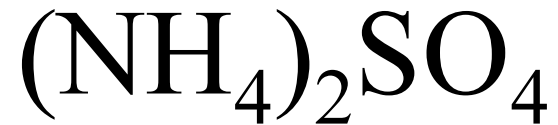
- Hofmeisterova řada

Anionty  $\longrightarrow$

$\text{SCN}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ac}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  
 $\text{PO}_4^{3-}$

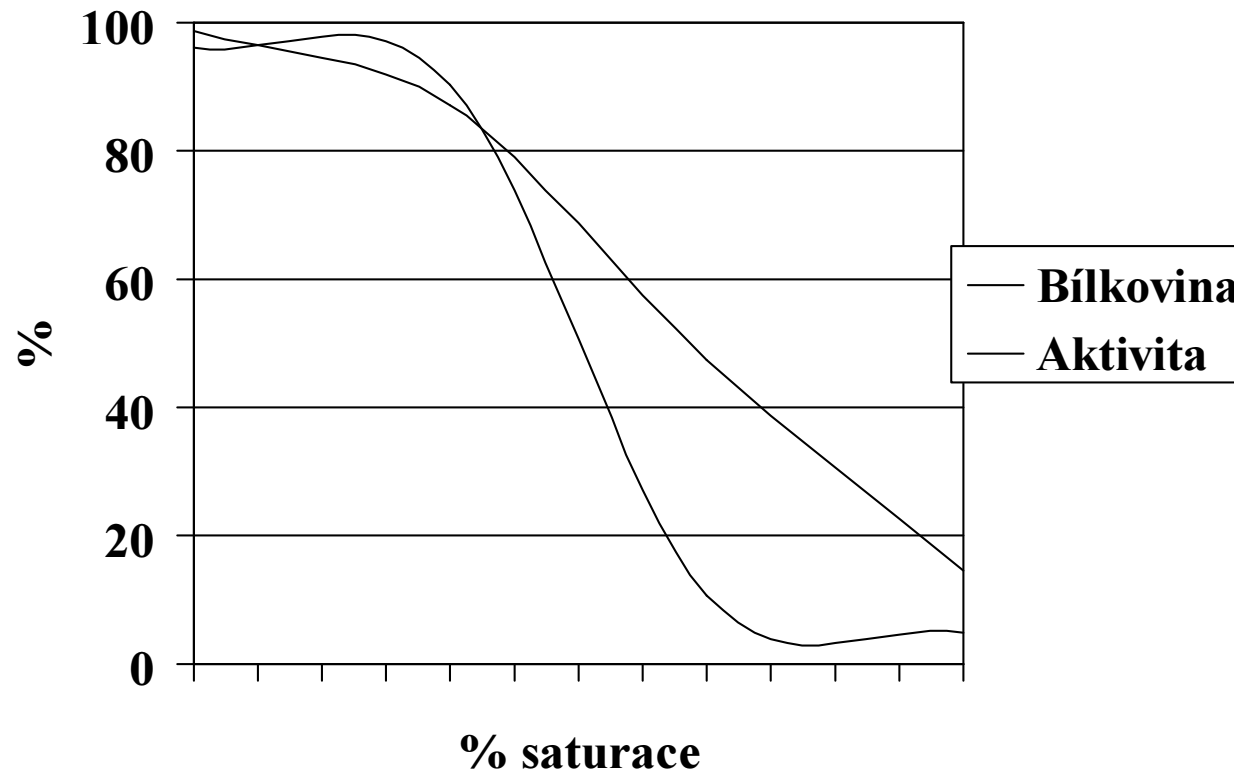
Kationty  $\longrightarrow$

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$



- 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

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

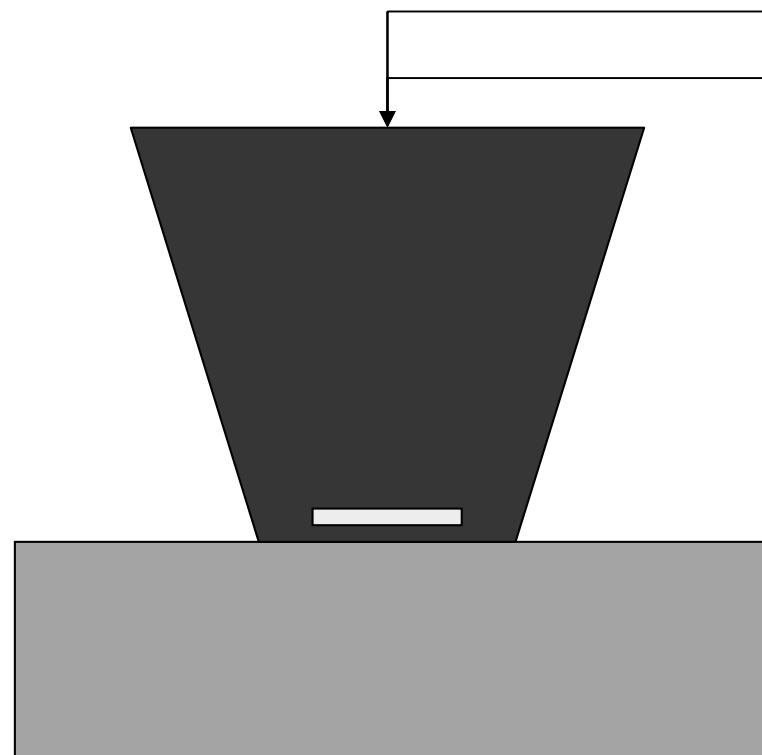
# Provedení

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

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

úprava pH  
 $\text{NH}_4\text{OH}$

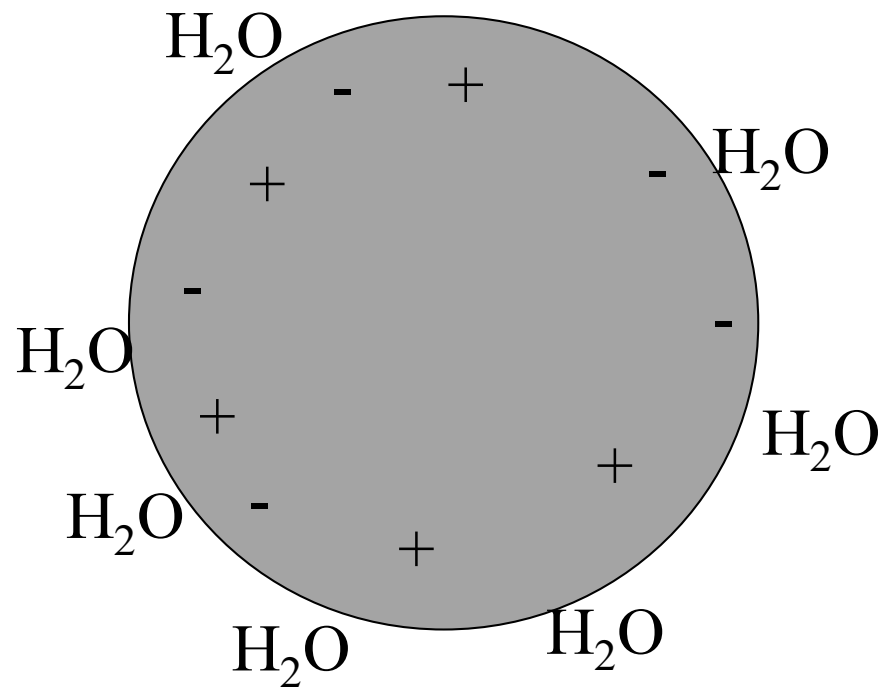
Chlazení  
Míchání 10-30'  
Centrifugace



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



# Srážení org.polymery

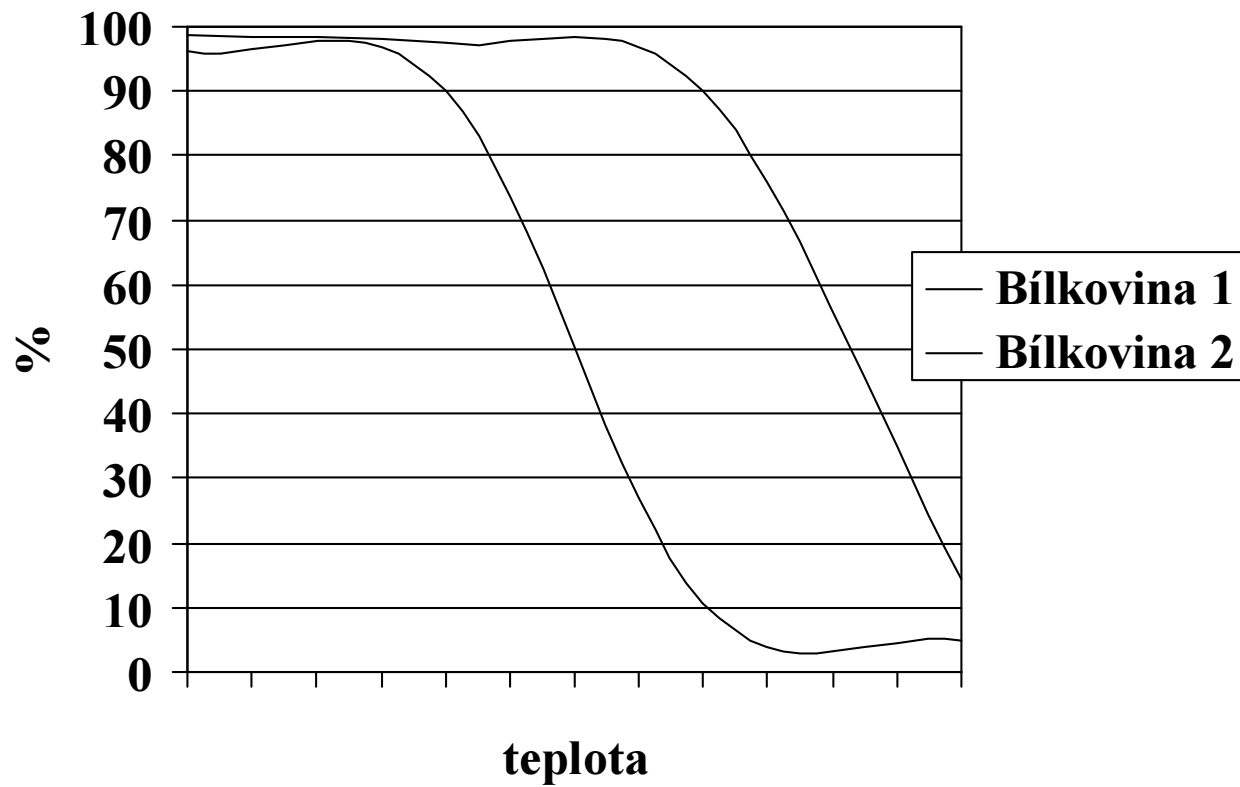
Princip identický s rozpouštědly

- 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 → nutná zpětná úprava pH

# Denaturace org.rozpouštědly

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