

# Srážecí metody



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# 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

# Rozpustnost bílkoviny

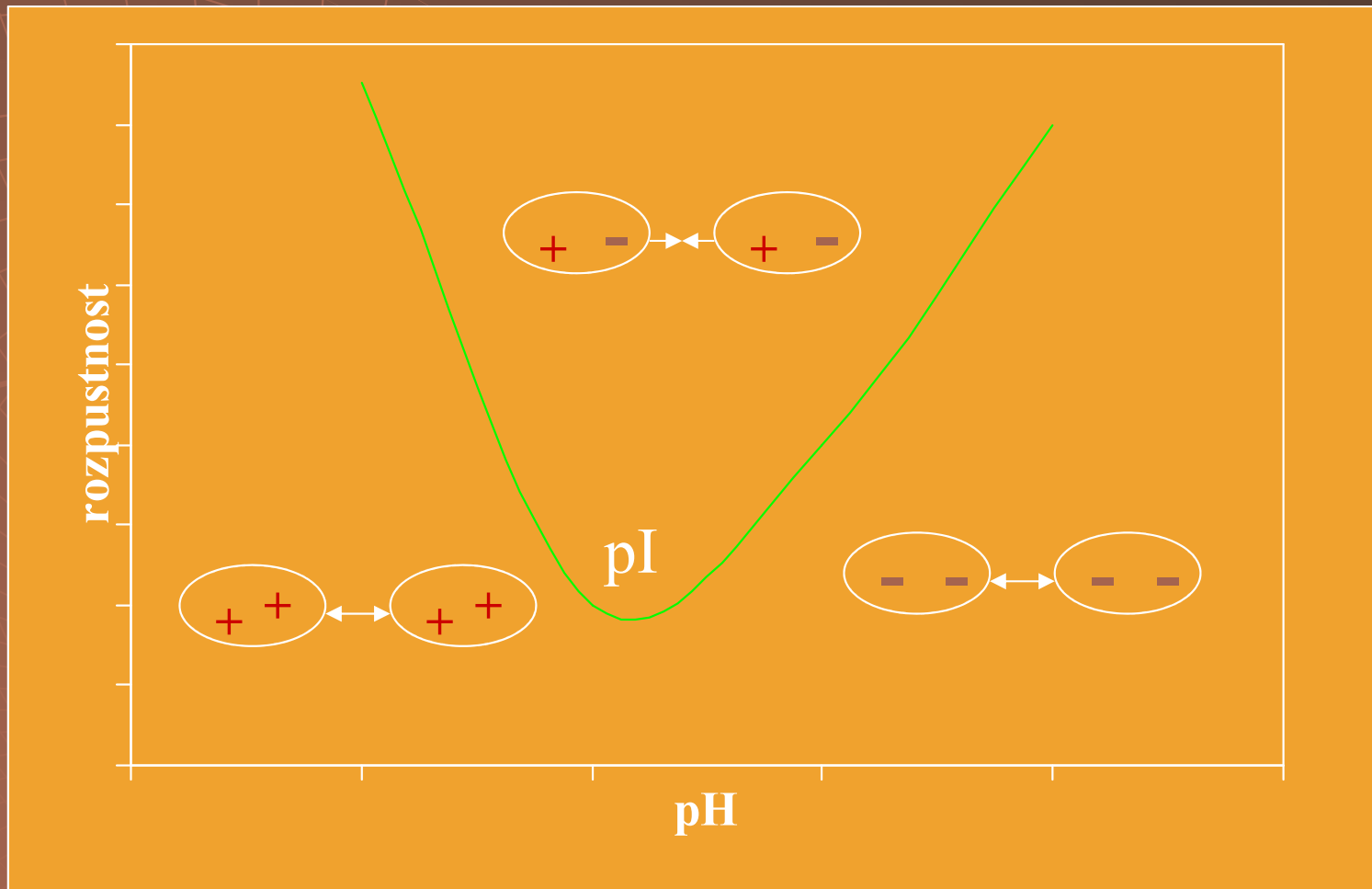
- ◆ Vlastnostmi bílkoviny – distribuce hydrofobních a hydrofilních skupin na povrchu bílkoviny



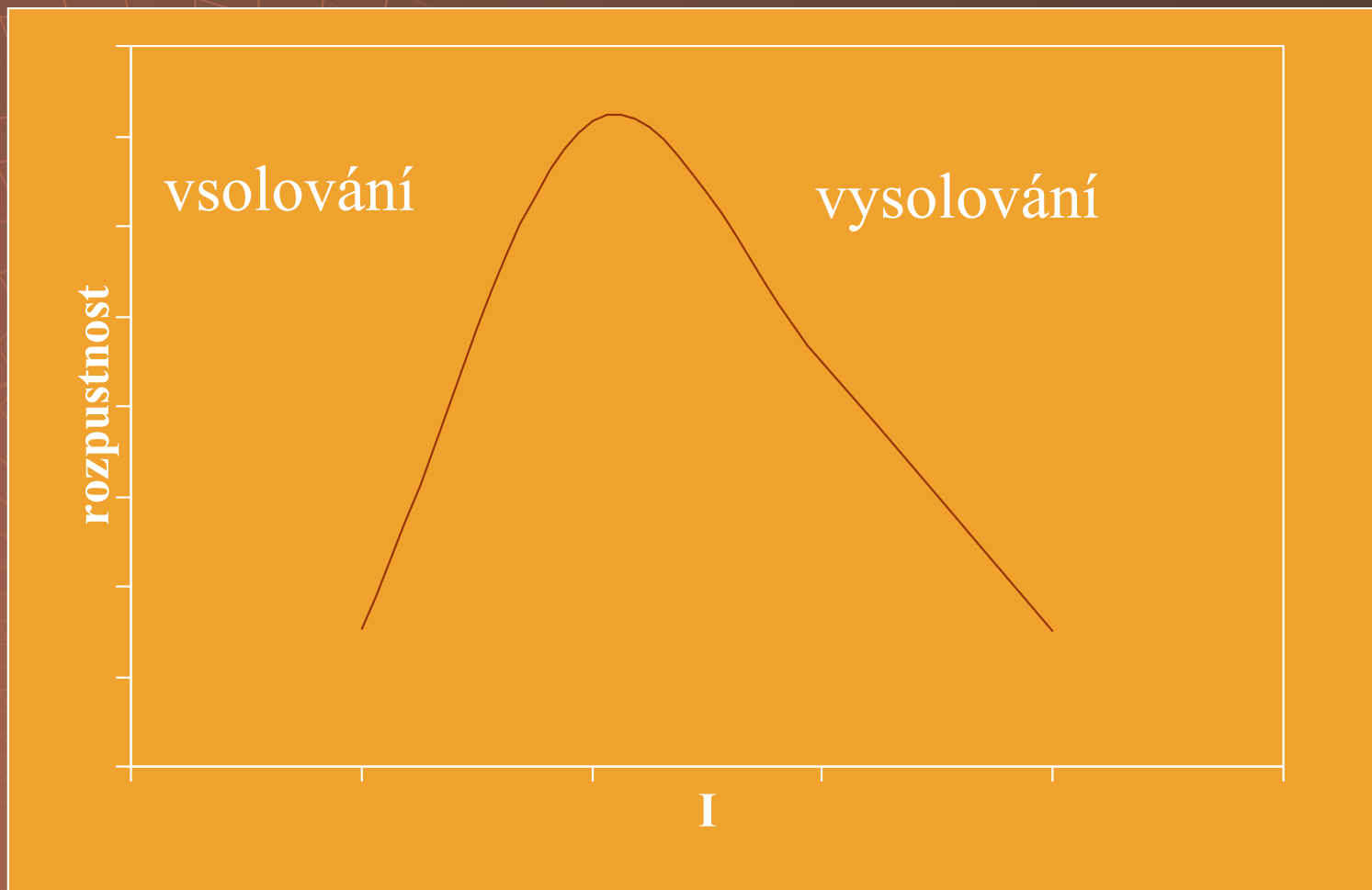
# Rozpustnost bílkoviny

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

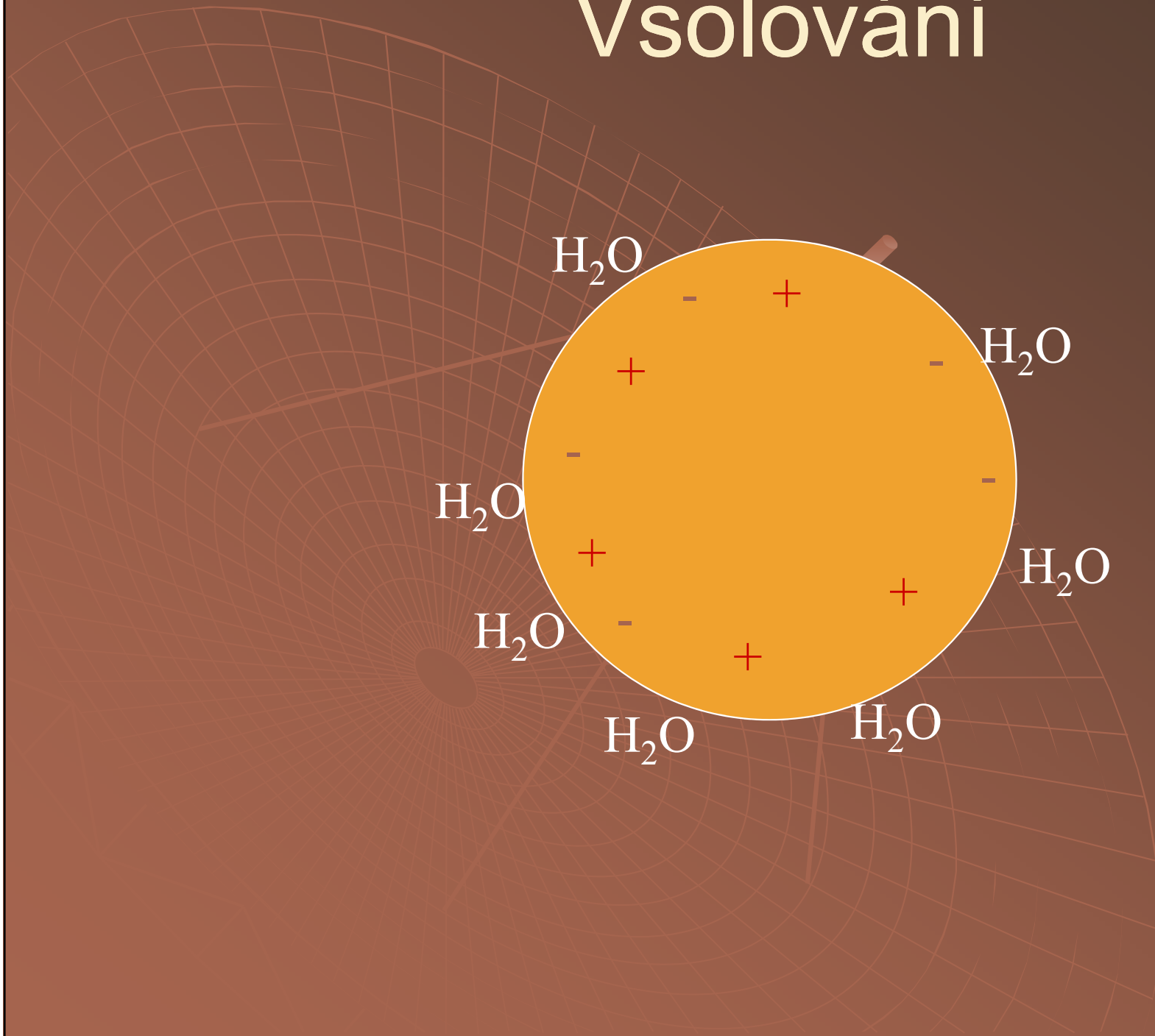
# Izoelektrická precipitace



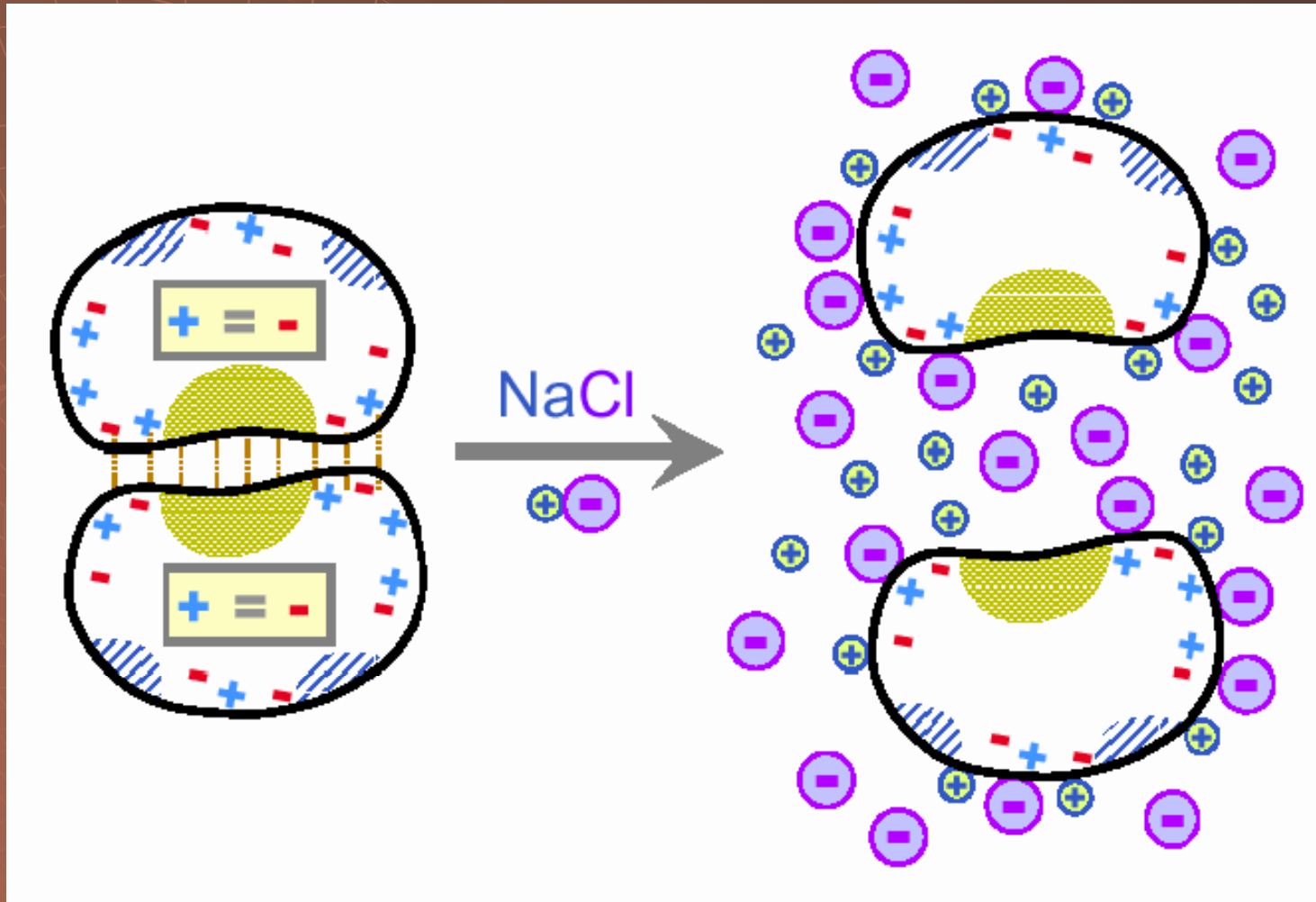
# Srážení neutrálními solemi



# Vsolování

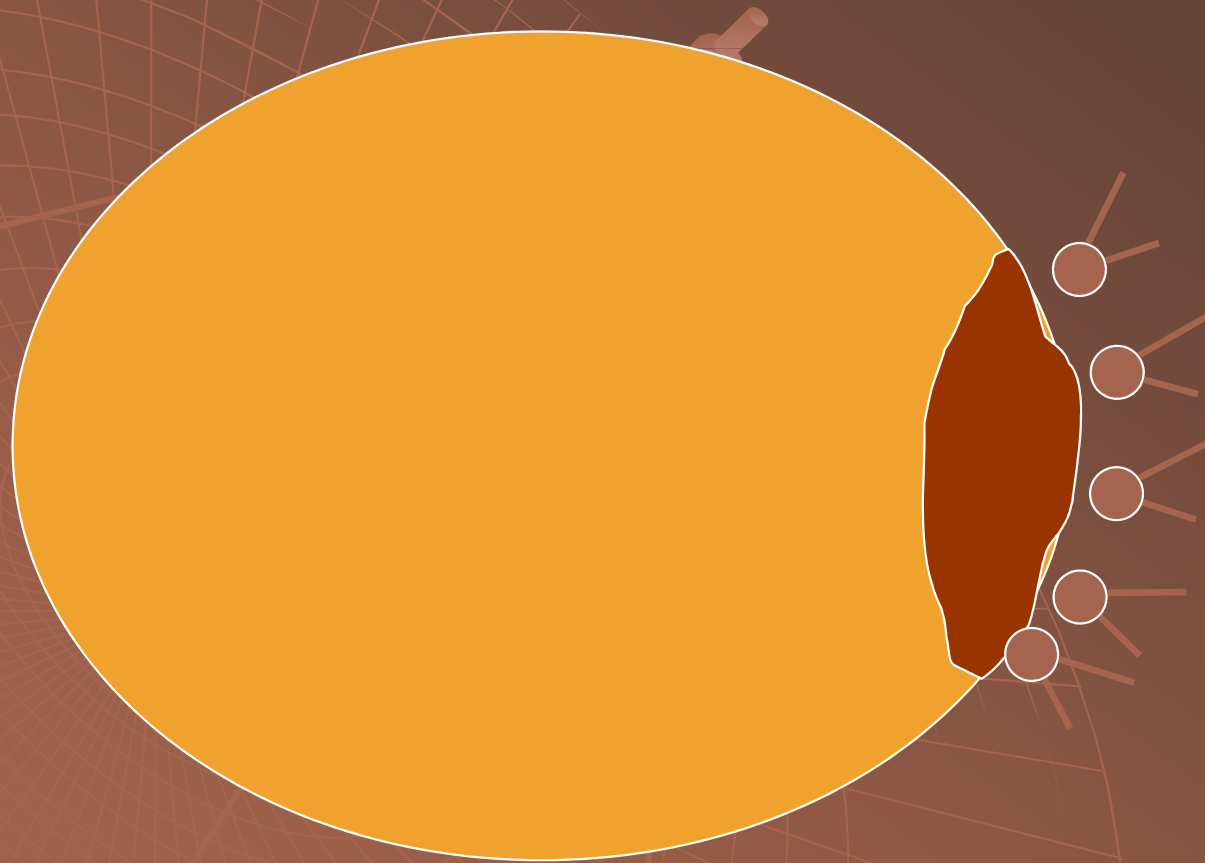


# Vsolování

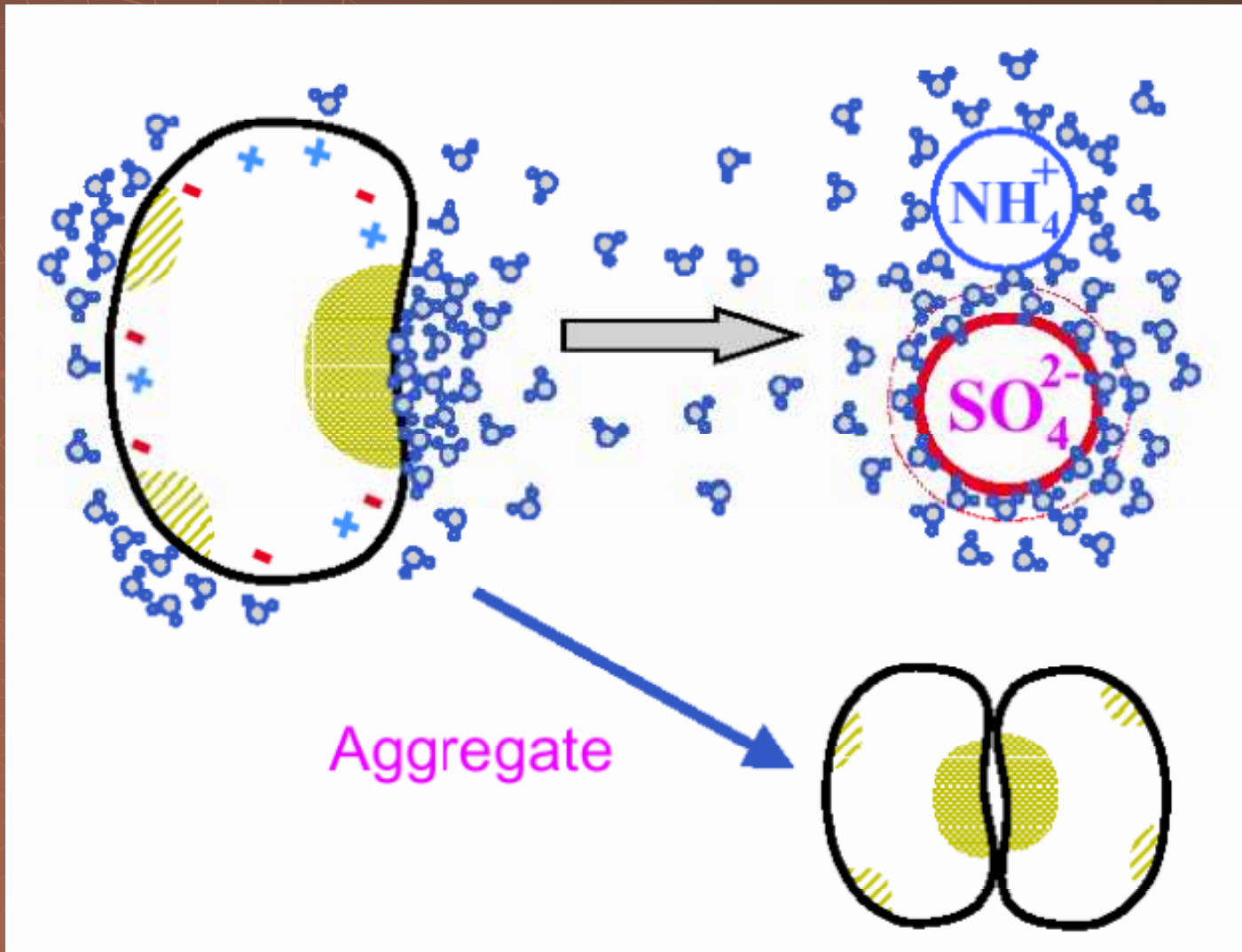




# Vysolování



# Vysolování



# Praktické aspekty

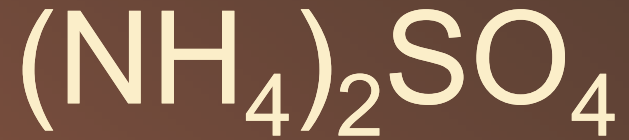
- ◆ Hofmeisterova řada

## Anionty

SCN<sup>-</sup>, J<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>

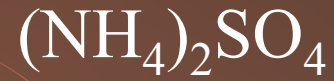
## Kationty

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

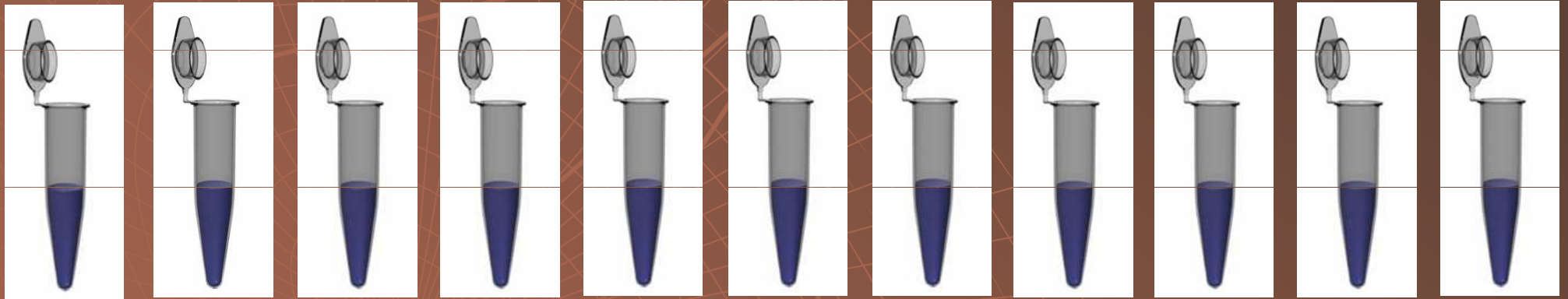


- ◆ Rozpustnost se málo mění s teplotou
- ◆ Saturevaný roztok 4 M - hustota  $1,235\text{g/cm}^3$  umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin (hustota  $1,29\text{g/cm}^3$ )
- ◆ Levný
- ◆ Stabilizuje bílkoviny
- ◆ Relativně čistý

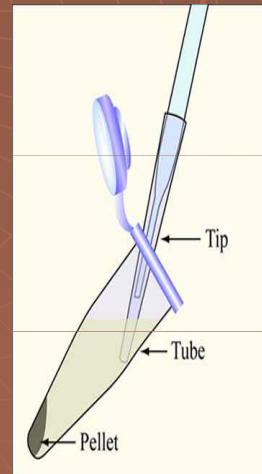
# Srážecí křivka



0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 %

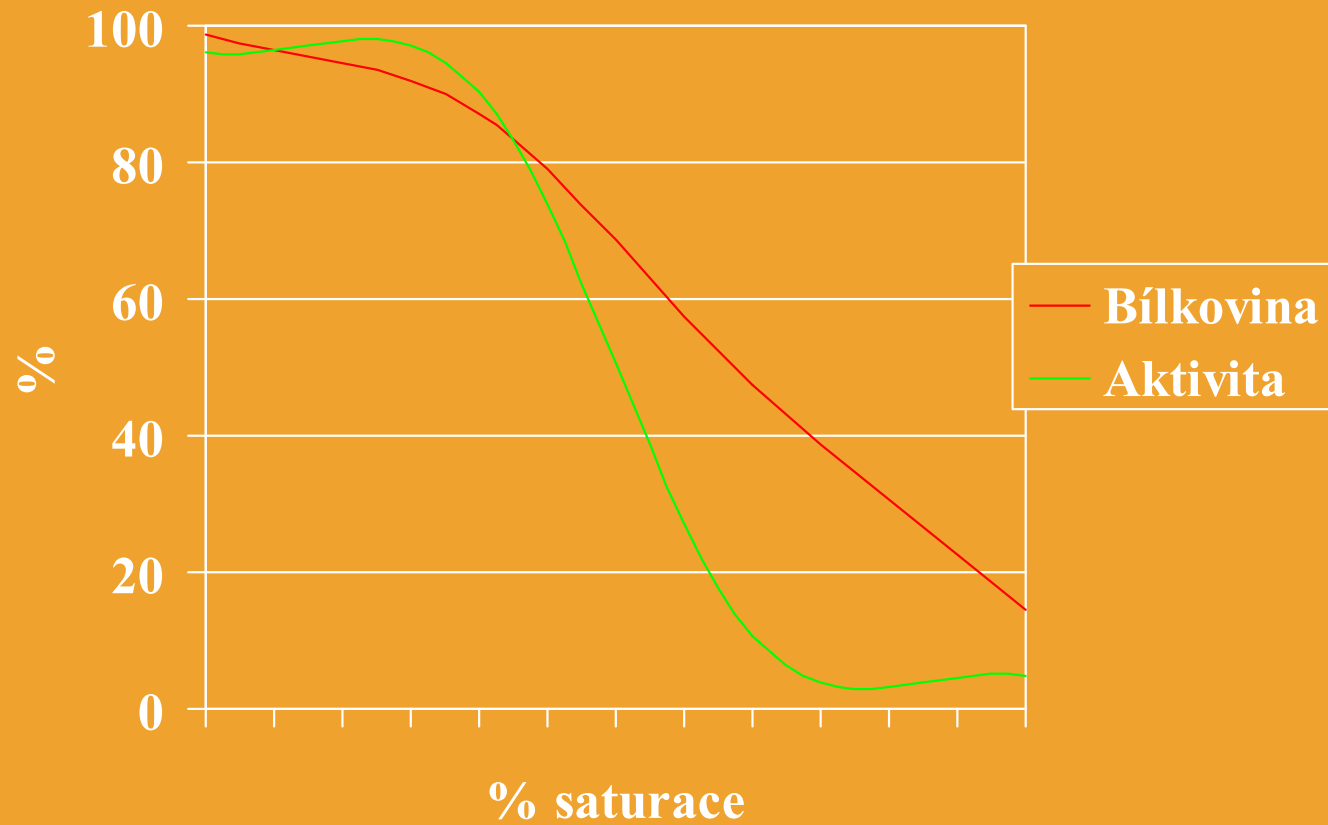


Koncentrace bílkoviny ←

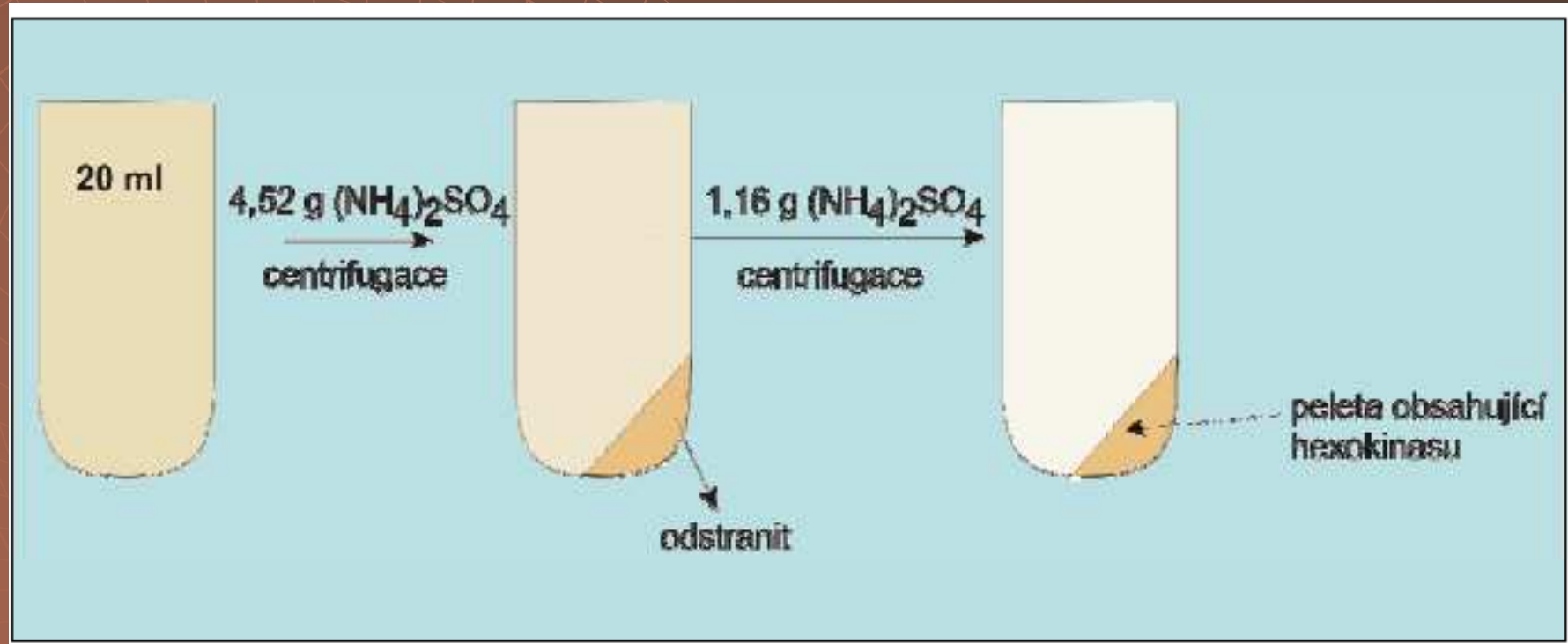


→ Aktivita bílkoviny

# Srážení - dvojstupňově



# Srážení - dvojstupňově







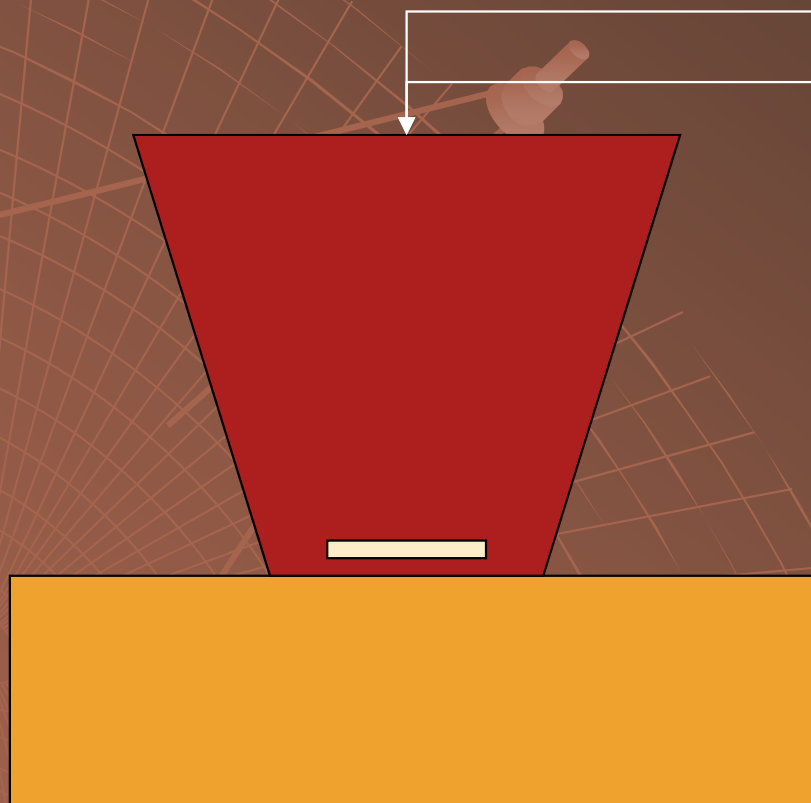
# Přidané množství

- ◆ Tabulky
- ◆ Vzorce

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

# Provedení

Chlazení  
Míchání 10-30'  
Centrifugace



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

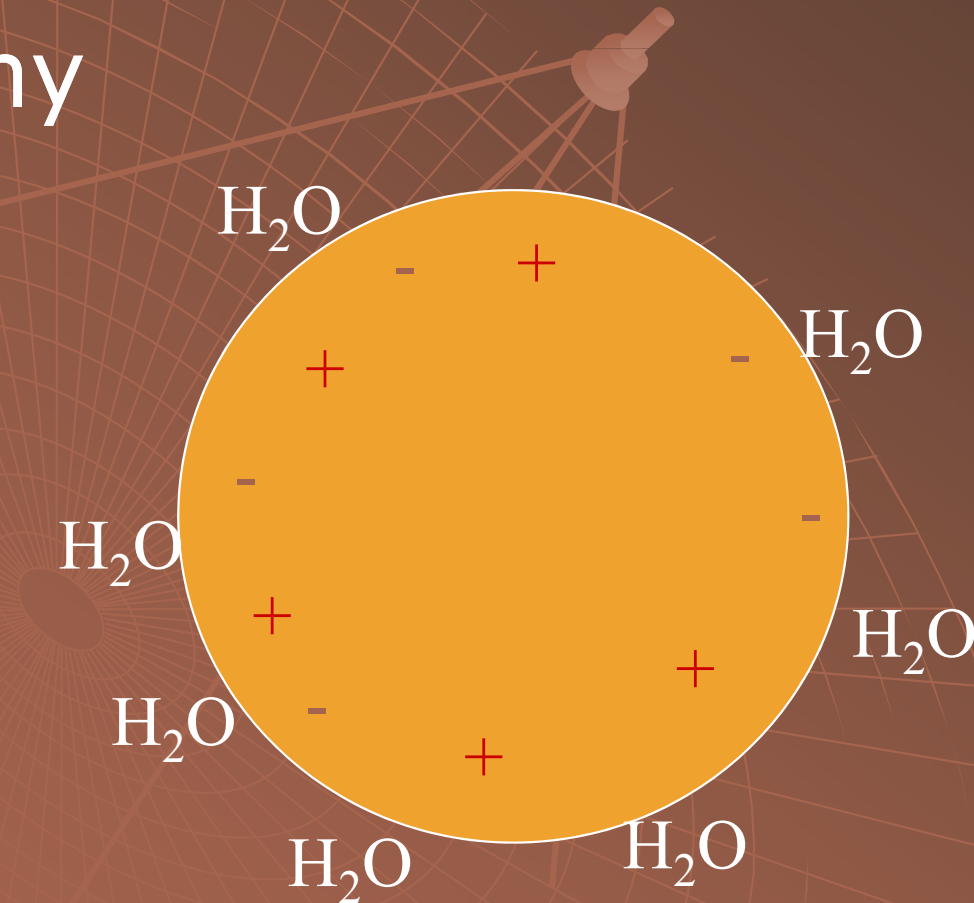
saturovaný roztok  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

úprava pH  
 $\text{NH}_4\text{OH}$

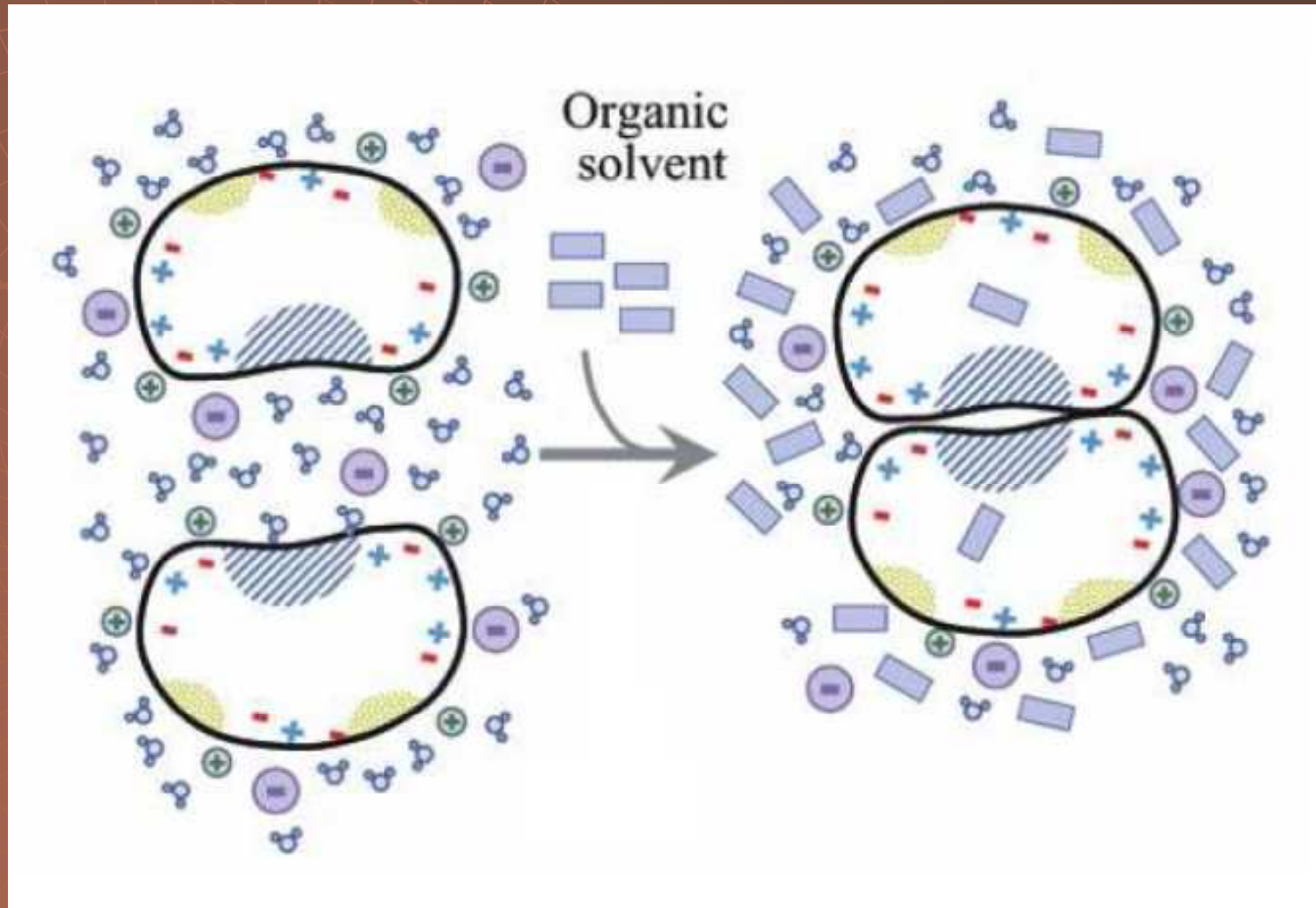
El. míchačka

# Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- ◆ Rozpouštědla ruší solvatační obal bílkoviny



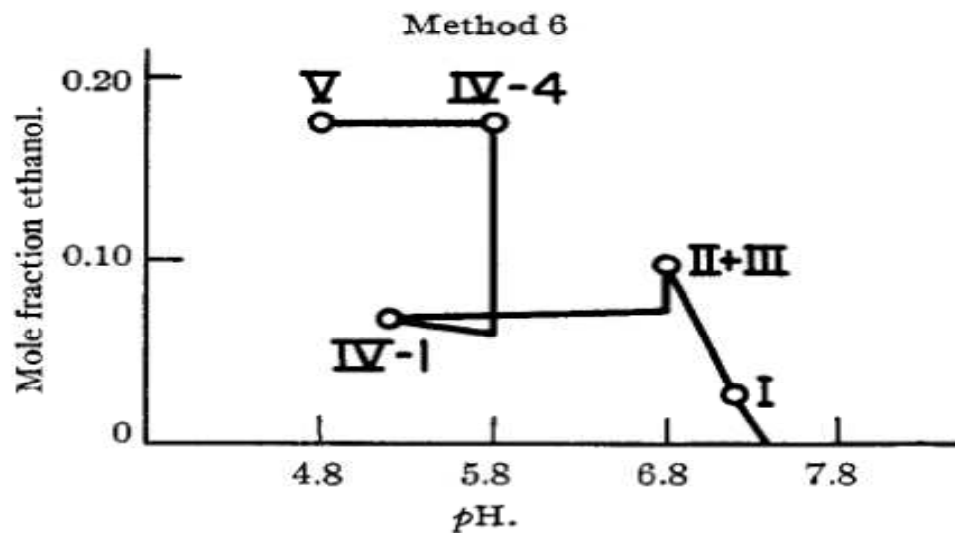
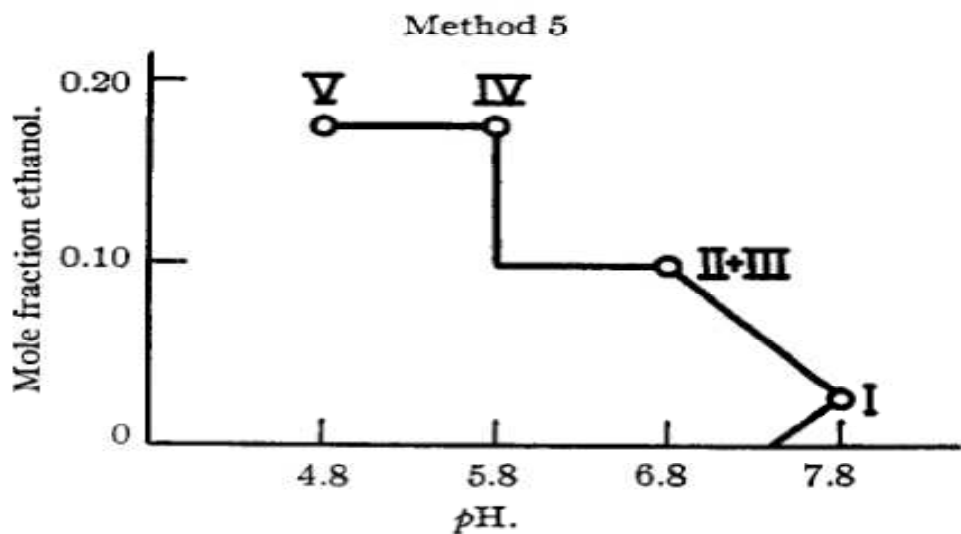
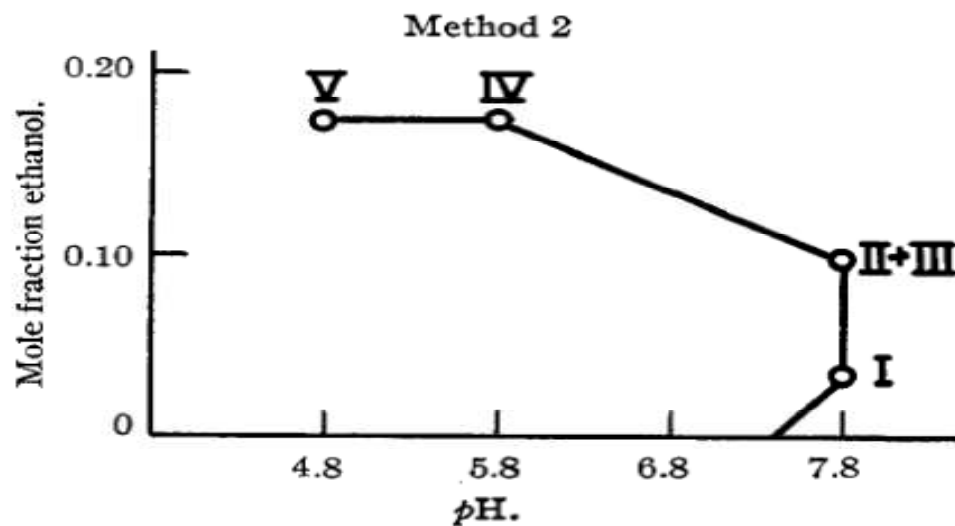
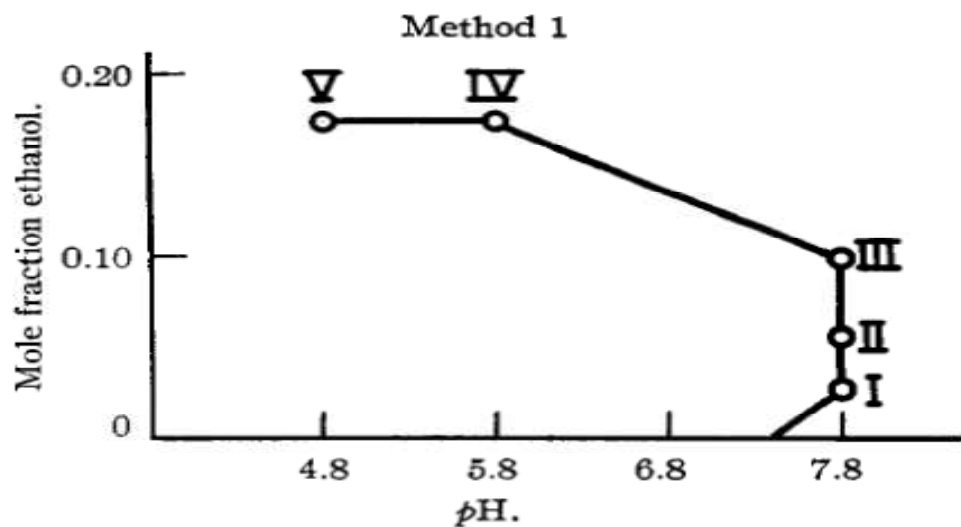
# Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou



[CONTRIBUTION FROM THE DEPARTMENT OF PHYSICAL CHEMISTRY, HARVARD MEDICAL SCHOOL]

**Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids<sup>1a,b,c,d</sup>**

BY E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, JR., D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN AND H. L. TAYLOR<sup>1e</sup>



DISTRIBUTION OF PLASMA PROTEINS INTO FRACTIONS BY VARIOUS METHODS ESTIMATED BY ELECTROPHORETIC ANALYSIS AND A NITROGEN FACTOR OF 6.25 FOR ALL PROTEINS

Fraction	Method	Albumin	$\alpha$ -Globulin	Cholesterol	$\beta$ -Globulin	$\gamma$ -Globulin	Fibrinogen <sup>b</sup>
Plasma		33.2	8.4	1.6	7.8	6.6	4.3
I	1	0.3	0	0	0.2	0.7	3.0
I	2	1.0	0.3	...	.4	.2	2.4
I	5	0.2	.2	0.02	.8	.5	2.6
I	6	0.3	.3	.01	.6	.3	2.3
II <sup>a</sup>	1	1.5	0	.2	1.3	3.7	0.3
III	1	1.5	.1	.3	2.6	2.6	0.2
II + III	2	0.6	.9	...	5.9	4.7	1.4
II + III	5	.7	1.8	1.1	6.2	6.0	1.6
II + III	6	.6	0.9	1.3	6.7	5.7	1.6
IV	1	5.6	4.2	0.7	3.0	0.4	0.2
IV	2	4.9	4.9	...	3.7	.6	0
IV	5	1.0	5.4	0.4	3.1	.2	0
IV-1	6	...	3.9	.4	0.4	.04	0
IV-4	6	0.9	2.7	.04	2.2	0	0
V	1	26.0	0.3	0	0.4	0	0
V	2	27.0	.6	...	0.3	0	0
V	5	29.0	.6	<.01	0	0	0
V	6	28.4	1.2	<.01	0.3	0	0
VI	1	2.2	0.1	0.02	0	0	0
VI	2	0.5	.1	...	0	0	0
VI	5	.3	.3	...	0	0	0
VI	6	.7	.2	...	0	0	0
Totals	1	37.1	4.7	1.2	7.5	7.4	3.7
	2	33.5	6.7	...	10.3	5.5	3.8
	5	31.2	8.3	1.5	10.1	6.7	4.2
	6	30.9	9.4	1.7	10.2	6.0	3.9

# 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

- ◆ 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

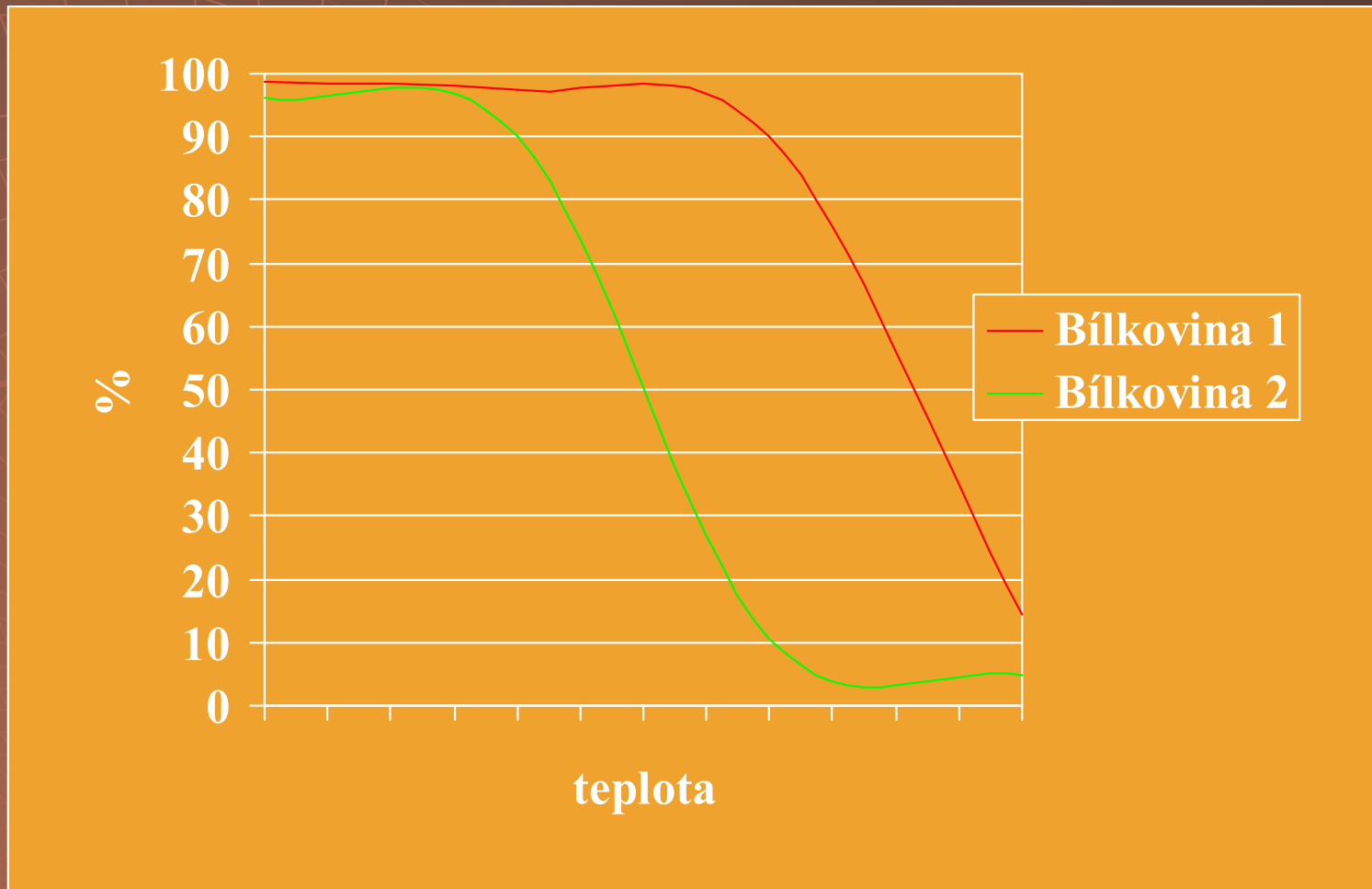
Princip identický s rozpouštědly

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

# Srážení selektivní denaturací

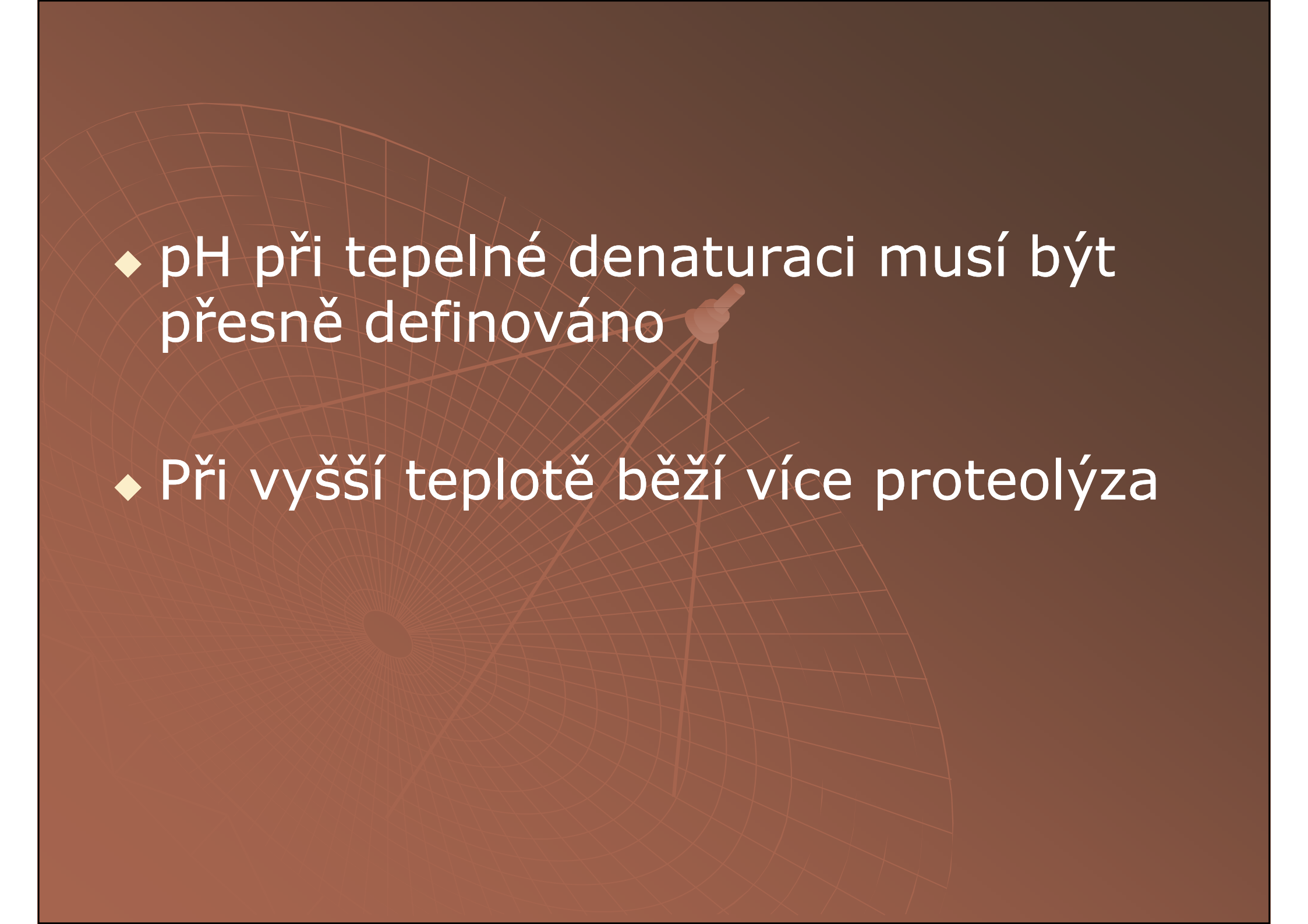
- ◆ Při této metodě denaturujeme balastní bílkoviny, cílová bílkovina musí zůstat z 85 - 90 % v nativním stavu.
- ◆ Denaturační vlivy – T, pH, org. rozpouštědla
- ◆ Bílkovina musí nejen denaturovat i precipitovat

# 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

$H_3PO_4$ ,  $H_2SO_4$

pH 11

NaOH

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

# Denaturace org.rozpouštědly

- ◆ 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