

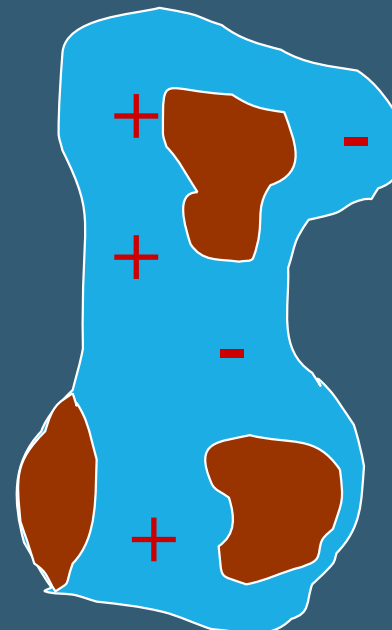
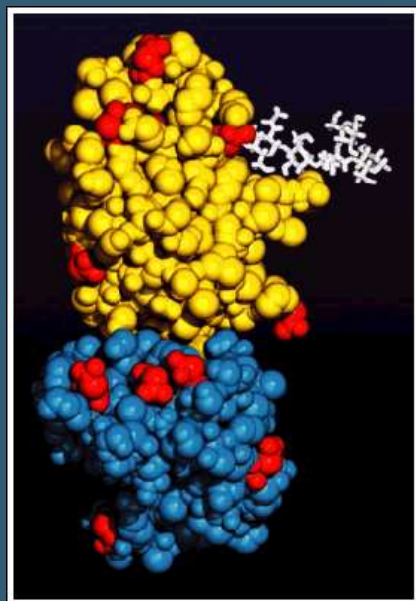
SRÁŽECÍ METODY

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

ROZPUSTNOST BÍLKOVINY

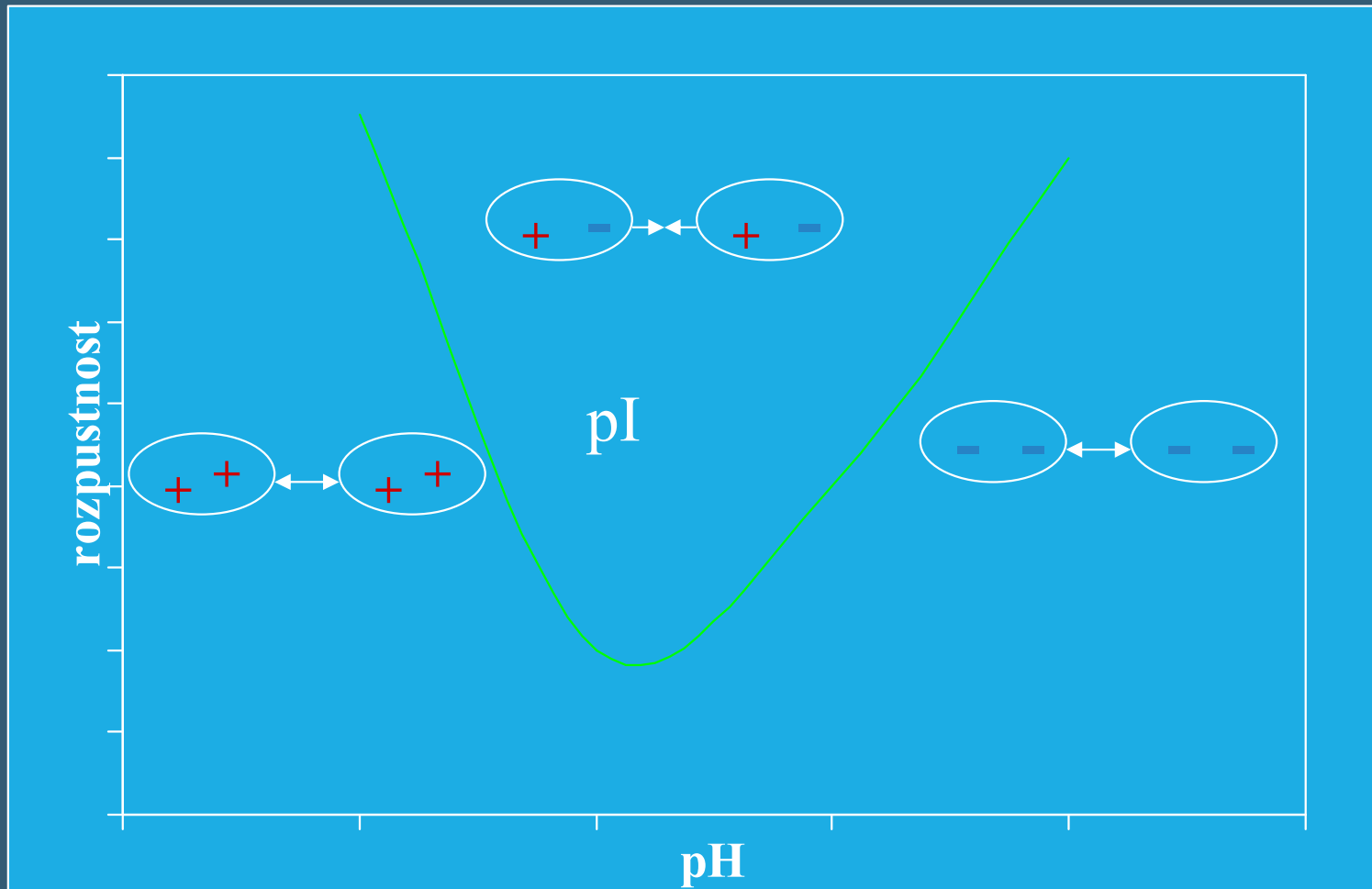
- Vlastnostmi bílkoviny – distribuce hydrofobních a hydrofilních skupin na povrchu bílkoviny



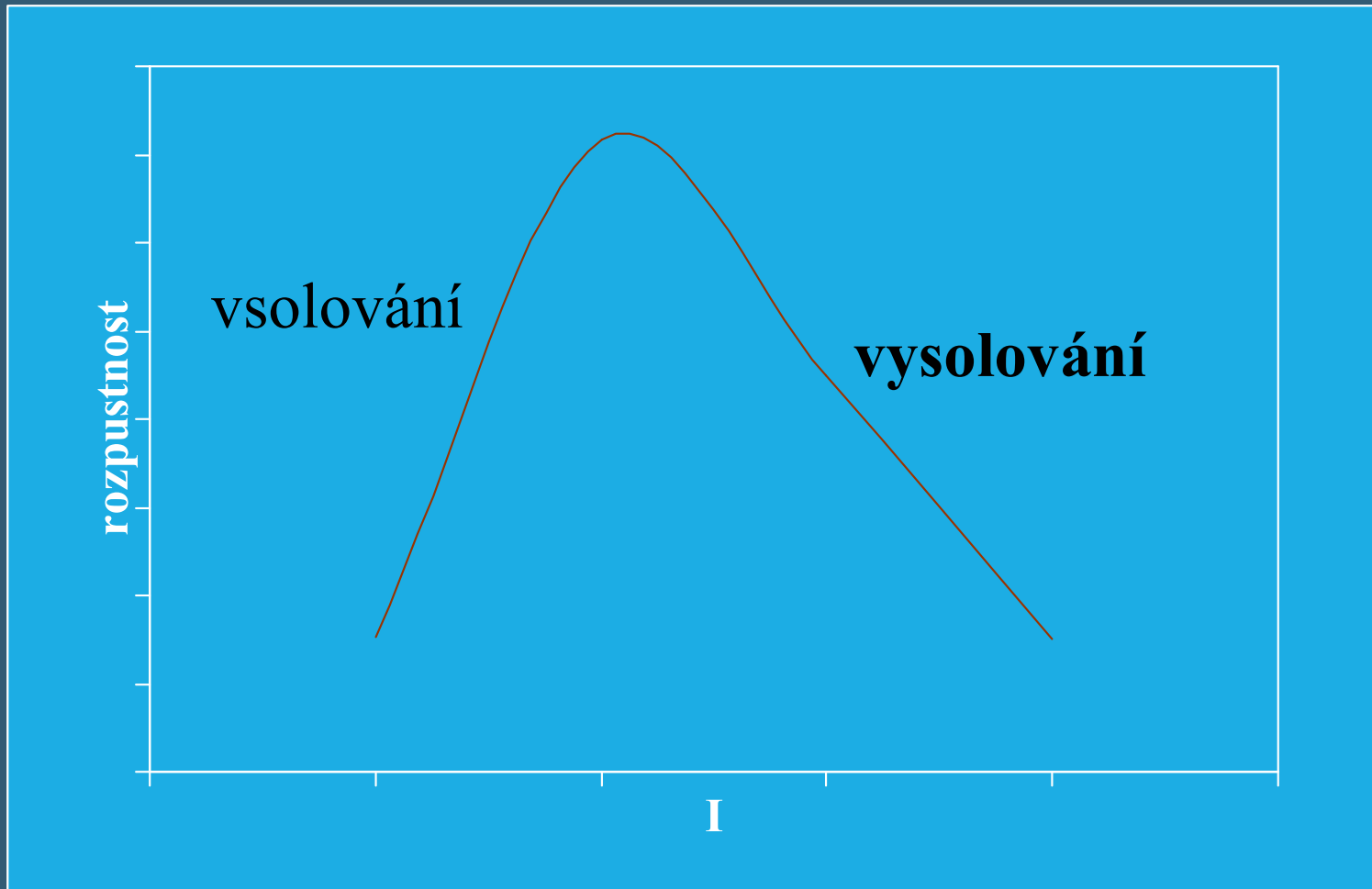
ROZPUSTNOST BÍLKOVINY

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

IZOELEKTRICKÁ PRECIPITACE

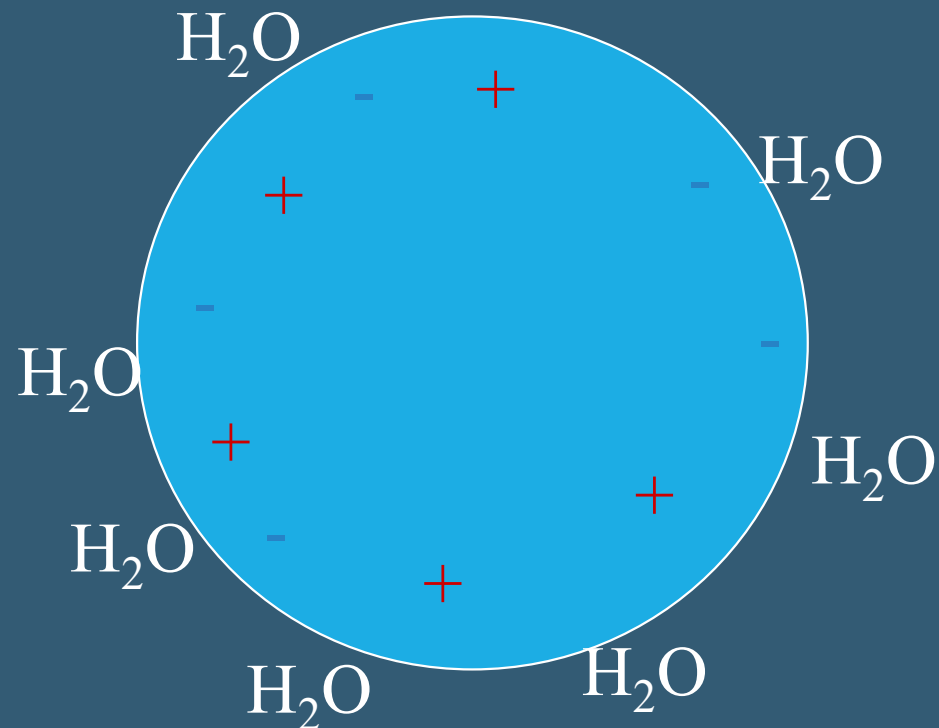


SRÁŽENÍ NEUTRÁLNÍMI SOLEMI

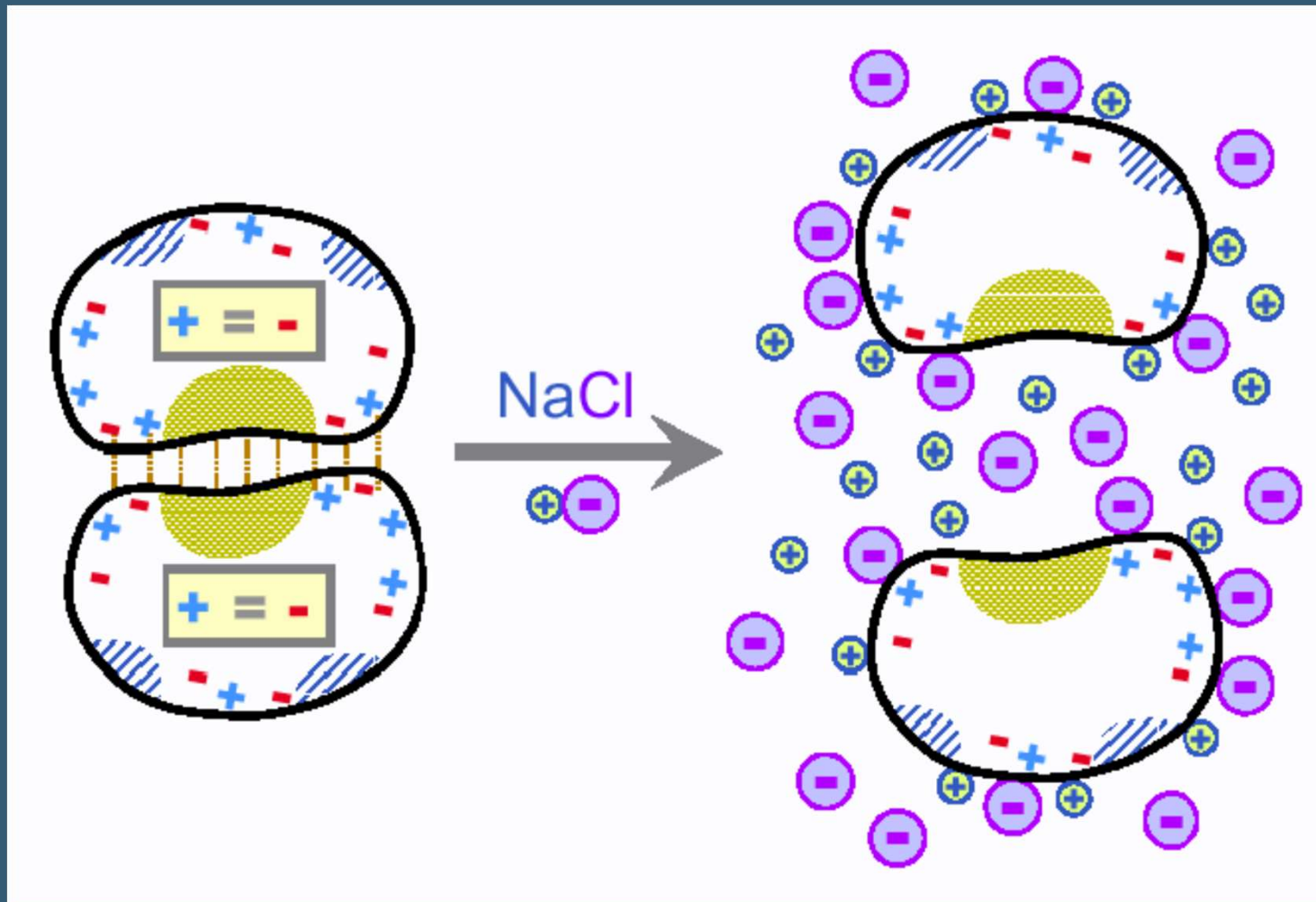


VSOLOVÁNÍ

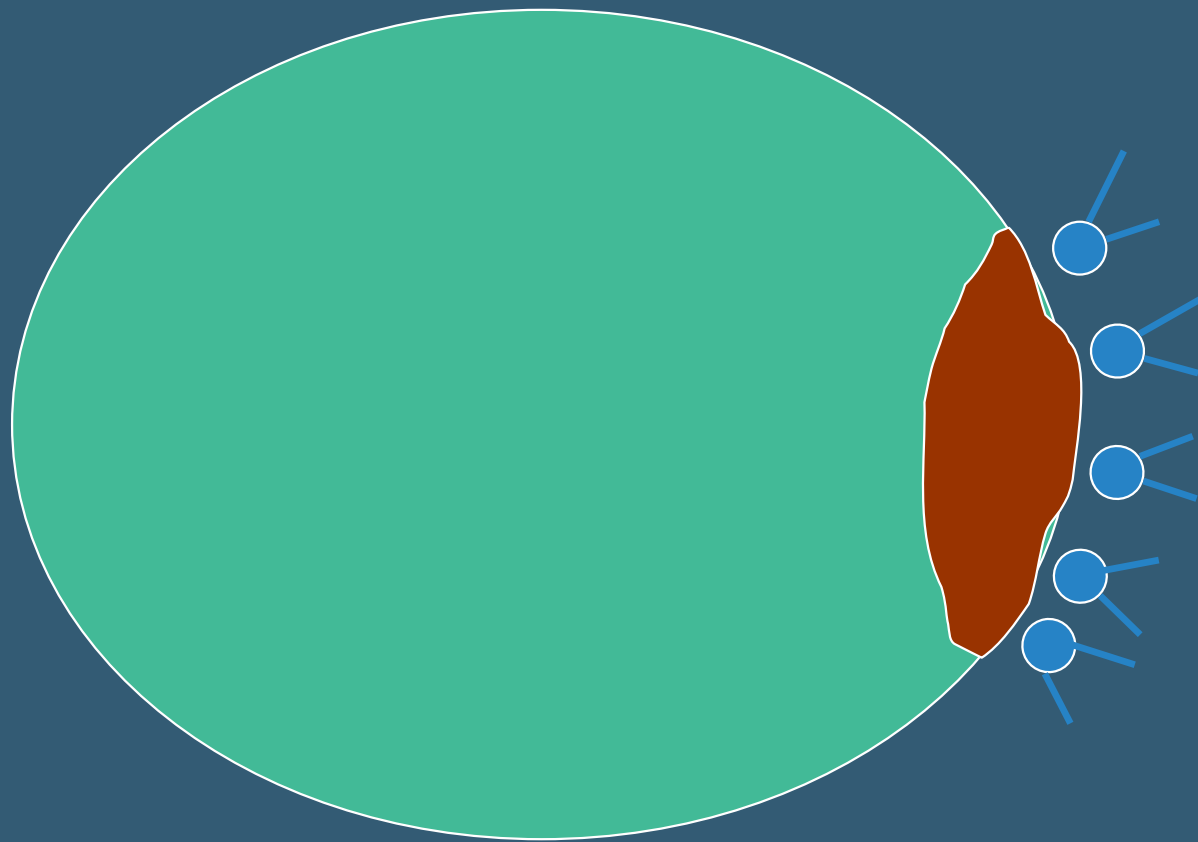
vzrůst rozpustnosti proteinů v přítomnosti
malých koncentrací neutrálních solí;



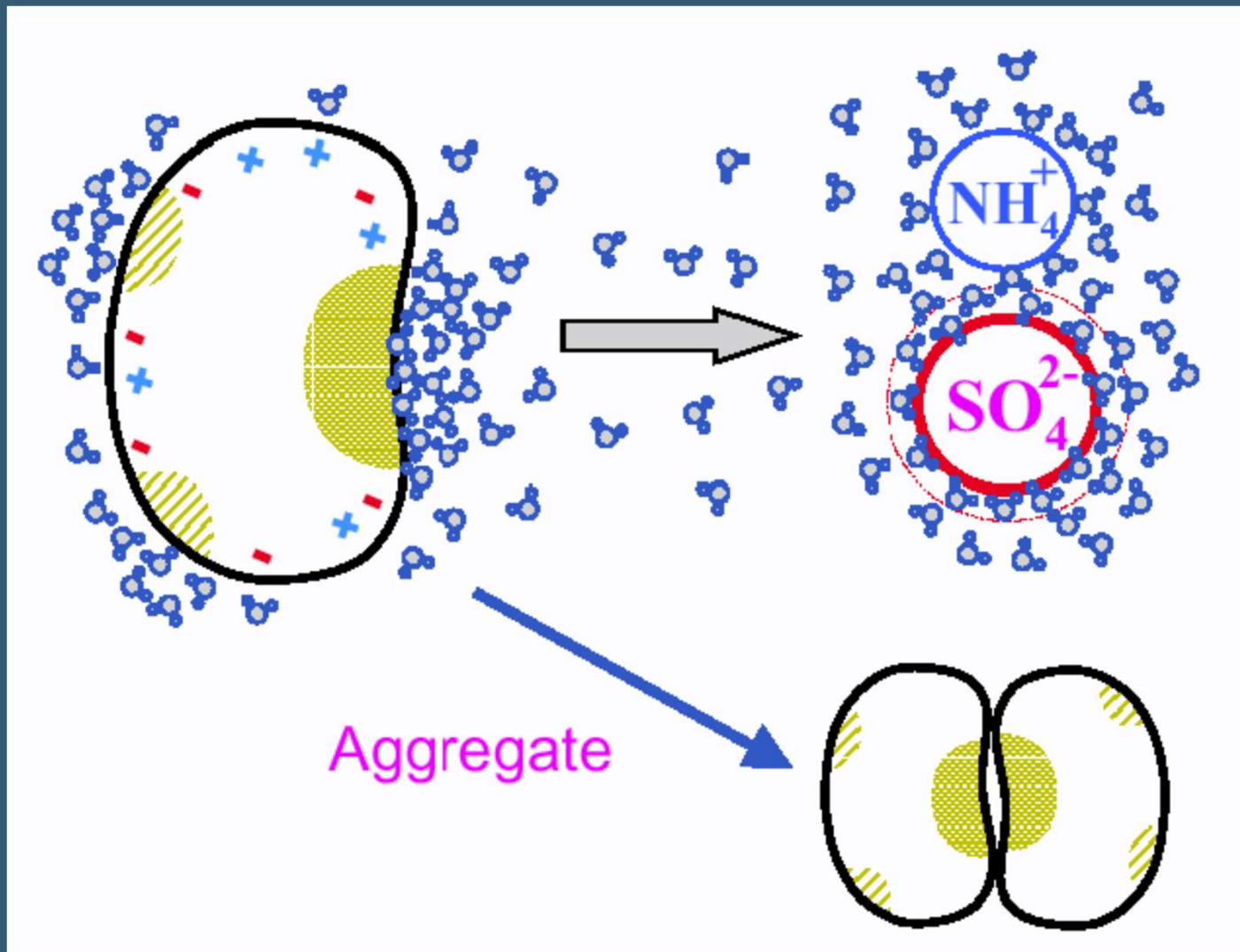
VSOLOVÁNÍ



VYSOLOVÁNÍ



VYSOLOVÁNÍ



pH, iontová síla, teplota, typ soli, koncentrace proteinů

PRAKTICKÉ ASPEKTY

Hofmeisterova řada

Anionty

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



Kationty

Na^+ , K^+ , NH_4^+

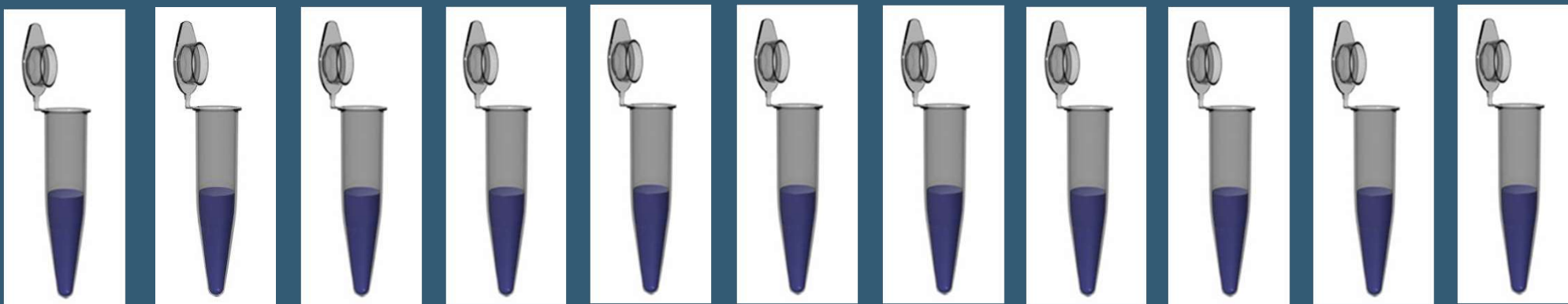




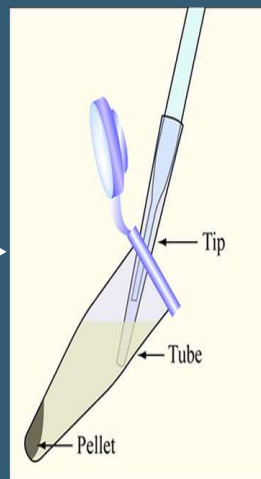
- Rozpustnost se málo mění s teplotou
- Saturevaný roztok 4 M - hustota $1,235 \text{ g/cm}^3$ umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin (hustota $1,29 \text{ g/cm}^3$)
- Levný
- Stabilizuje bílkoviny
- Relativně čistý

SRÁŽECÍ KŘIVKA

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



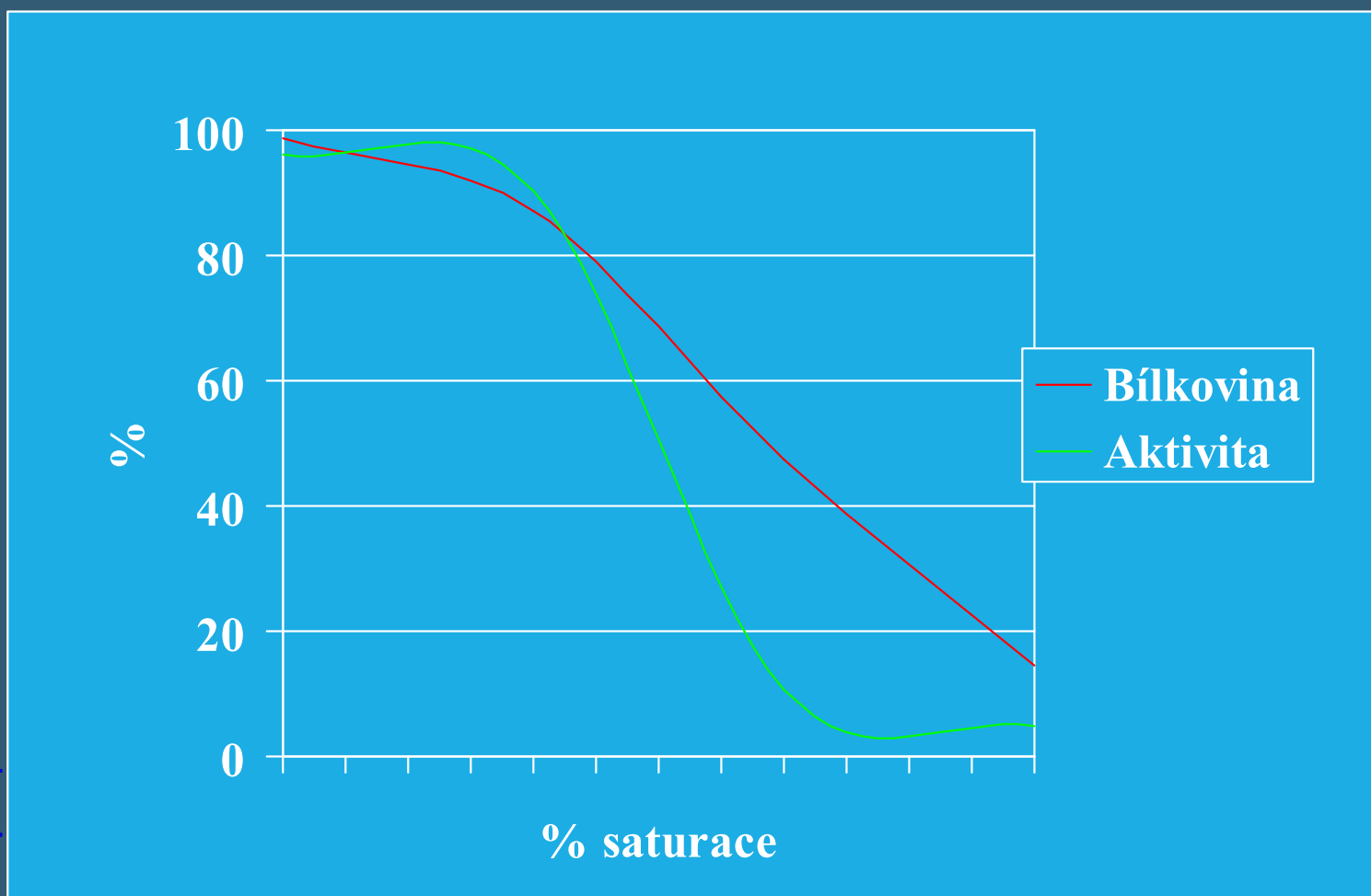
Koncentrace bílkoviny →



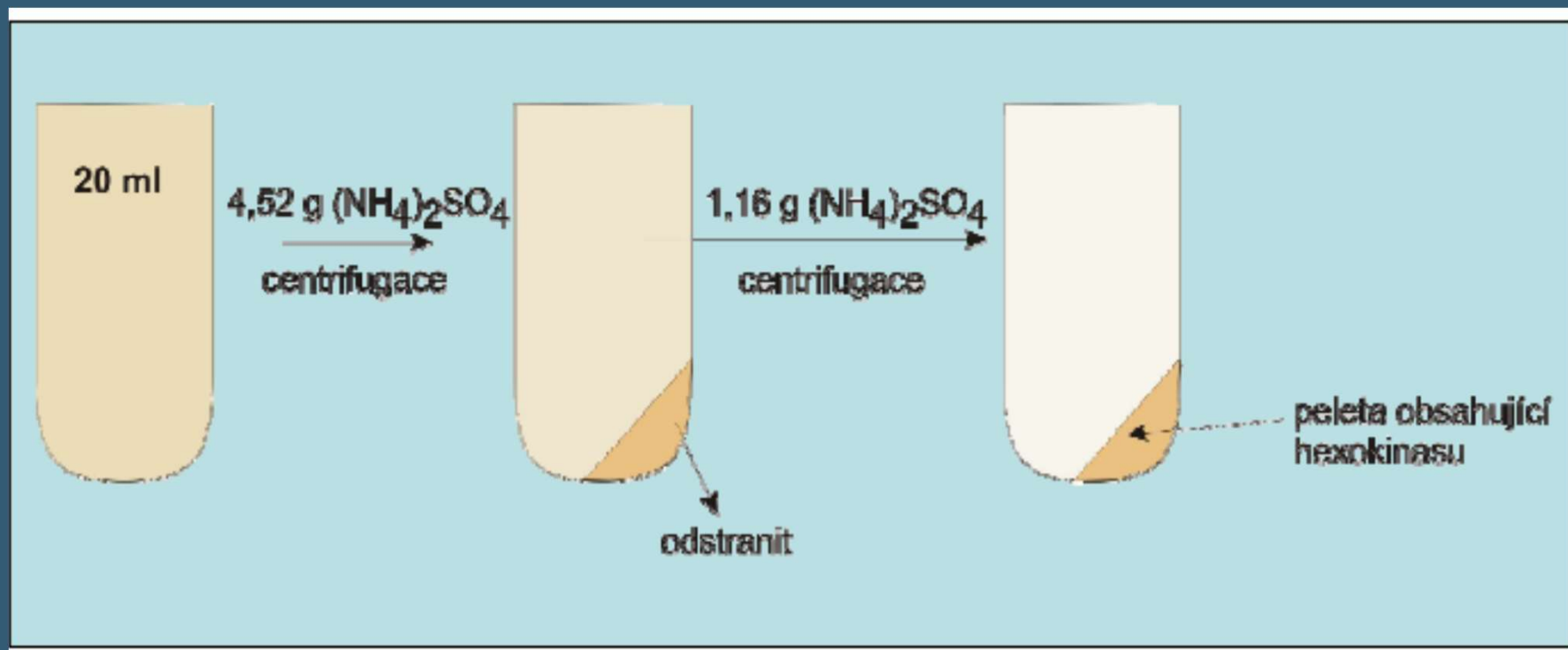
→ Aktivita bílkoviny

MUNI
SCI

SRÁŽENÍ - DVOJSTUPŇOVĚ



SRÁŽENÍ - DVOJSTUPŇOVĚ



PŘIDANÉ MNOŽSTVÍ

• Tabulky

Initial percentage saturation	Target percentage saturation																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20		27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25			27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30				28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35					28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40						29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45							29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50								30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55									30	61	93	127	161	197	235	273	313
60										31	62	95	129	164	201	239	279
65											31	63	97	132	168	205	244
70												32	65	99	134	171	209
75													32	66	101	137	174
80														33	67	103	139
85															34	68	105
90																34	70
95																	35

MUNI
SCI

Množství síranu amonného (g/L) potřebného pro změnu koncentrace v roztoku z původního procenta saturace na požadované nasycení při 0 °C

PŘIDANÉ MNOŽSTVÍ

- Tabulky
- Vzorce

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

PROVEDENÍ

1. Chlazení
Míchání 10-30'

2. Centrifugace

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

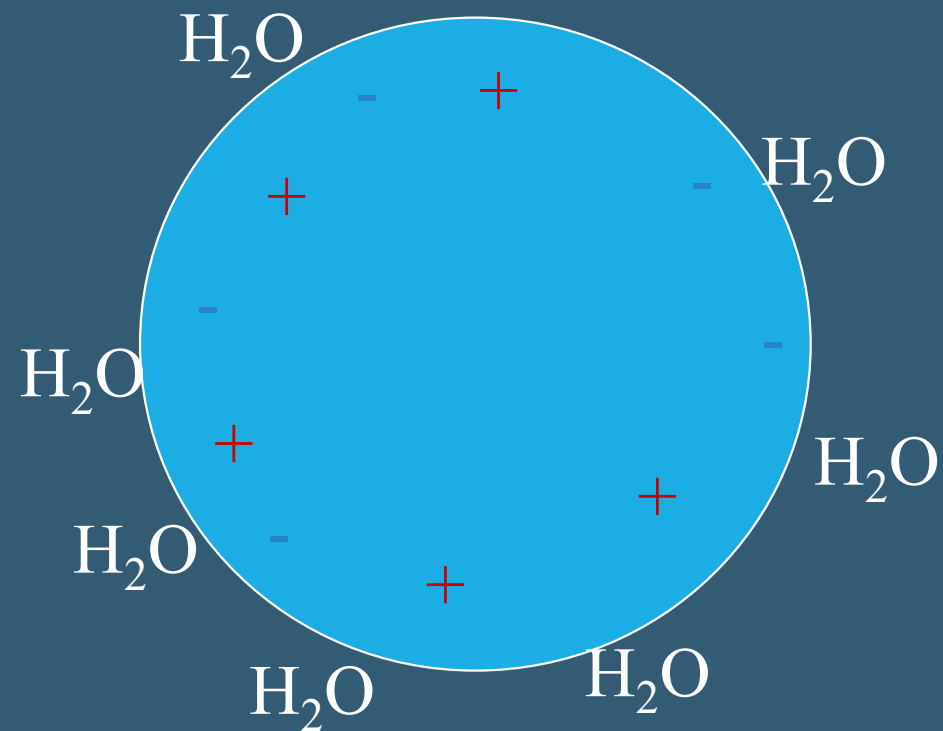
úprava pH
 NH_4OH

el. míchačka

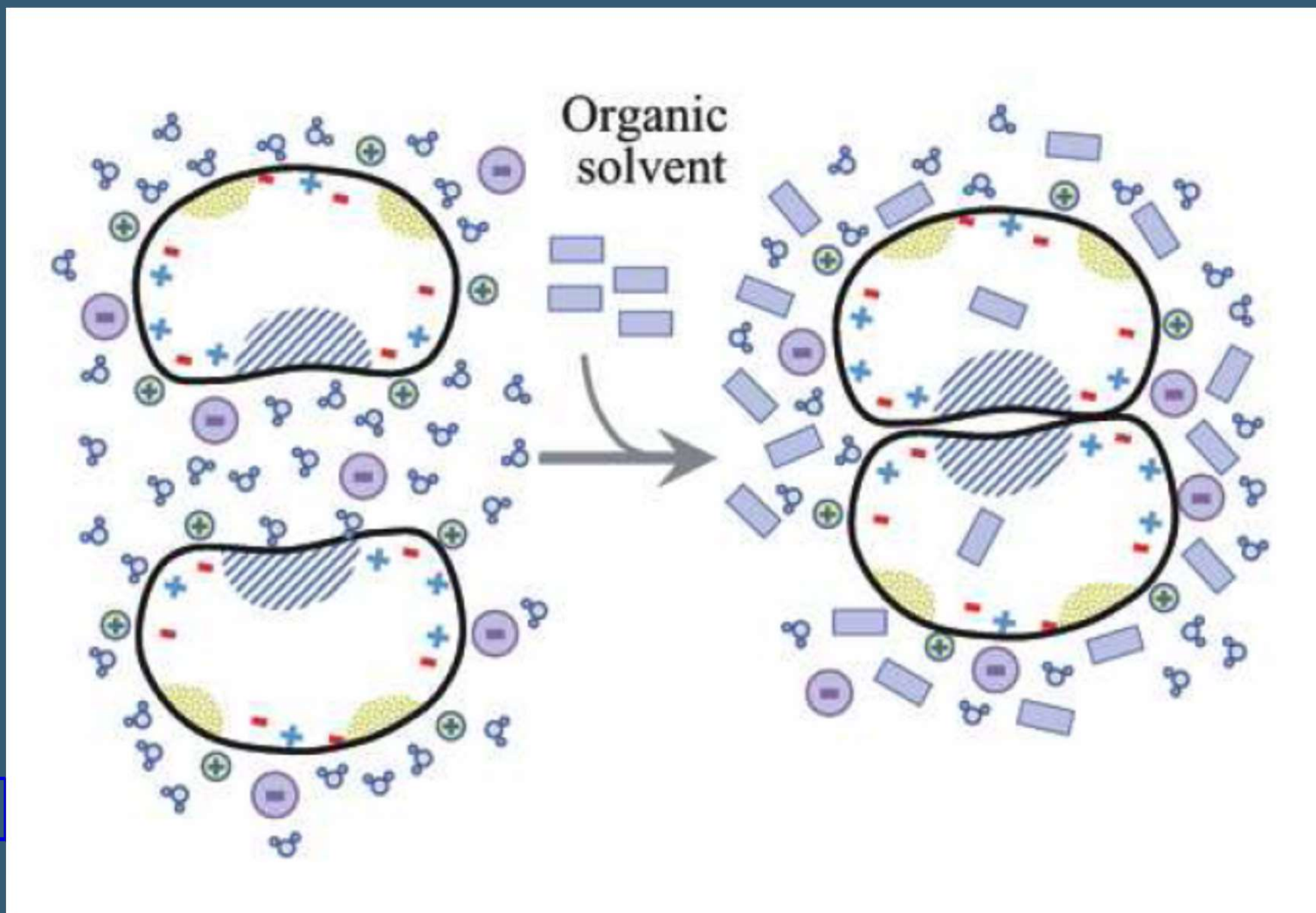


SRÁŽENÍ ORG.ROZPOUŠTĚDLY MÍŠITELNÝMI S VODOU

Rozpouštědla ruší solvatační obal bílkoviny



SRÁŽENÍ ORG.ROZPOUŠTĚDLY MÍSITELNÝMI S VODOU



SRÁŽENÍ ORG.ROZPOUŠTĚDLY MÍSITELNÝMI S VODOU

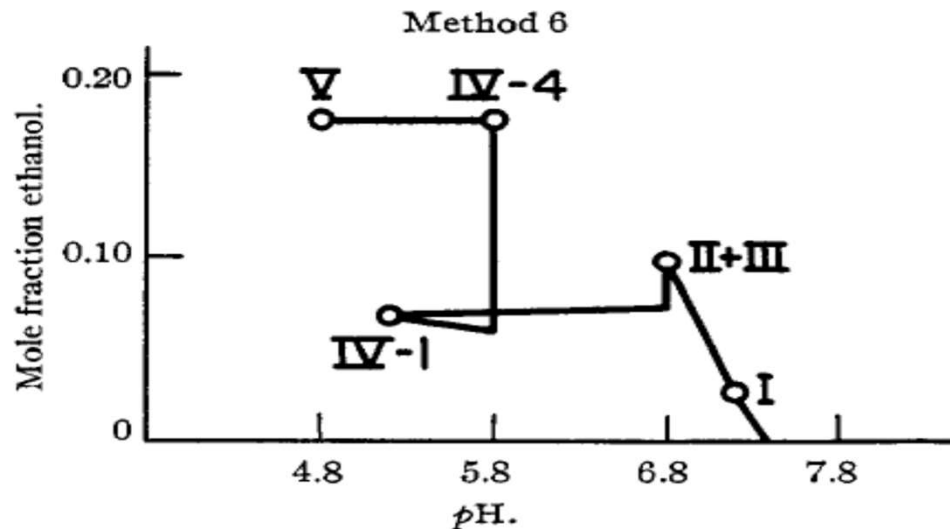
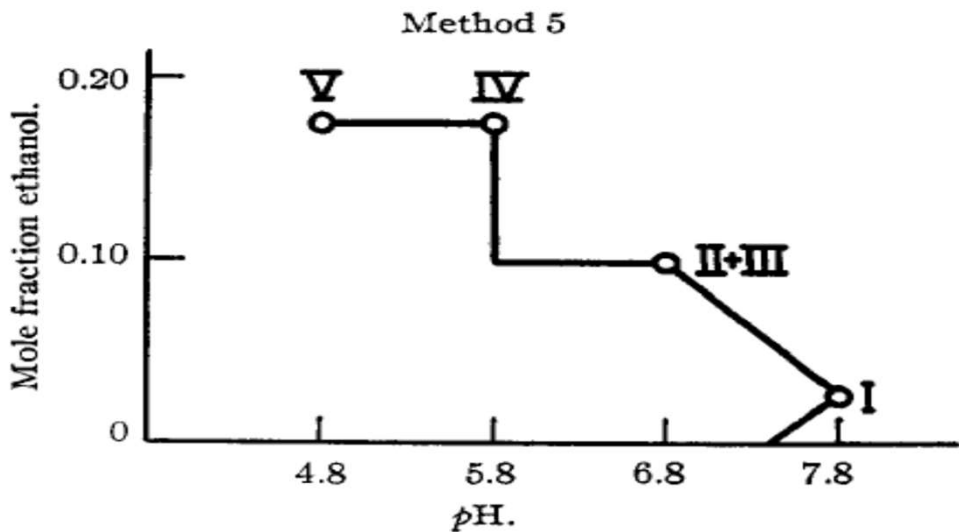
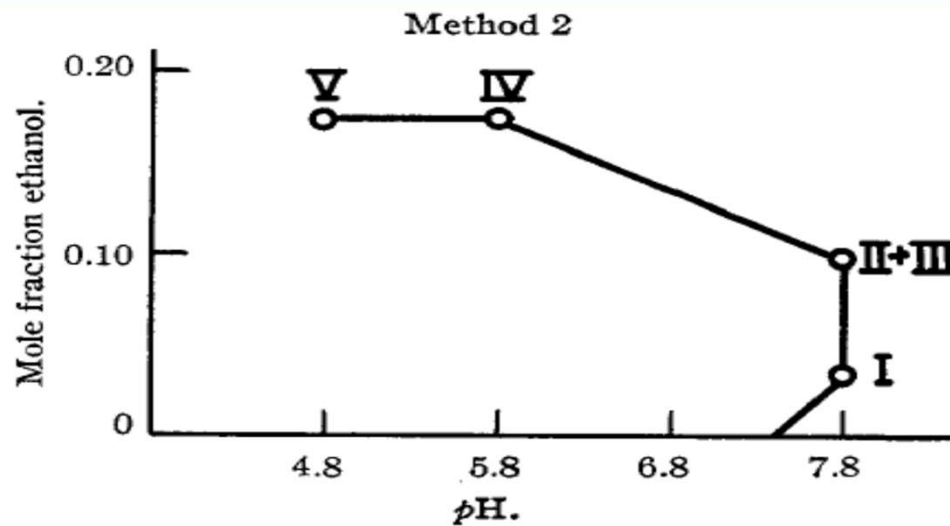
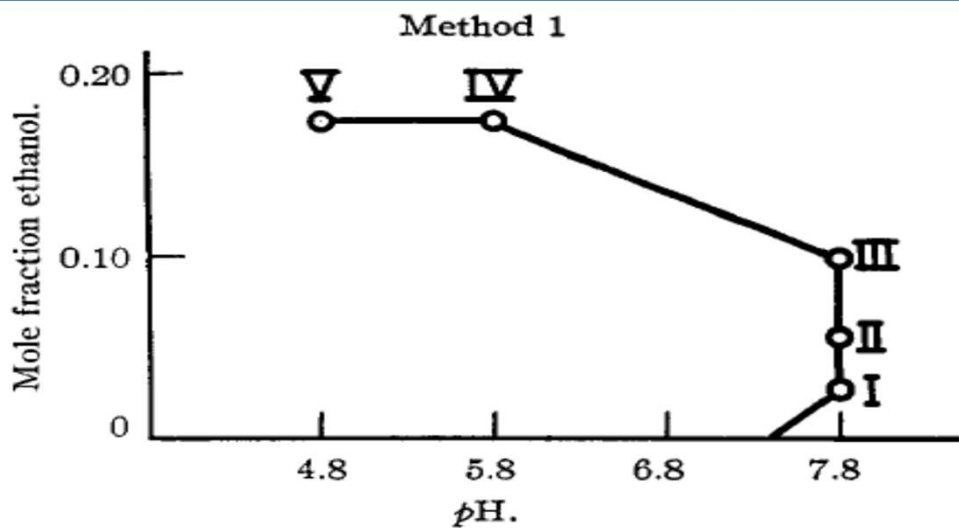
- Snižují dielektrickou konstantu prostředí (zvýšení elektrostatické interakce mezi nabitými skupinami biopolymeru)
- Izolace NK koncentrovaným ethanolem
- Jen omezeně pro srážení proteinů při snížené teplotě (riziko denaturace); např. sérové proteiny – kromě EtOH, MeOH, aceton, ether

[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^{1a,b,c,d}

BY E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, JR., D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN AND H. L. TAYLOR^{1e}

SRÁŽENÍ SÉROVÝCH PROTEINU dle COHNA



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	α -Globulin	Cholesterol	β -Globulin	γ -Globulin	Fibrinogen ^b
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	0.34	.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 ^a	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

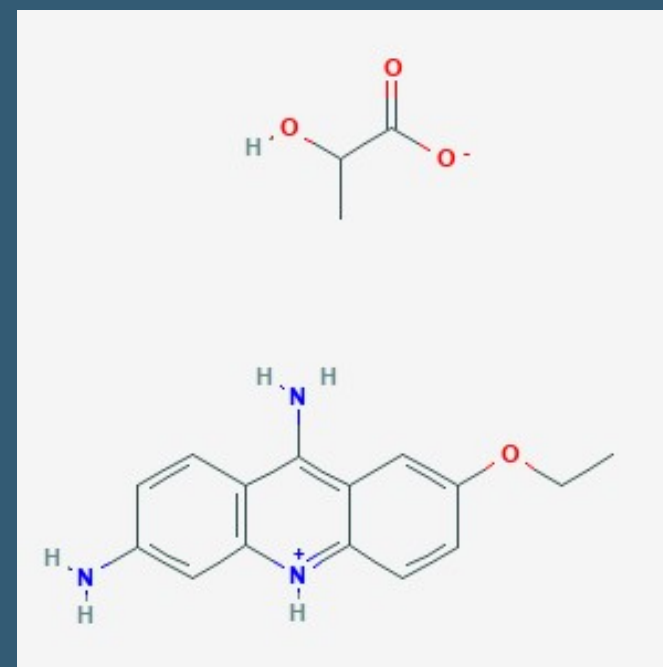
SRÁŽENÍ ORG.ROZPOUŠTĚDLY MÍSITELNÝMI S VODOU

- Nutno provádět při $T < 0$ °C, při vyšší teplotě dochází k denaturaci
- Dvojstupňově
- Přídavky z tabulky nebo podle vzorce

SRÁŽENÍ ORG.POLYMERY

Princip identický s rozpouštědly

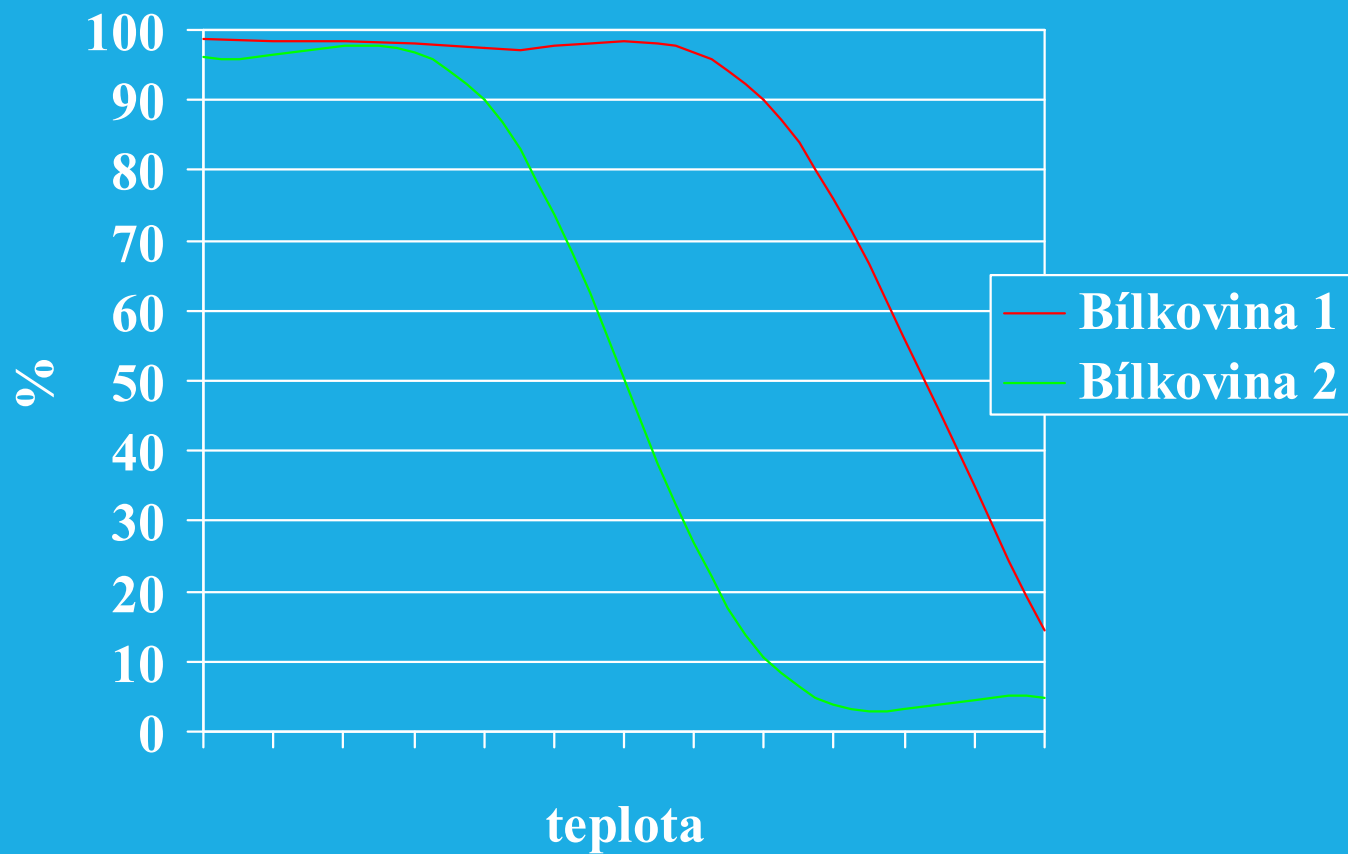
- DEAE dextran
- PEG
- Polyakrylová kyselina
- Rivanol
- Kaprylová kyselina



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

TEPELNÁ DENATURACE

- 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