

02b-Chromatografie

1. Enzym se vyskytuje jako monomer a tetramer. Jak získáte monomer zbavený tetrameru?
2. Přípravujete hybridní DNA renaturací směsi denaturované DNA. Jak ji oddělíte od zbytků nerenaturované DNA?
3. Máme směs kruhové a lineární DNA o stejné $M_r = 6 \cdot 10^6$. Která bude vytékat z kolony agarosy dříve a proč?. Jak by to bylo v případě nativní a denaturované rRNA?
4. Čistíte enzym pomocí standartní metody zahrnující GPC. Použijete-li 10x vyšší koncentraci enzymu než je uvedeno, začne enzym vytékat při V_0 . Proč?
5. Chcete zvýšit množství materiálu zpracovávaného sloupcovou chromatografií. Je vhodné zvětšit délku nebo šířku kolony nebo obojí?
6. Papírová chromatografie látek A, B, C a D dala hodnoty R_f v následujících soustavách:

| Látka | BuOH-H ₂ O | iPrOH-HCl | EtOH | HAc |
|-------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| A | 0,23 | 0,31 | 0,42 | 0,09 |
| B | 0,24 | 0,20 | 0,51 | 0,62 |
| C | 0,38 | 0,58 | 0,40 | 0,64 |
| D | 0,41 | 0,56 | 0,53 | 0,10 |

Jak nejlépe oddělíte tyto látky?

7. Aplikovali jste **20 mg** bílkovin na sloupec DEAE-celulosa, z nich **30%** je hledaný enzym. Po eluci jste našli ve všech frakcích dohromady **18,9 mg** bílkovin, ale žádnou enzymovou aktivitu. Vysvětlete!
8. DNA o M_r **$6 \cdot 10^6$** je tvořena dvouvláknovým úsekem a jednovláknovým prodloužením o stejné délce jako dvouvláknový. Chromatografujete ji na hydroxylapatitu gradientem fosfátu, kdy je eluce téměř nezávislá na M_r . Kde se dá očekávat tato DNA - při V_R jednovláknových nebo dvouvláknových DNA nebo mezi nimi? Proč?
9. Enzym vyžaduje Mg^{2+} , jeho ztráta způsobuje ireversibilní inaktivaci. Pokusili jste se ho purifikovat na iontoměničce i GPC, v obou případech ztratil aktivitu. Vysvětlete, co se stalo a jak upravit postup, aby k inaktivaci nedošlo!

10. Některé látky, např. morfin, se váží na specifické receptory nervových buněk. Jak to využijete k izolaci tohoto receptoru?

11. Dva enzymy o stejné M_r mají při pH 5,5 uspořádanou sek. strukturu, nejméně 75% je alfa-helix. Při pH 8,5 jeden z nich ztrácí uspořádanost a nabývá tvaru náhodného klubka, tato změna je vratná. Navrhněte separační postup včetně analýzy izolovaného materiálu!