

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!