

# 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

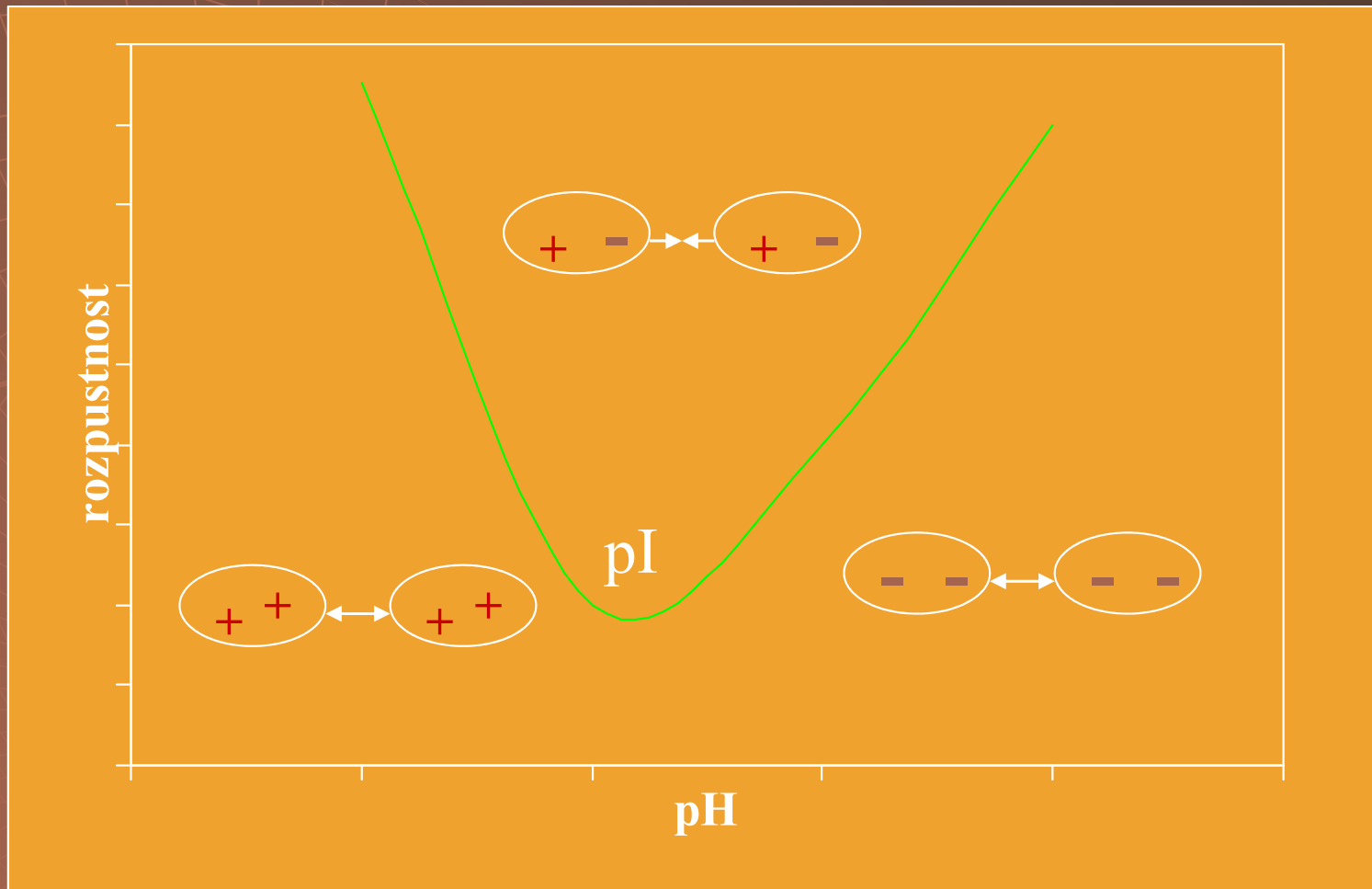
- ◆ Vlastnostmi bílkoviny – distribuce hydrofobních a hydrofilních skupin na povrchu bílkoviny



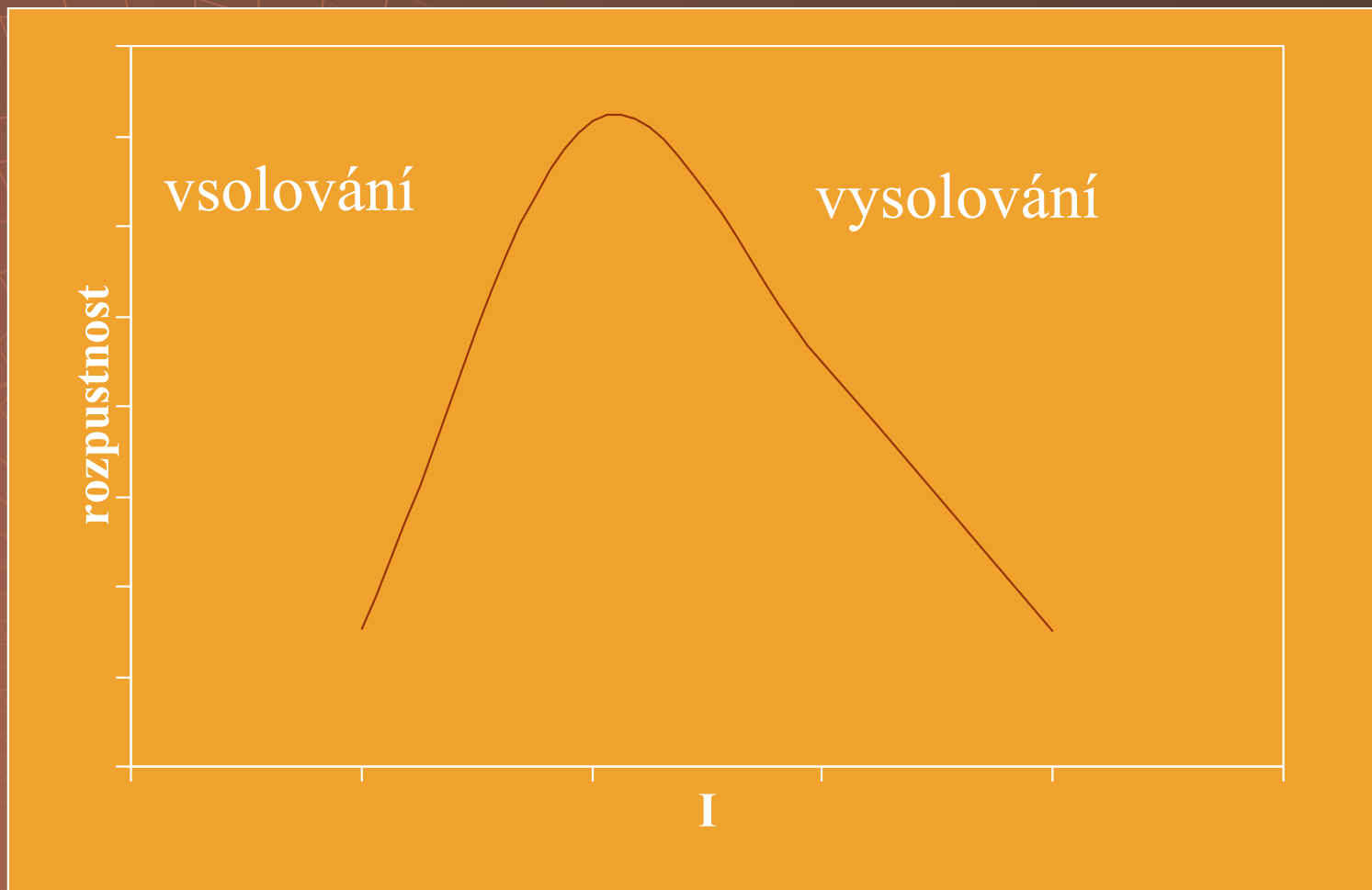
# Rozpustnost bílkoviny

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

# Izoelektrická precipitace



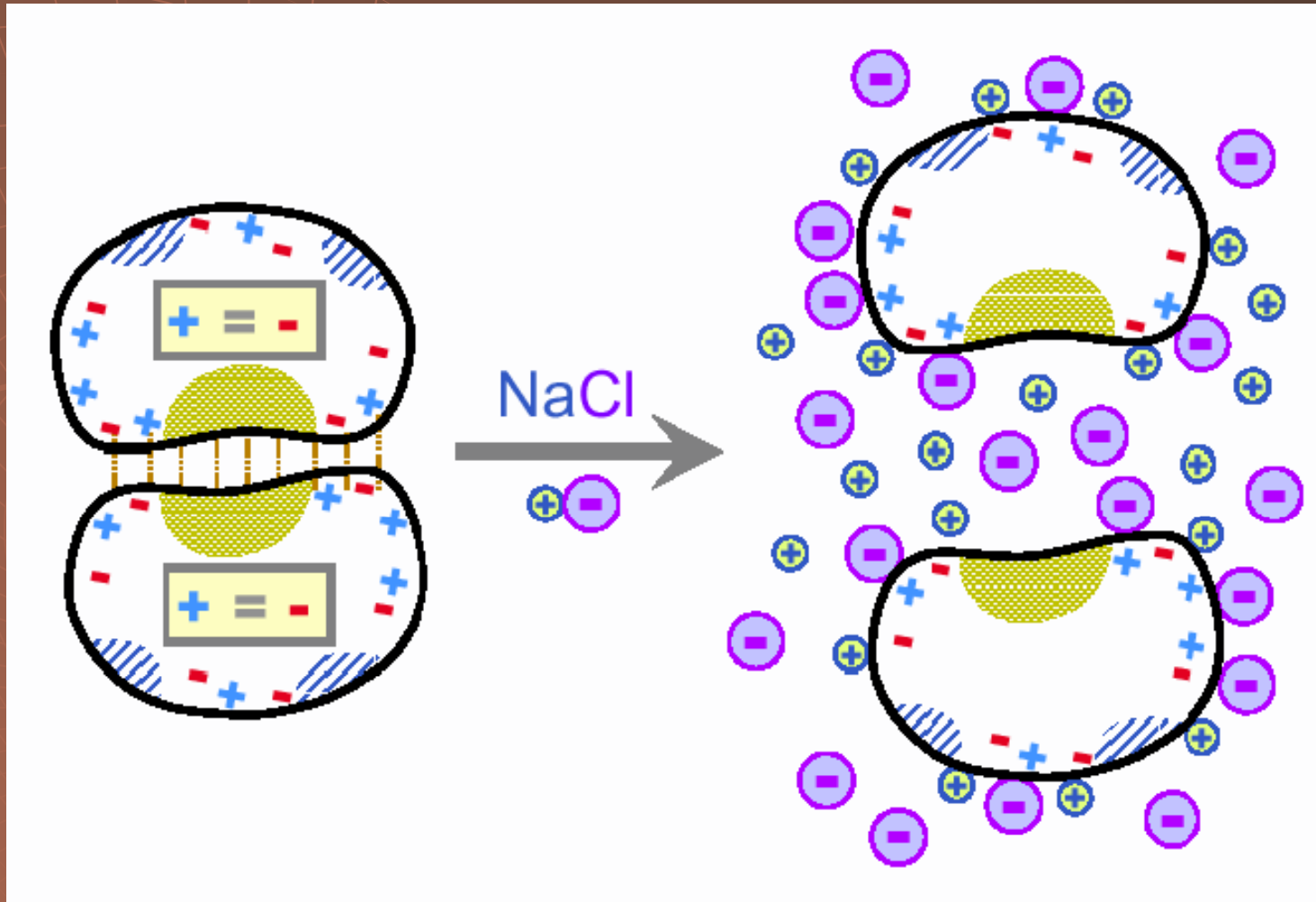
# Srážení neutrálními solemi



# Vsolování

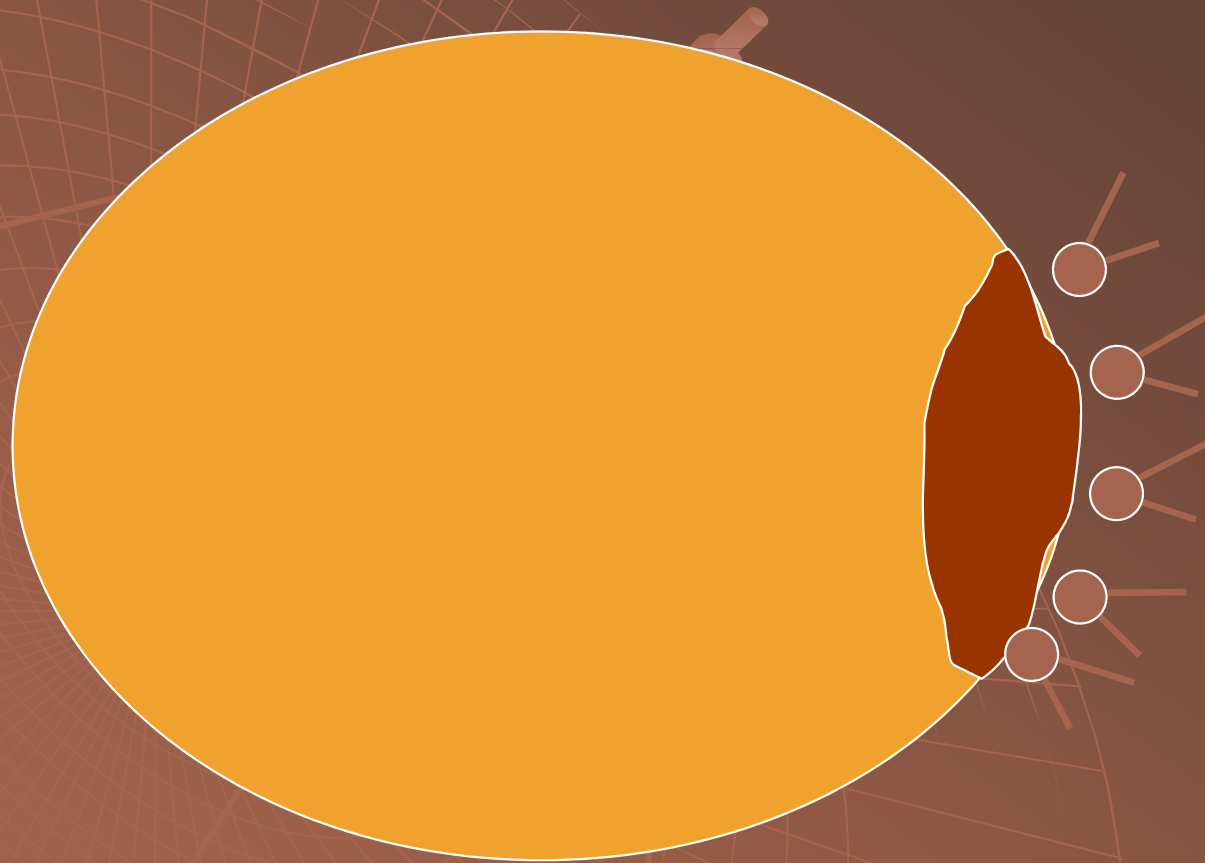


# Vsolování

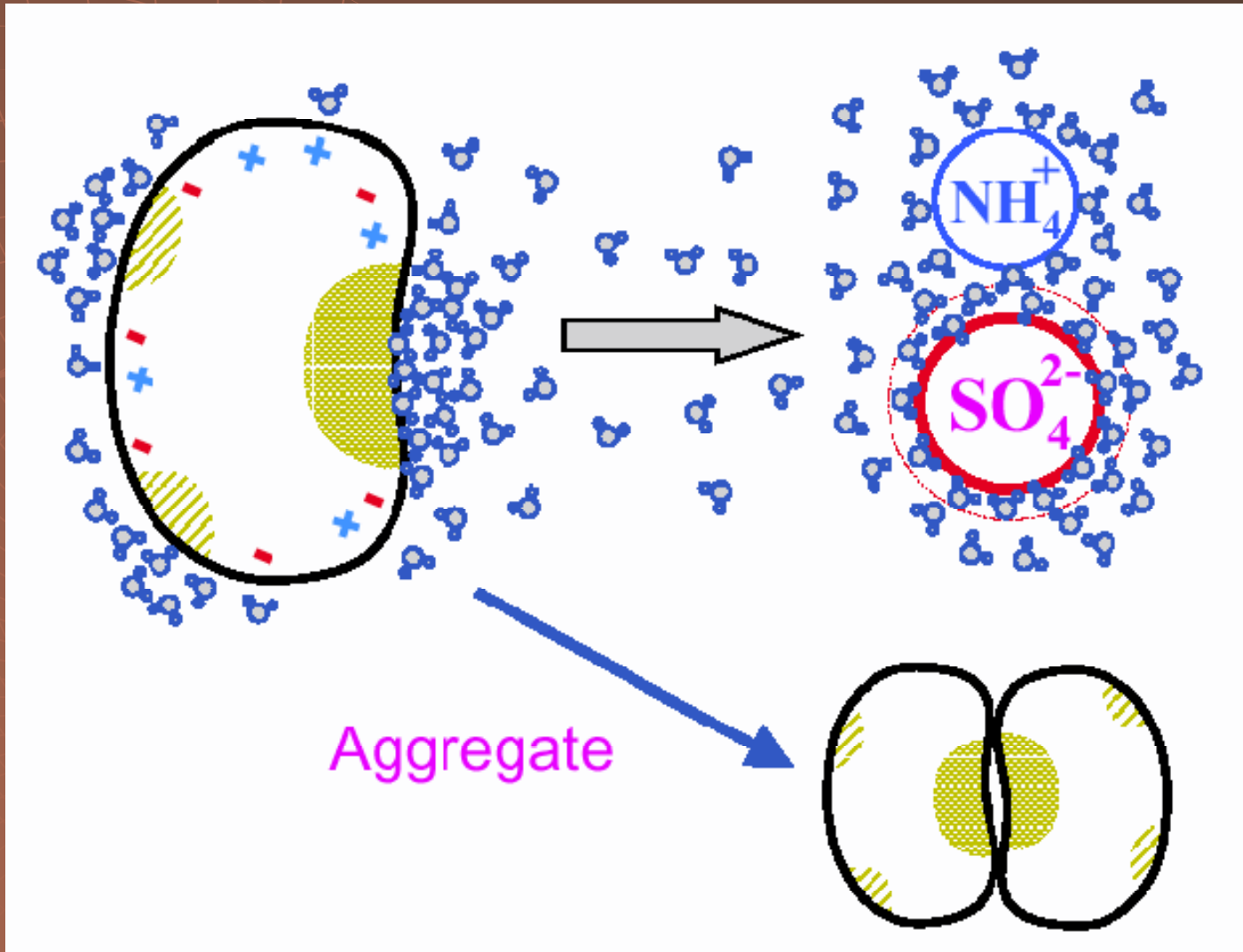




# Vysolování



# Vysolování



# Praktické aspekty

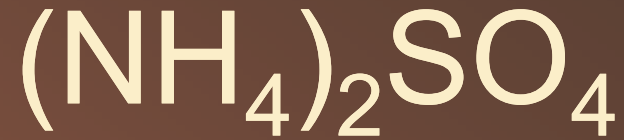
- ◆ Hofmeisterova řada

## 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>

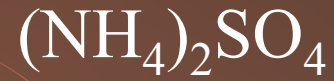
## Kationty

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

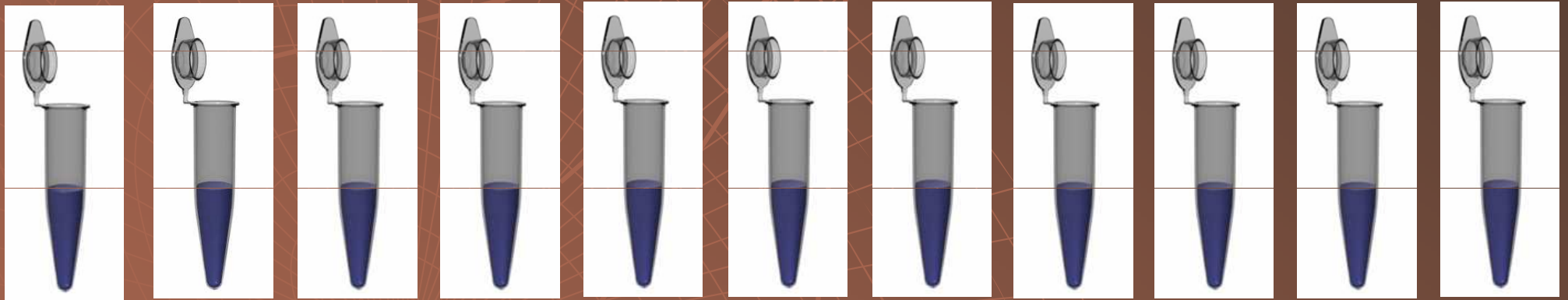


- ◆ Rozpustnost se málo mění s teplotou
- ◆ Saturevaný roztok 4 M - hustota  $1,235\text{g/cm}^3$  umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin (hustota  $1,29\text{g/cm}^3$ )
- ◆ Levný
- ◆ Stabilizuje bílkoviny
- ◆ Relativně čistý

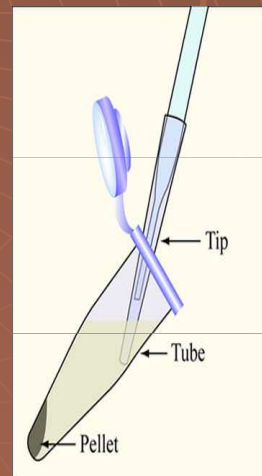
# Srážecí křivka



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

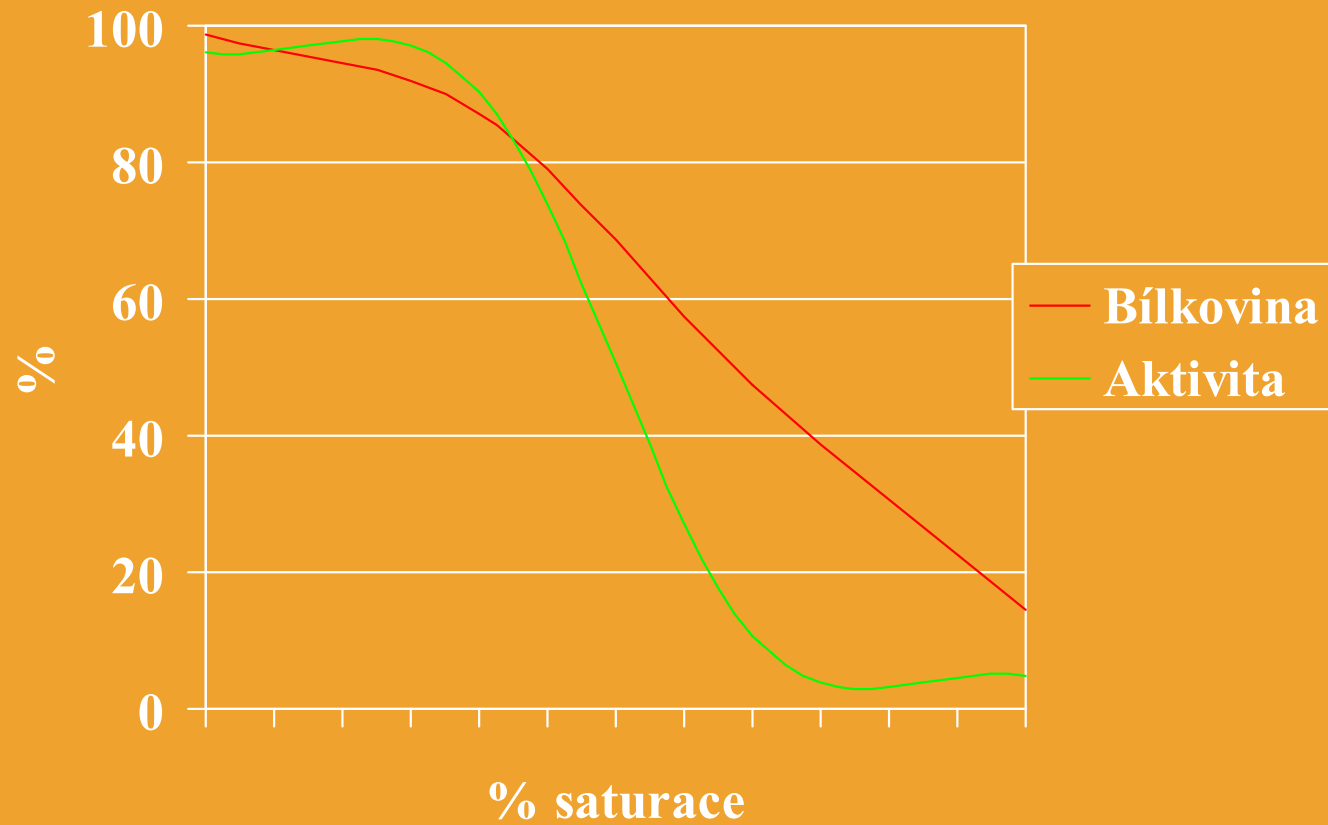


Koncentrace bílkoviny ←

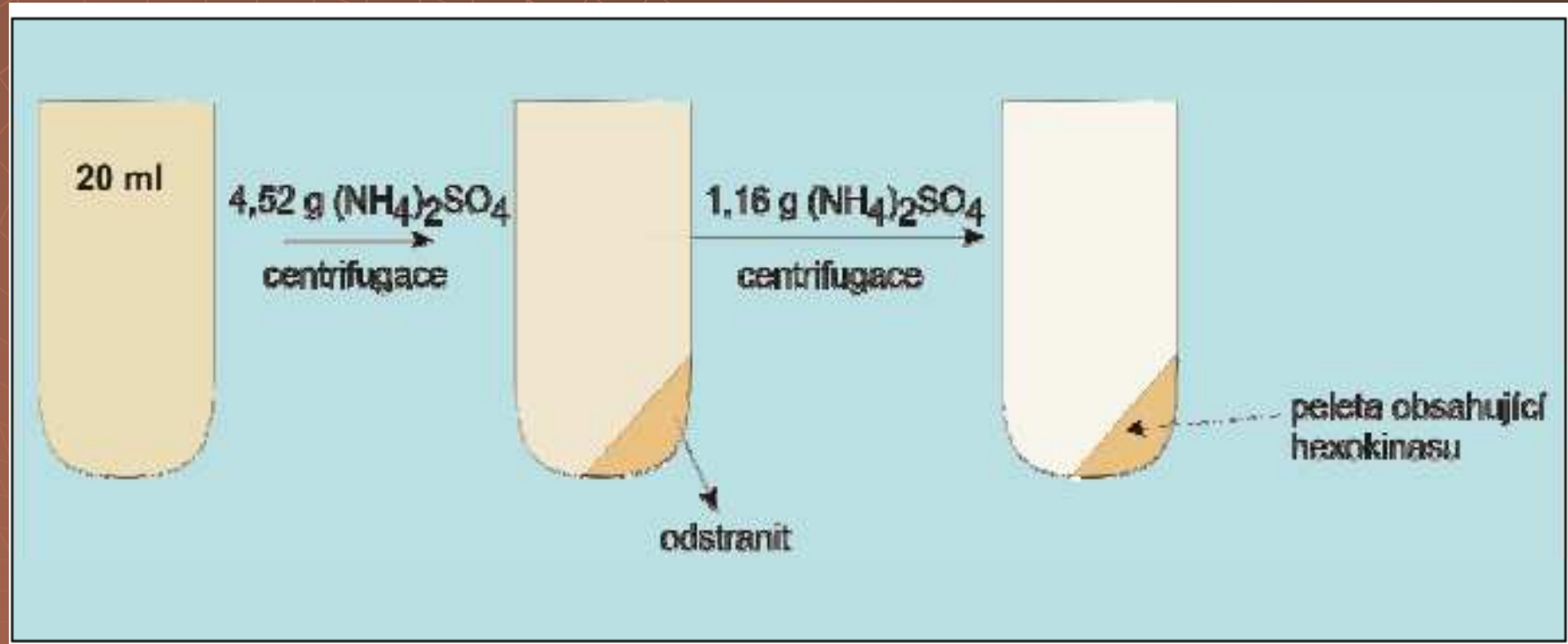


→ Aktivita bílkoviny

# Srážení - dvojstupňově



# Srážení - dvojstupňově







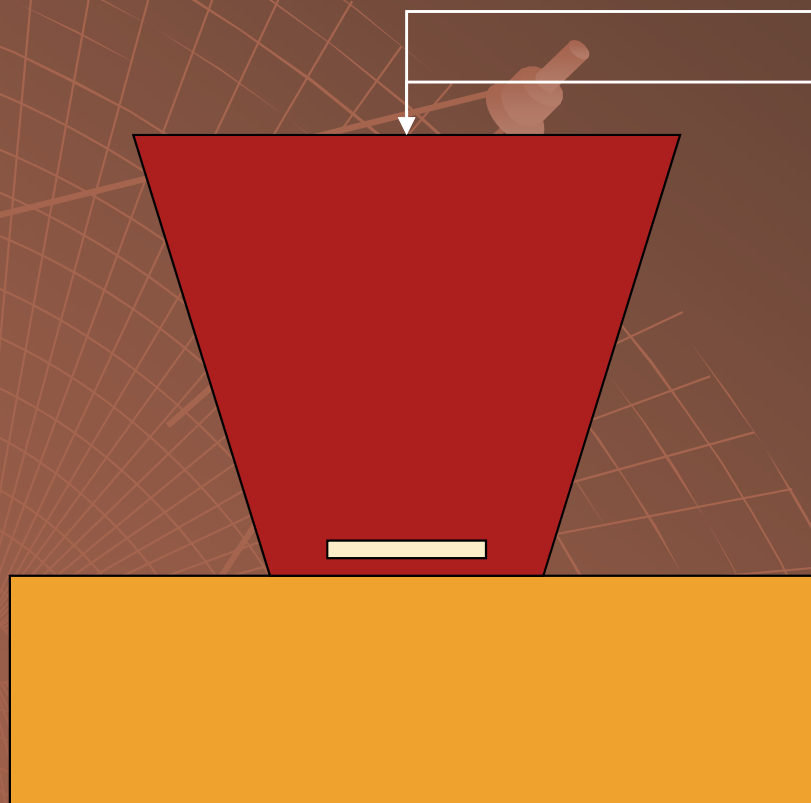
# Přidané množství

- ◆ Tabulky
- ◆ Vzorce

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

# Provedení

Chlazení  
Míchání 10-30'  
Centrifugace



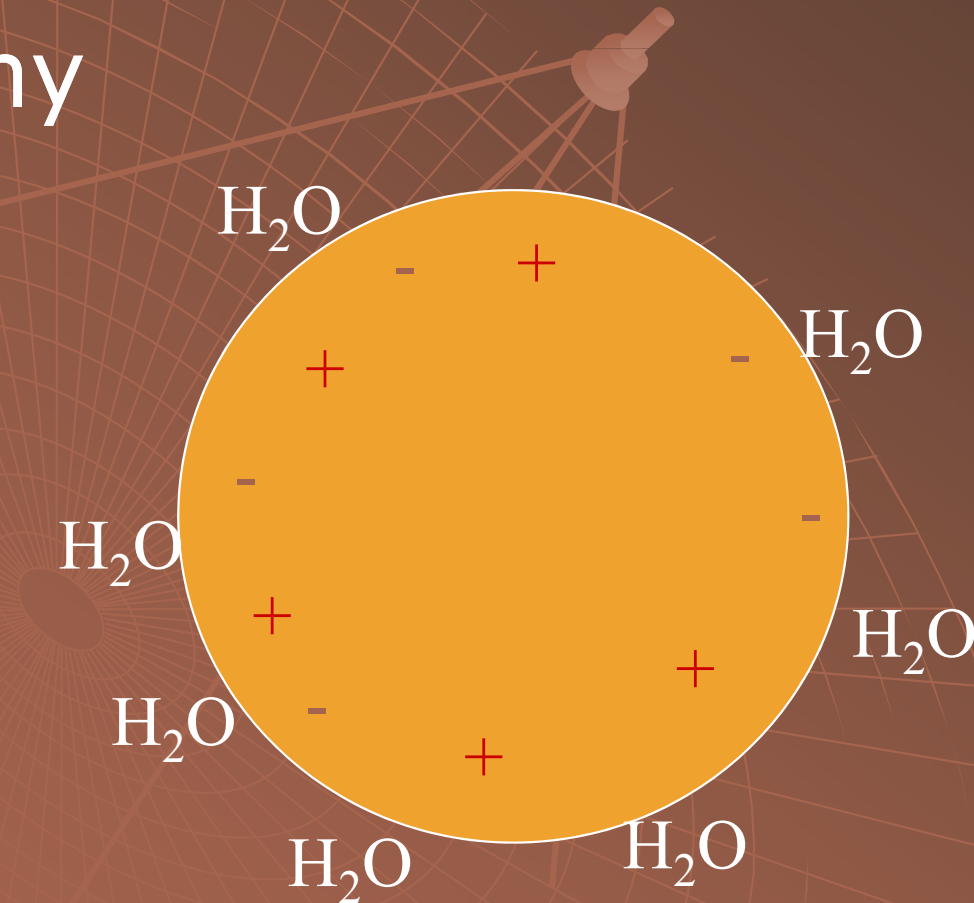
pevný  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
nebo  
saturovaný roztok  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

úprava pH  
 $\text{NH}_4\text{OH}$

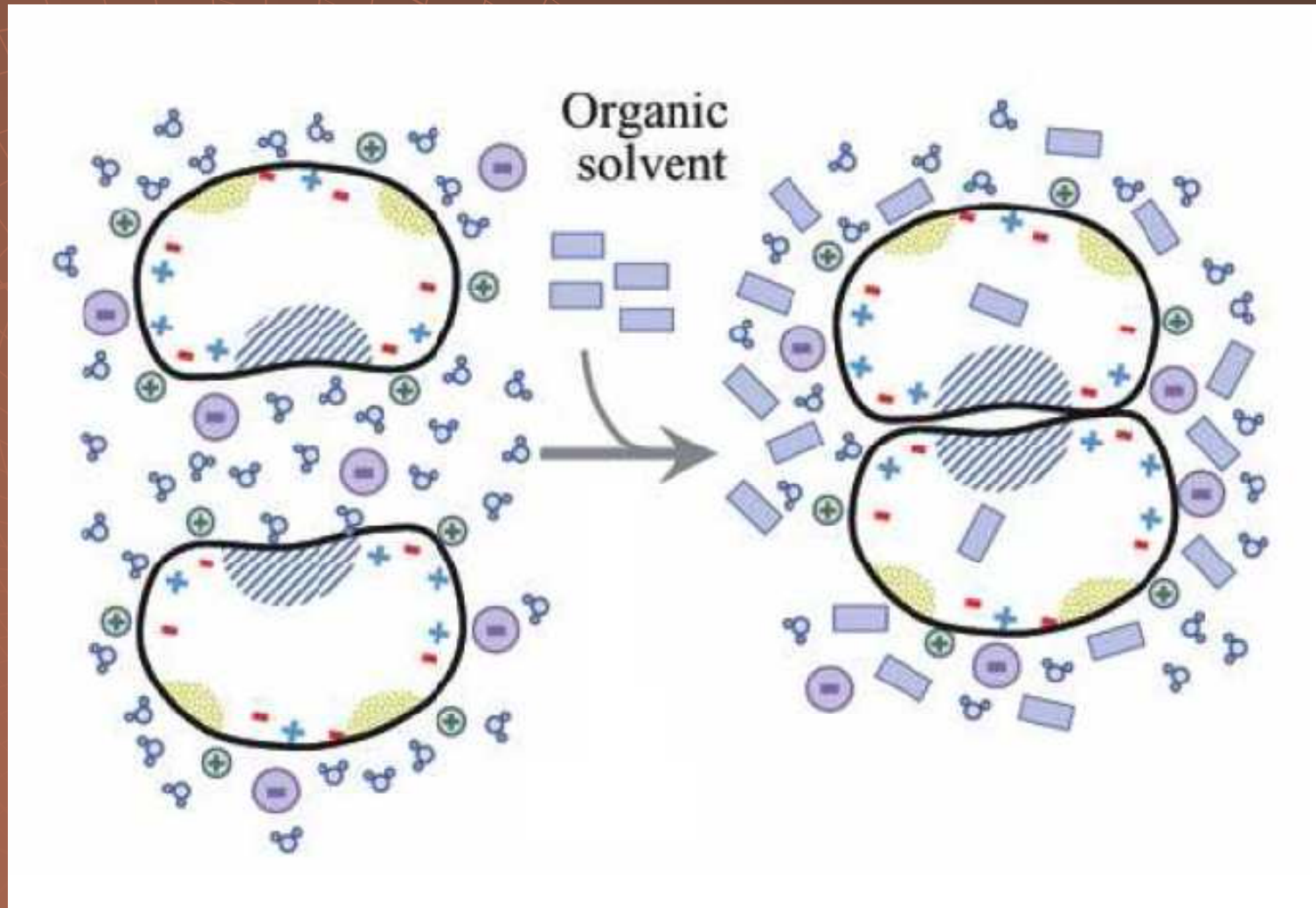
El. míchačka

# Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- ◆ Rozpouštědla ruší solvatační obal bílkoviny



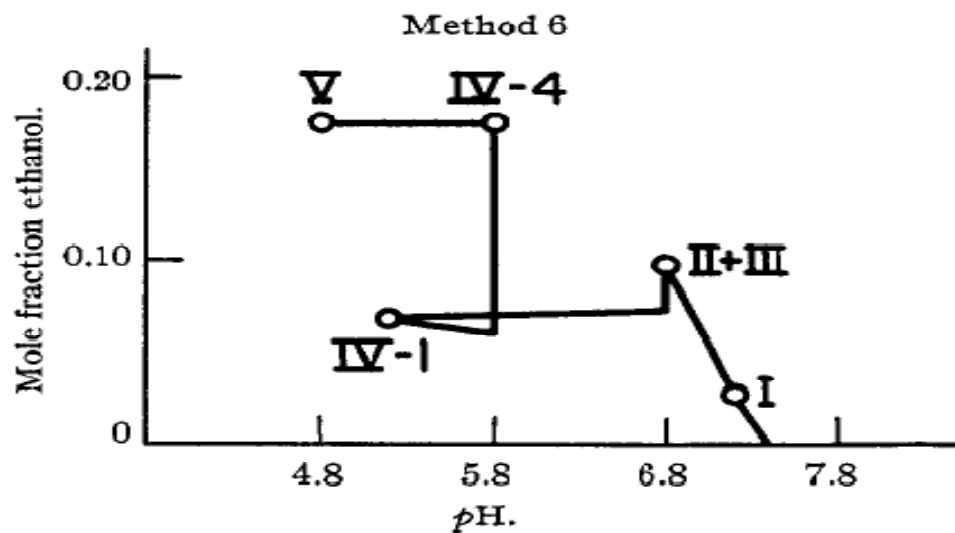
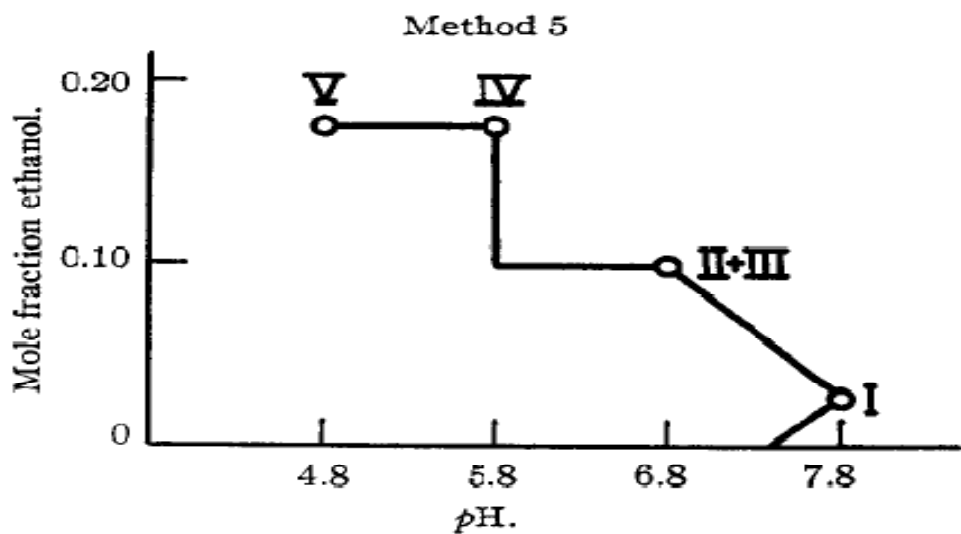
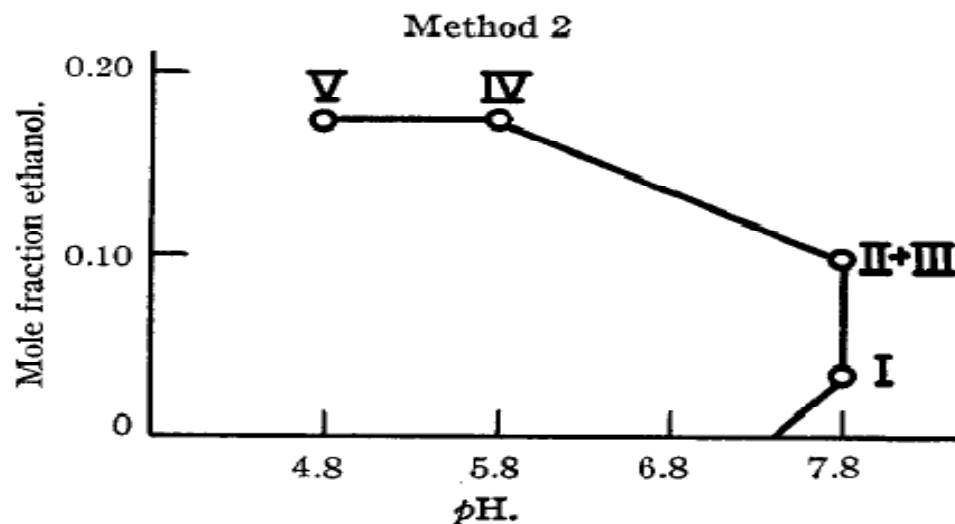
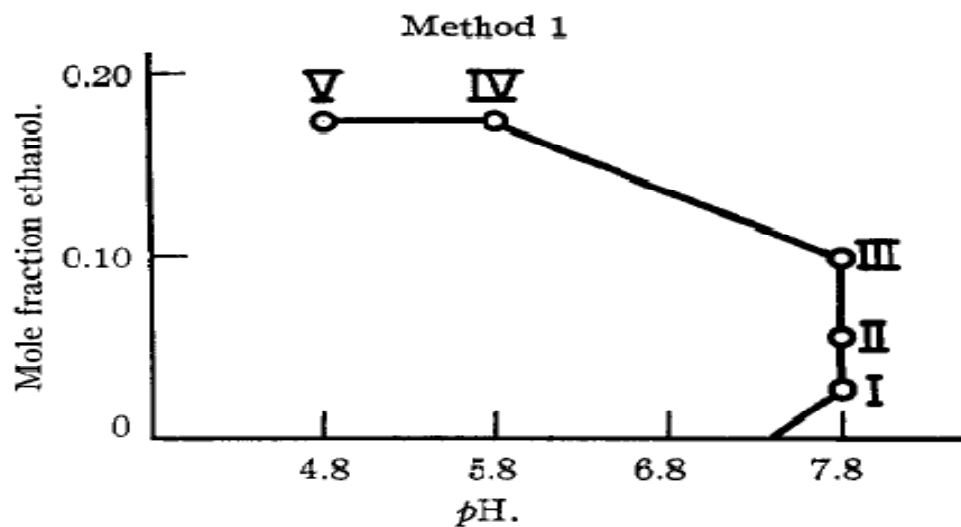
# Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou



[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                       |
|                 | 1      | 37.1    | 4.7                | 1.2         | 7.5               | 7.4                | 3.7                     |
| Totals          | 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
- ◆ Přídatky z tabulky nebo podle vzorce



# Srážení org.polymery

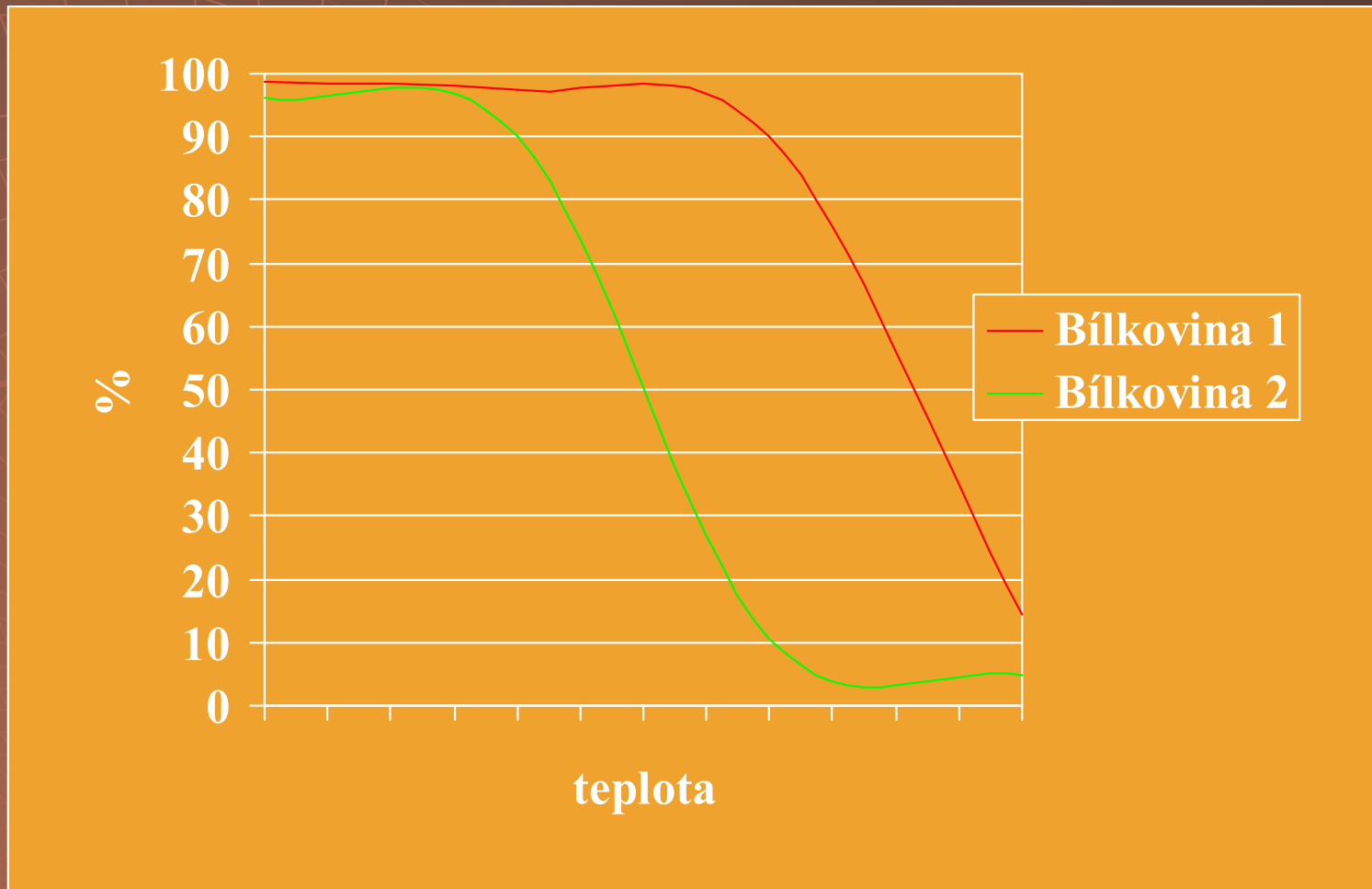
Princip identický s rozpouštědly

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

# Srážení selektivní denaturací

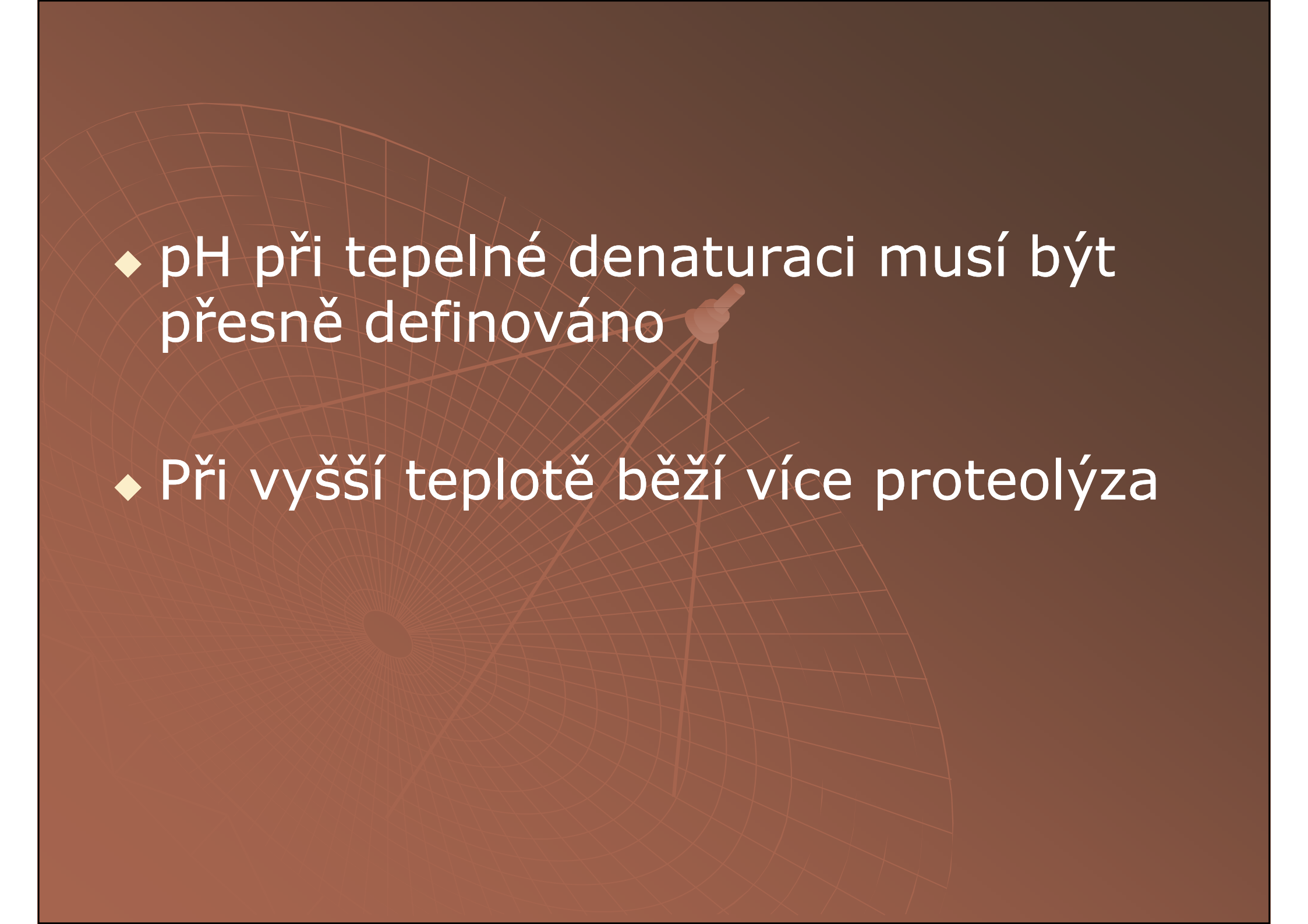
- ◆ Při této metodě denaturujeme balastní bílkoviny, cílová bílkovina musí zůstat z 85 - 90 % v nativním stavu.
- ◆ Denaturační vlivy – T, pH, org. rozpouštědla
- ◆ Bílkovina musí nejen denaturovat i precipitovat

# 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

- 
- The background features a stylized globe with a grid of latitude and longitude lines. A hand is shown pointing towards the right side of the globe. The overall color scheme is a gradient of brown and tan.
- ◆ 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