

Přístupy k analýze buněčných proteinů

Metody pro studium buněčných proteinů

Stanovení fyzické přítomnosti buněčných proteinů:

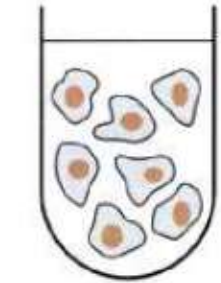
- polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)
- westernový přenos
- ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay)
- imunoprecipitace
- imunohistochemie
- izoelektrická fokusace
- dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

ROZBÍJENÍ BUNĚK A TKÁNÍ

Prvním krokem purifikace většiny proteinů je rozbití buněk nebo tkáně

Použitím jemných mechanických postupů, zvaných homogenizace, lze perforovat plasmatické membrány buněk, takže se z buněk uvolní jejich obsah. Používané čtyři metody jsou tu ukázány schematicky.

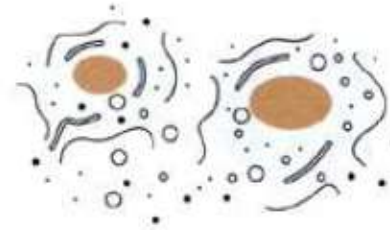
Vznikající hustý homogenát nebo extrakt obsahuje větší i menší molekuly z cytosolu, jako jsou enzymy, ribosomy a různé metabolity, ale také membránou uzavřené organely.



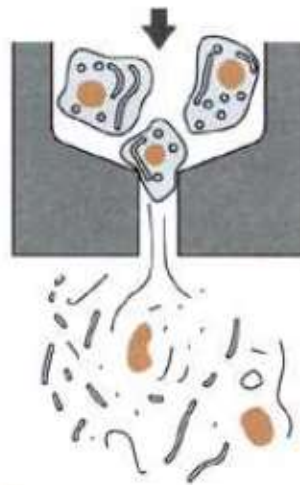
suspence buněk nebo tkáň



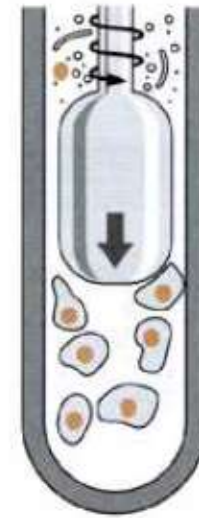
① rozbití buněk ultrazvukem



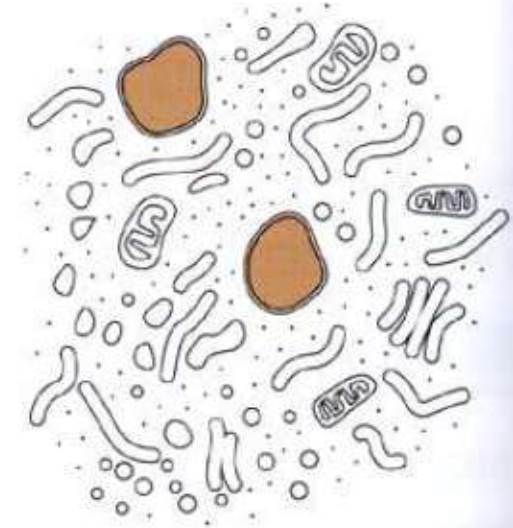
② použití mírného detergentu na perforaci plasmatické membrány



③ protlačení buněk malým otvorem



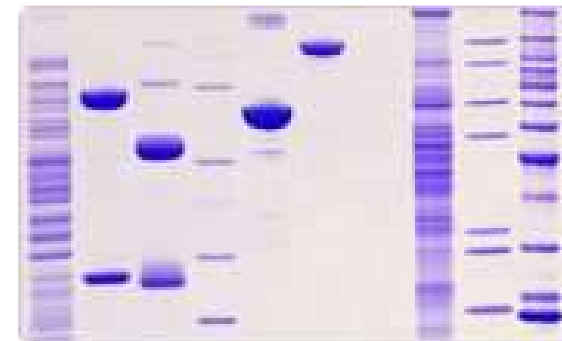
④ rozbití buněk dobře těsnícím rotačním pístem v tlustostěnné nádobce



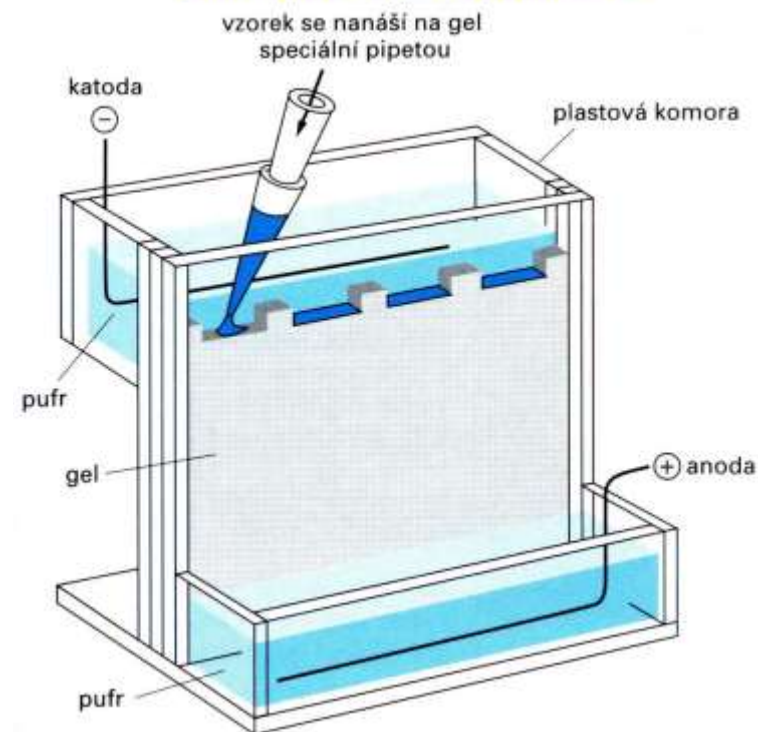
Při opatrné práci lze získat téměř všechny organely v neporušeném stavu.

Elektroforetické techniky

- založeny na schopnosti pohybu elektricky nabitých molekul v elektrickém poli
- proteiny se obvykle rozdělují vertikální **polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (PAGE)**
- polymerovaný gel se vloží mezi dvě nádoby naplněné pufrům, do kterých se ponoří elektrody
- u deskové varianty se vzorky nanesou do jamek na horní straně gelu
- používají se alkalické pufrы, které proteinům udělají **negativní náboj** - v elektrickém poli se pohybují směrem k anodě



GELOVÁ ELEKTROFORÉZA



Faktory ovlivňující pohyblivost proteinů v gelu

- **velikost:** se vzrůstající velikostí molekuly se snižuje pohyblivost proteinů v gelu (efekt molekulárního síta)
- **tvar:** globulární proteiny se pohybují rychleji než vláknité
- **hustota náboje** (náboj/jednotka hmoty): čím vyšší hustota náboje tím vyšší pohyblivost v gelu
- **koncentrace akrylamidu:** se vzrůstající koncentrací pohyblivost klesá

SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

- proteiny běžně zaujmají různé tvary a disponují různými náboji (na rozdíl od molekul DNA, které jsou uniformní z hlediska tvaru a rozdělení náboje)
- interpretace elektroforetogramu v nativní podobě je obtížná
- pro separaci proteinů se běžně používá **denaturační** varianta PAGE zvaná **SDS-PAGE**:
- proteiny se rozpouštějí v roztoku obsahujícím negativně nabitou molekulu **SDS**
- disulfidové vazby v proteinech se eliminují redukčním činidlem (**β -merkaptoetanolem**)
- proteinů je dokončena **varem**

SDS-PAGE

Ulrich K. Laemmli
University of Geneva

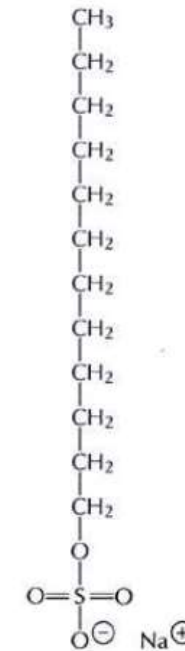


Negativní náboj SDS a jeho vazba k proteinům způsobí:

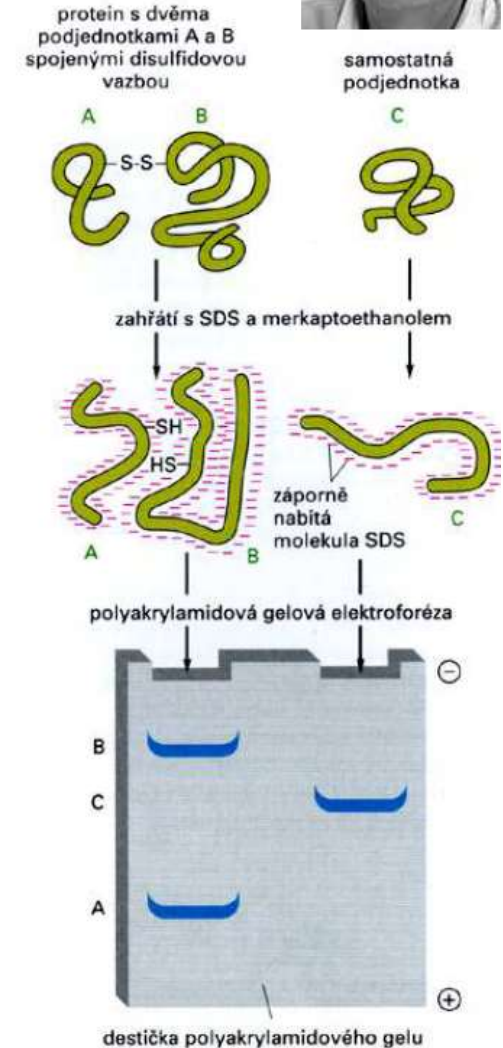
- **zamaskování vlastního náboje** proteinu
- **natažení proteinu** (denaturaci) a eliminuje tak vliv tvaru proteinu na pohyblivost (díky elektrostatickému odpuzování molekul SDS)
- počet molekul SDS navázaných na protein je zhruba úměrný jeho molekulové hmotnosti; proto má každý protein, bez ohledu na svou velikost, **ekvivalentní hustotu náboje**
- větším proteinům bude kladen v gelu větší odpor a jejich pohyb bude pomalejší (efekt molekulárního síta).

Proteiny se při SDS-PAGE separují pouze podle jediné vlastnosti: **molekulové hmotnosti**.

detergent dodecylsulfát sodný (SDS) se používá pro solubilizaci proteinů, které se pak dělí v SDS-polyakrylamidové gelové elektroforéze

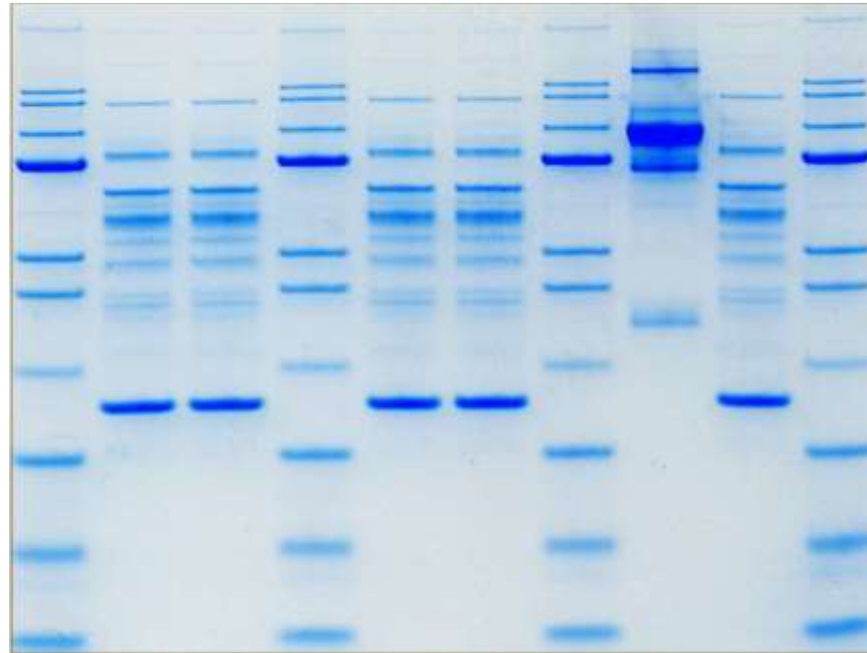
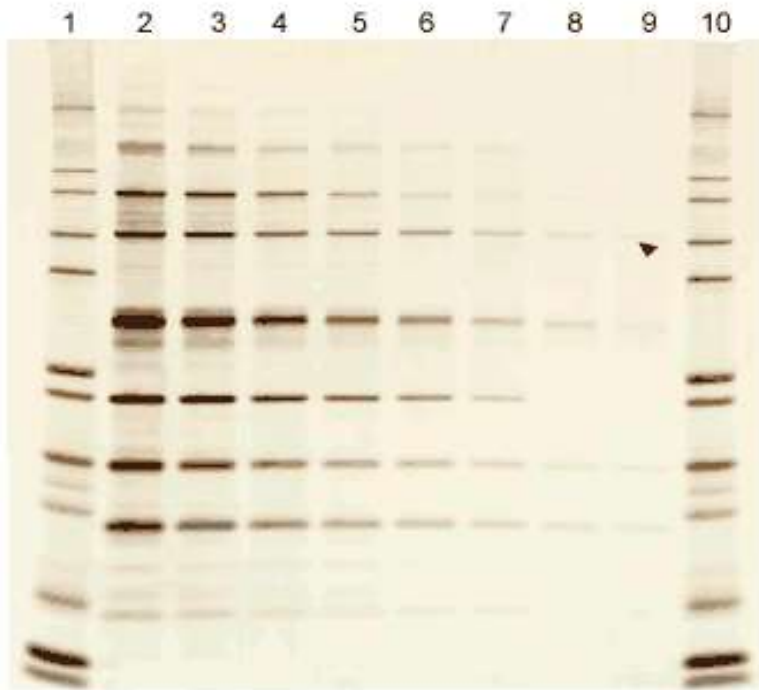


SDS



Zviditelnění proteinů separovaných PAGE

- **nespecificky:** obarvení všech proteinů v gelu proteinovými barvivy
- stříbrem, „coomassie brilliant blue“

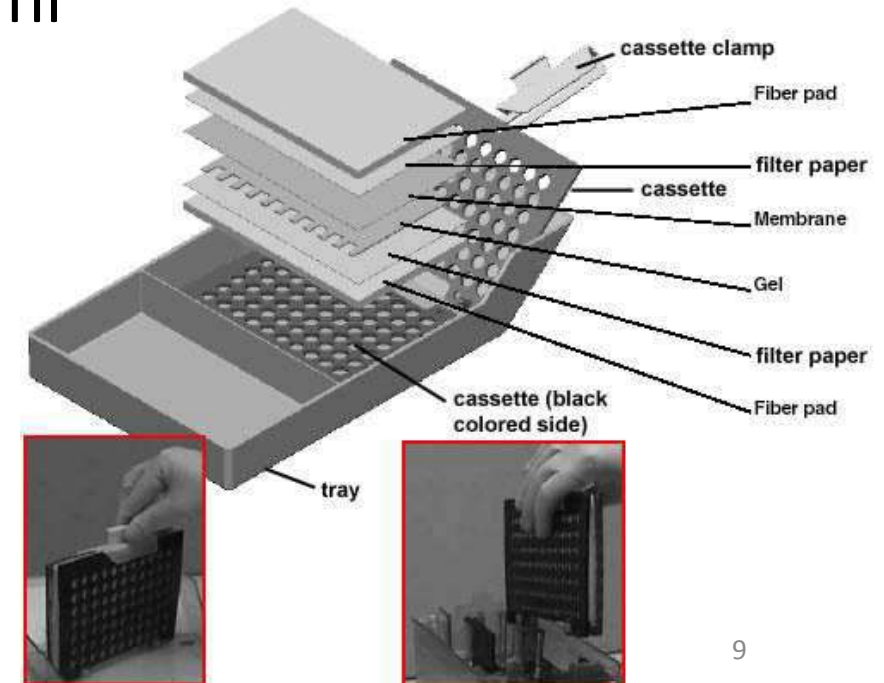
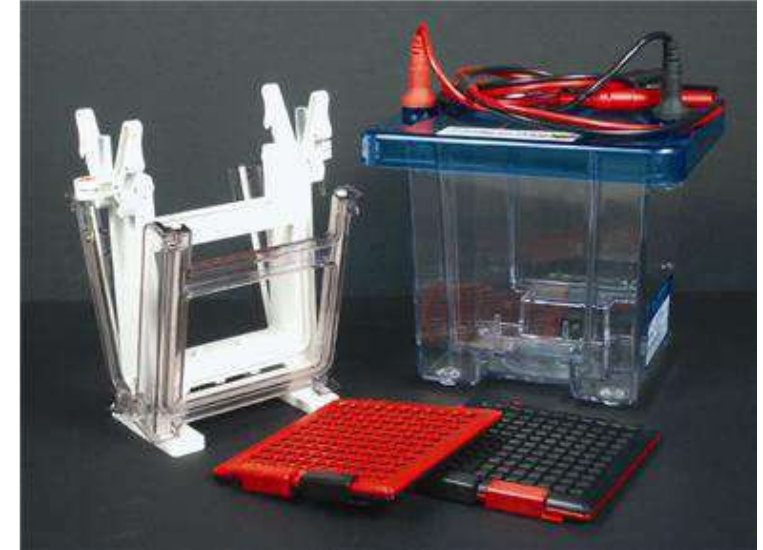


Zviditelnění proteinů separovaných PAGE

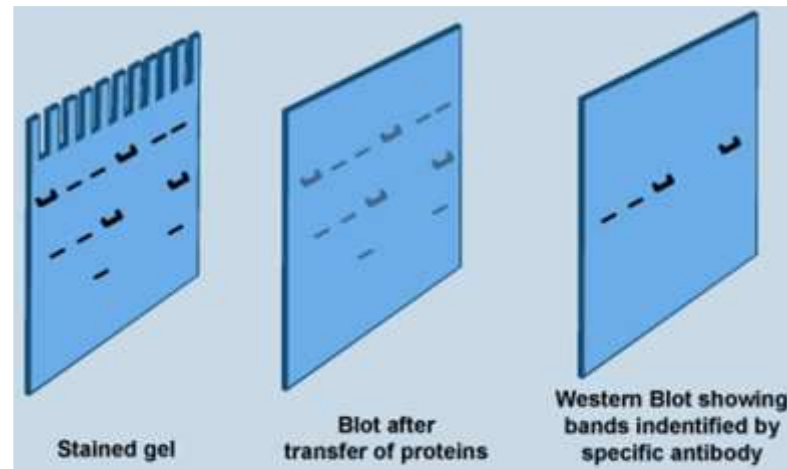
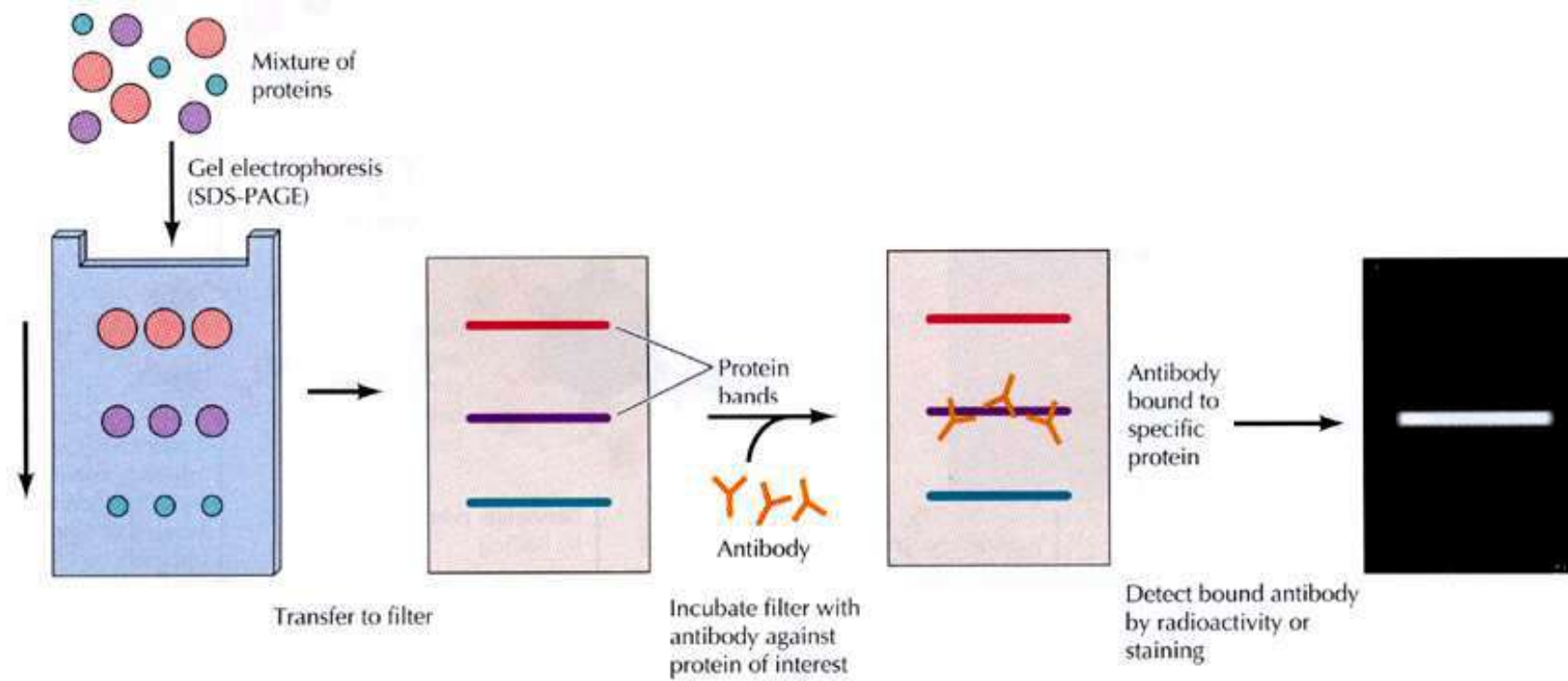
specificky:

- **westernový přenos** (= „immunoblotting“), tj. detekce proteinů rozdělených elektroforézou protilátkami
- přenos rozdělených proteinů z gelu na pevný filtr
- navázání protilátky na příslušný antigen při promývání filtru roztokem specifické primární protilátky (protilátka musí rozeznat lineární epitop – protein je obvykle denaturován)
- zviditelnění protilátky na filtru např.

radioaktivní sondou nebo sekundární protilátkou konjugovanou s určitým enzymem

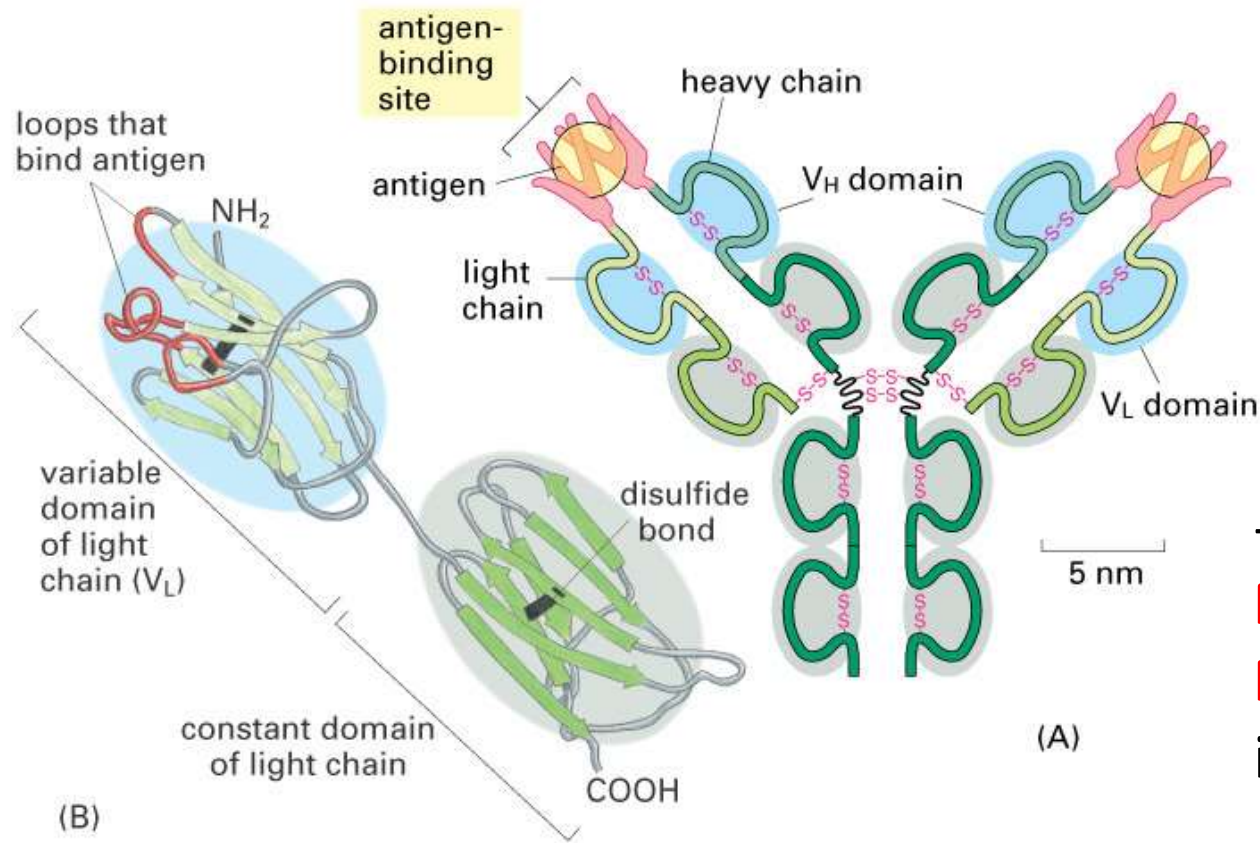


Zviditelnění proteinů westernovým přenosem



Základem jsou protilátky (Ab)

- konkrétní epitopy proteinů se detekují pomocí specifických protilátek, které slouží jako sondy

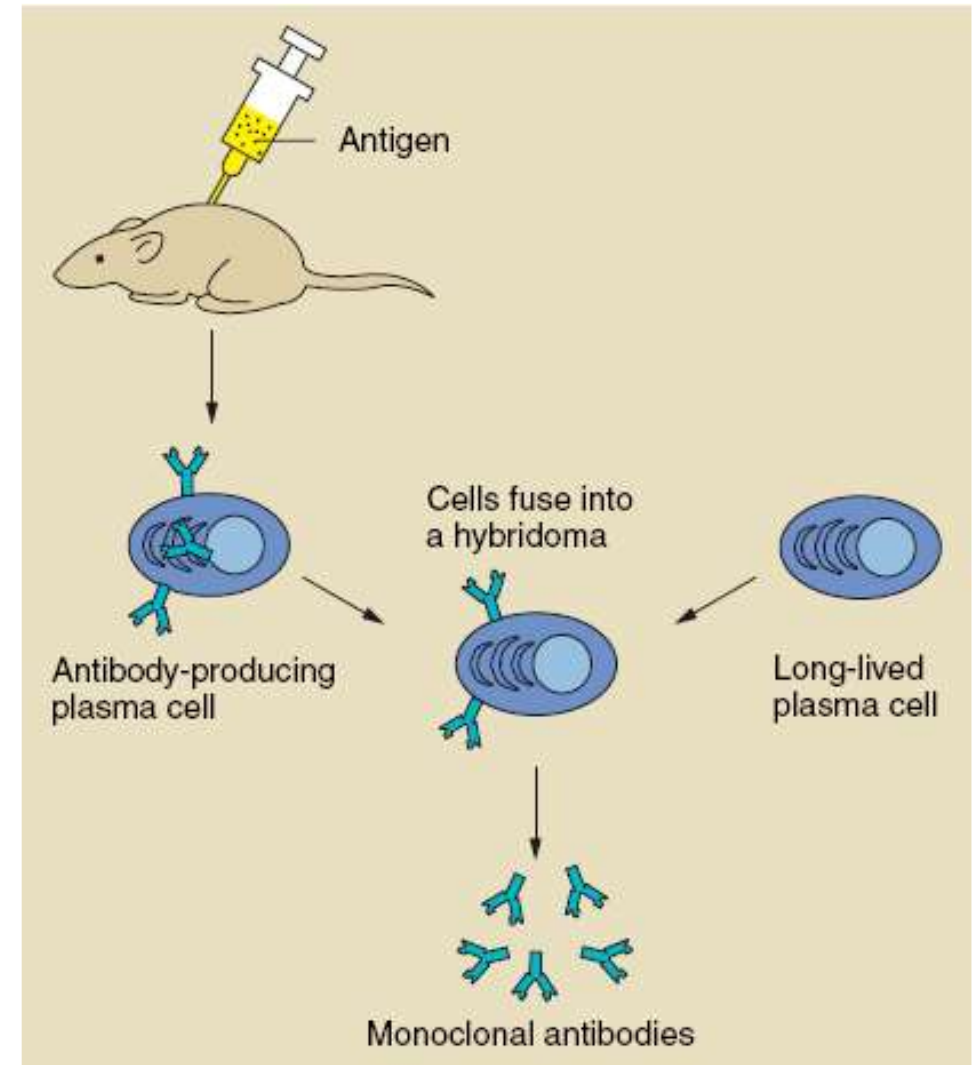


- protilátky mohou být:
 - Monoklonální** - získávají se z hybridomů
 - Polyklonální** - získávají se z krve imunizovaných zvířat

Příprava monoklonálních Ab

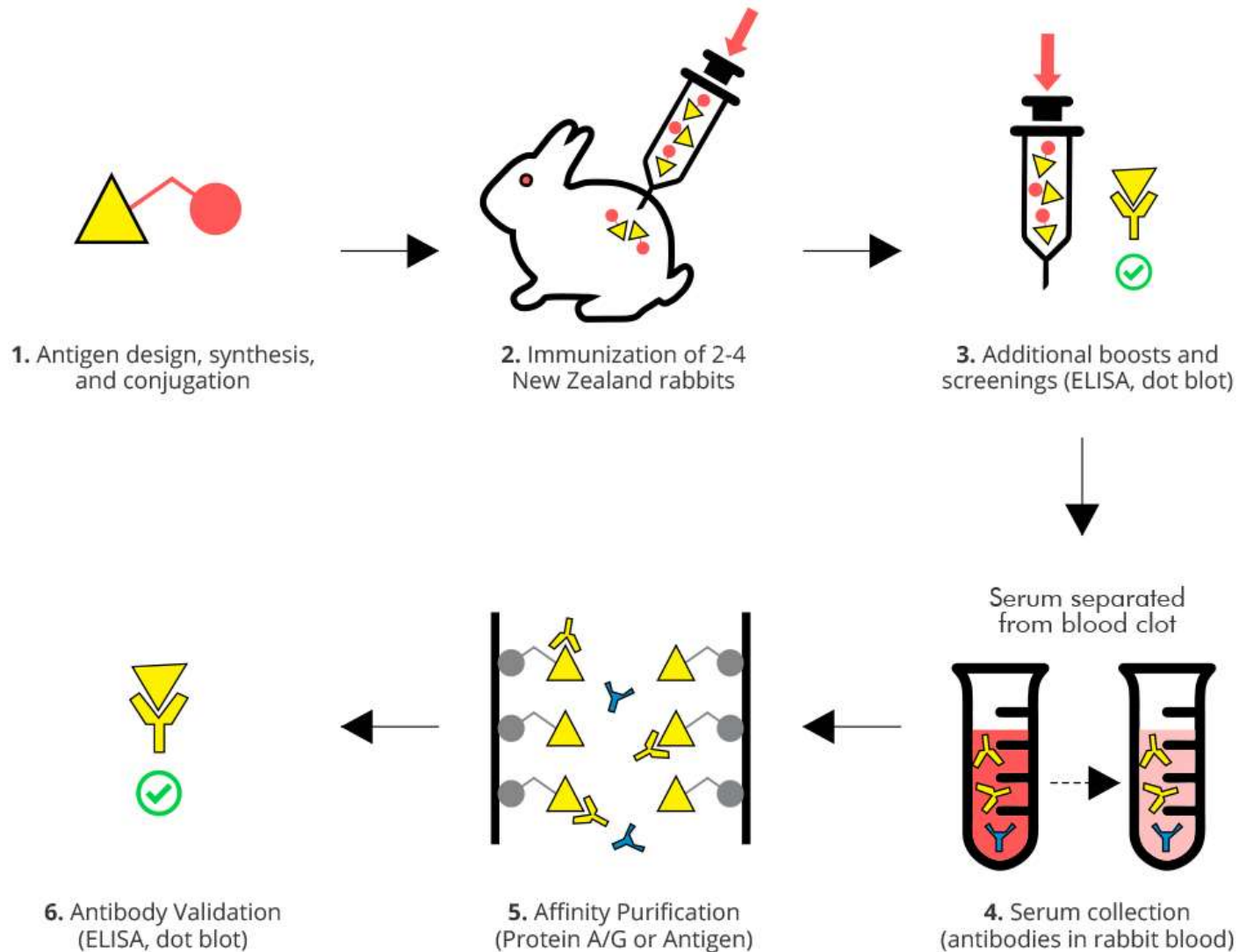
Produkuje se pomocí hybridomů

- hybridom vzniká fúzí:
- **nádorové leukemické buňky** → nesmrtelnost
- **B-lymfocytu imunizovaného zvířete** → produkce Ab
- drahá příprava, ale na konci téměř neomezený zdroj Ab
- specifické pouze k jednomu epitopu



Příprava polyklonálních Ab

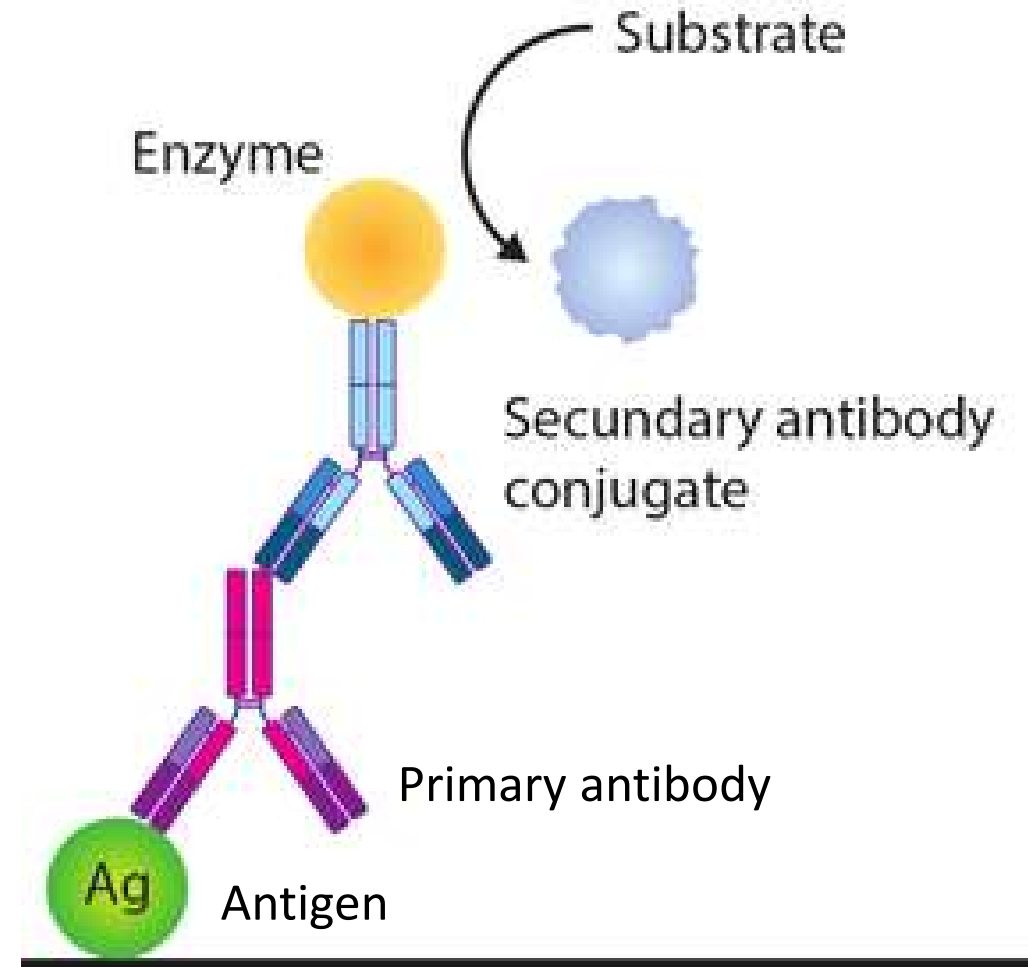
Získávají se ze séra imunizovaných laboratorních zvířat



- relativně levná a rychlé příprava
- reagují s více epitopy

Sendvičové uspořádání Ab

- **primární Ab** se váže na specifický epitop antigenu
- **značená sekundární Ab** se váže na primární protilátku
- výhoda – výroba drahých značených Ab pouze proti malému počtu primárních Ab (anti-myší IgG, anti-králičí IgG,...)



Typy značení sekundární Ab

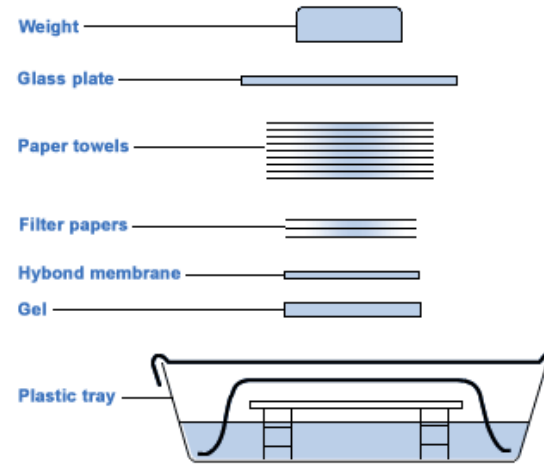
- radioaktivně
- křenová peroxidáza (horseradish peroxidase – HRP)
- alkalická fosfatáza
- biotin
- fluorescenční značka

Imunobloting

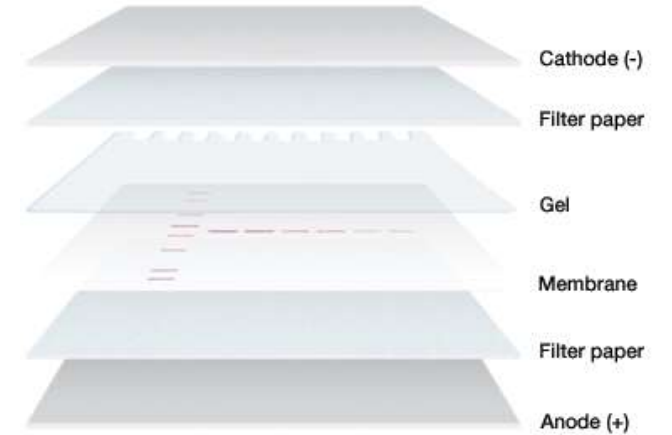
- **rozdělení proteinů** daného vzorku gelovou elektroforézou
- **přenos** proteinů na membránu („westernblotting“ - přesávka)
- **inkubace membrány** se specifickou protilátkou
- **inkubace membrány** se sekundární značenou protilátkou
- **detekce** navázané **protilátky**

Způsoby přenosu („blotingu“)

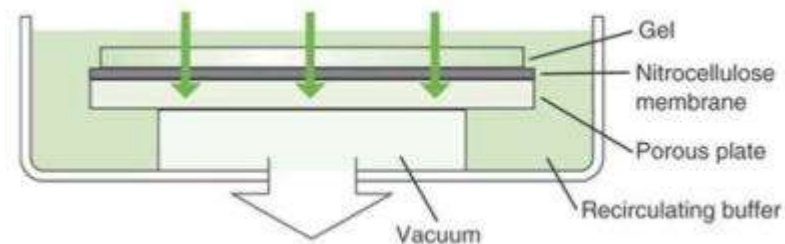
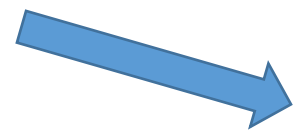
- kapilární přenos



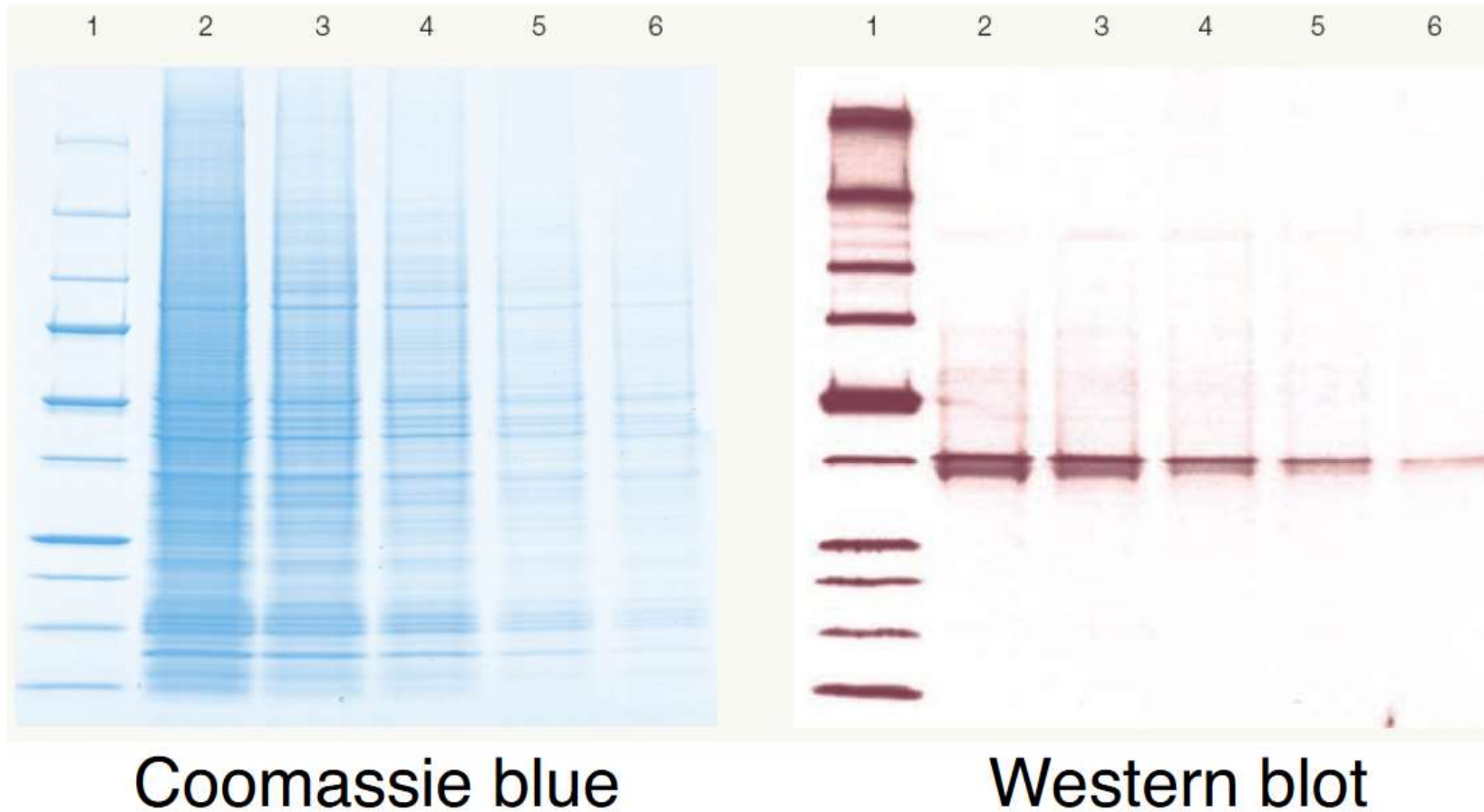
- elektroforetický přenos



- vakuový přenos



Výsledek Westernova přenosu

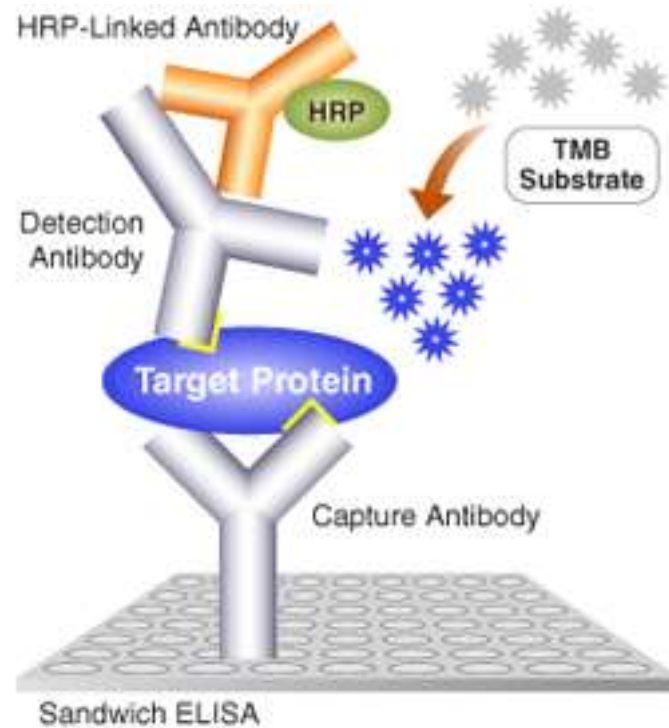


Sample: HeLa cell lysate.

Antibody: Specific for human CDK7 protein

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Využívá 2 Ab proti jednomu proteinu (2 různé epitopy), jedna Ab je vázaná na nosiči – nejčastěji na stěně reakční nádoby



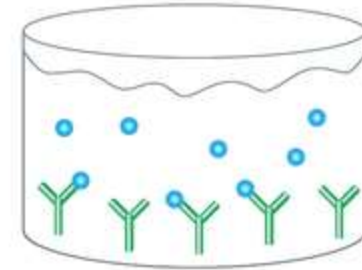
ELISA

- vysoká citlivost – pg/ml => potřeba malého množství vzorků
- možnost využití poloautomatických systémů

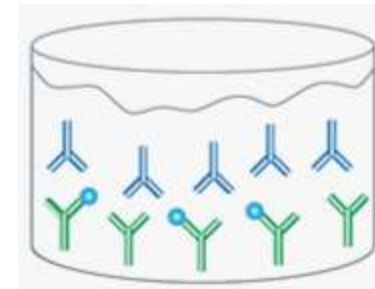


Provedení ELISA

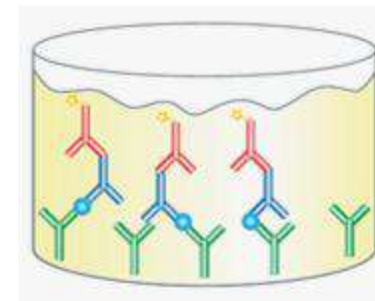
Vazba proteinu na 1. Ab



Promytí a vazba 2. Ab na protein

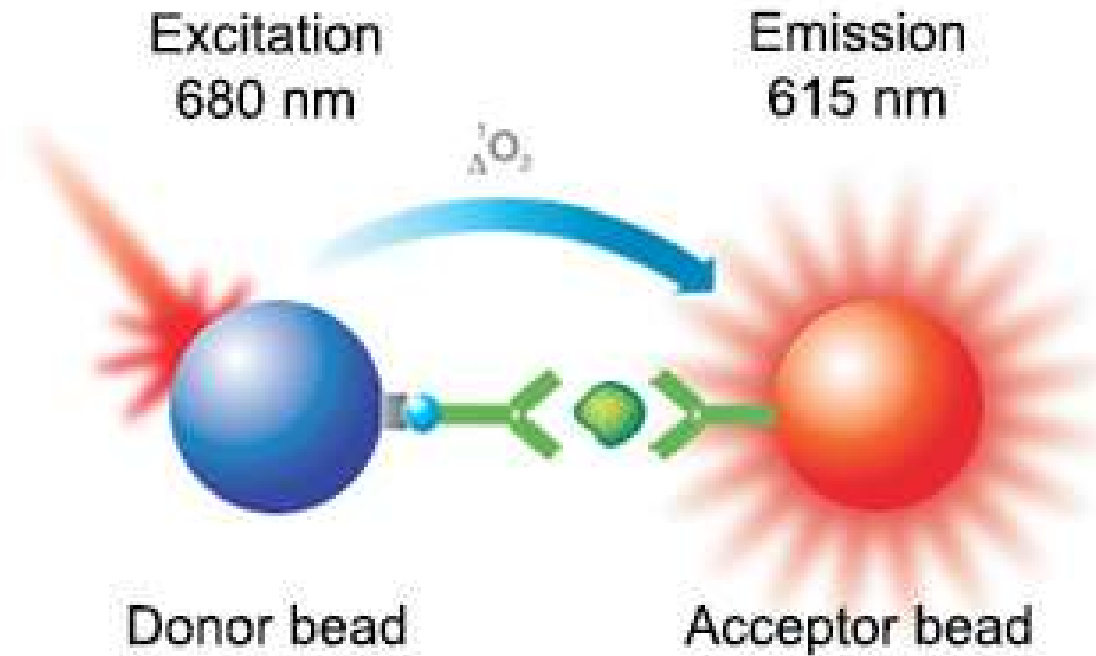


Promytí a detekce 2. Ab



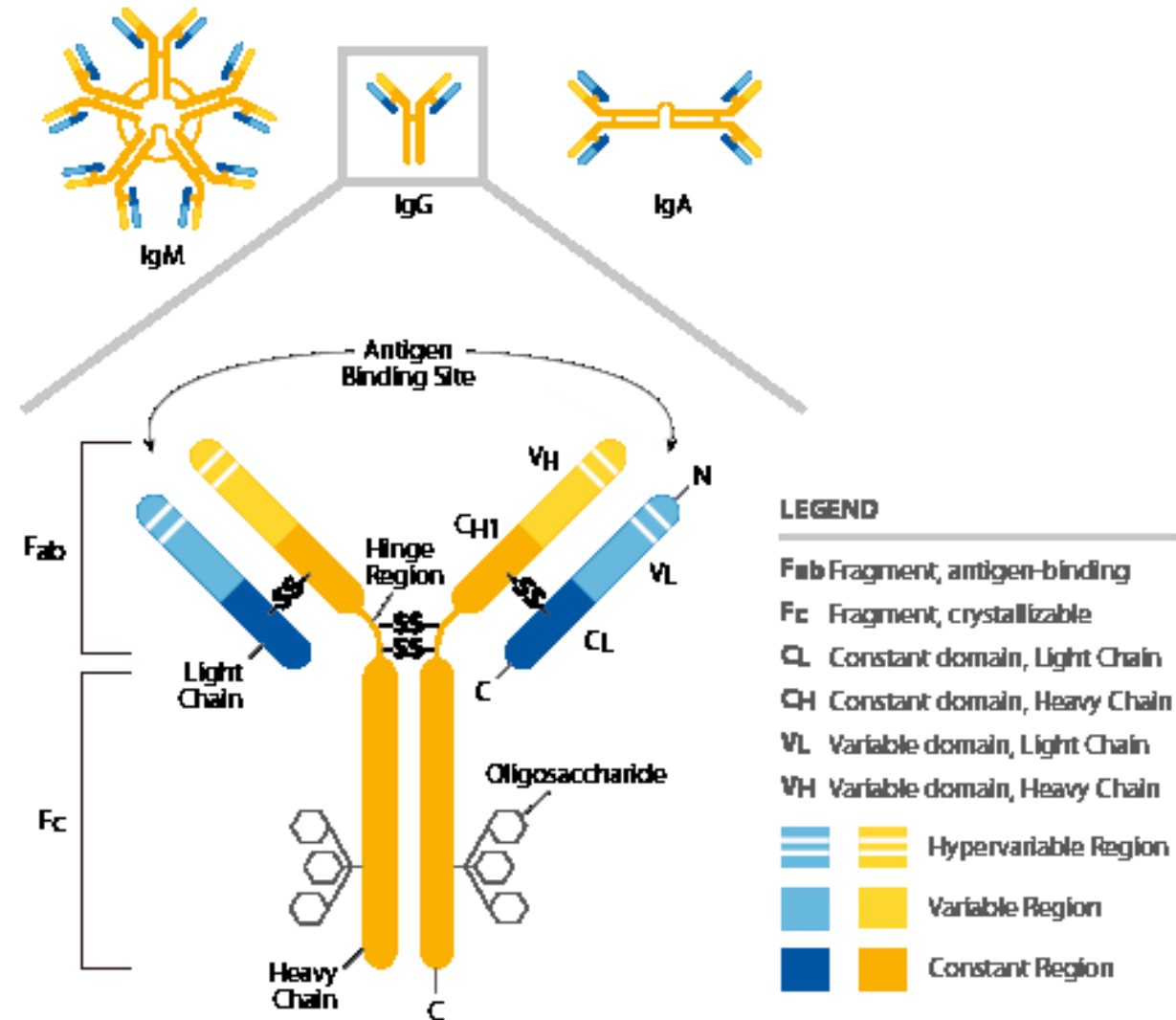
AlphaLISA

- modifikace ELISA
- „ELISA v roztoku“



Imunoprecipitace

- technika izolace specifických proteinů z proteinových směsí prostřednictvím protilátek
- protilátky jsou v komplexu se svými antigeny odděleny od ostatních molekul pomocí proteinů A nebo G (zdroj bakterie), které vážou imunoglobuliny a současně jsou imobilizovány na pevném podkladu („beads“)
- proteiny A a G se vážou na oblast Fc těžkých řetězců
- oblast Fab je stále k dispozici pro vazbu antigenu



Využití imunoprecipitace

Přímá

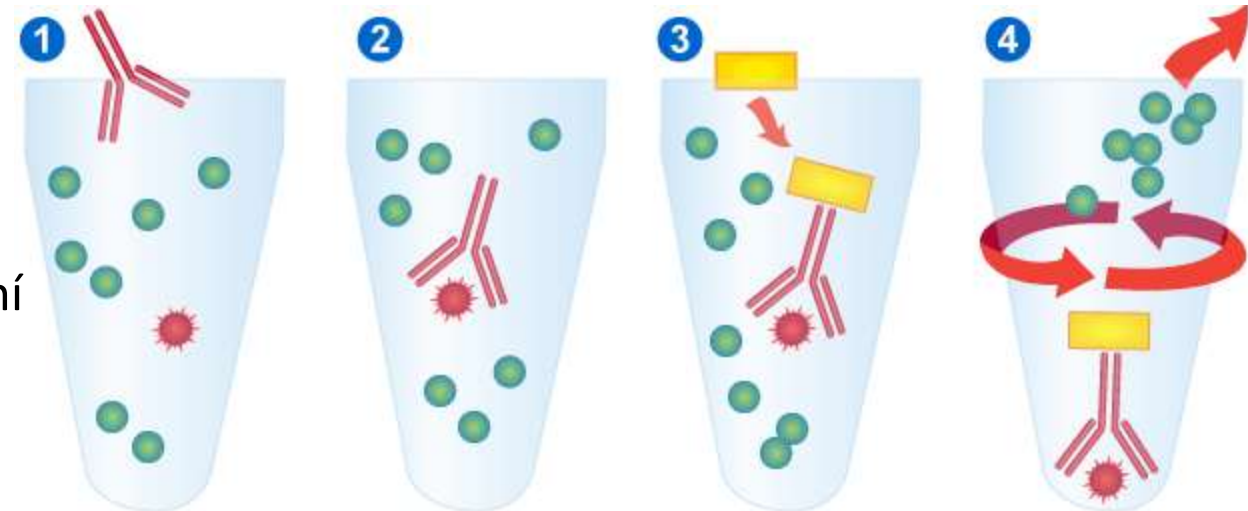
- protilátka je imobilizována na pevném podkladu (např. paramagnetických nebo agarózových/nemagnetických kuličkách), váže antigen a vysráží jej ze směsi

Nepřímá

- protilátka je volně rozpustná, váže antigen ze směsi, následně jsou přidány kuličky pokryté proteinem A nebo G a dojde k vysrážení antigenu

Postup:

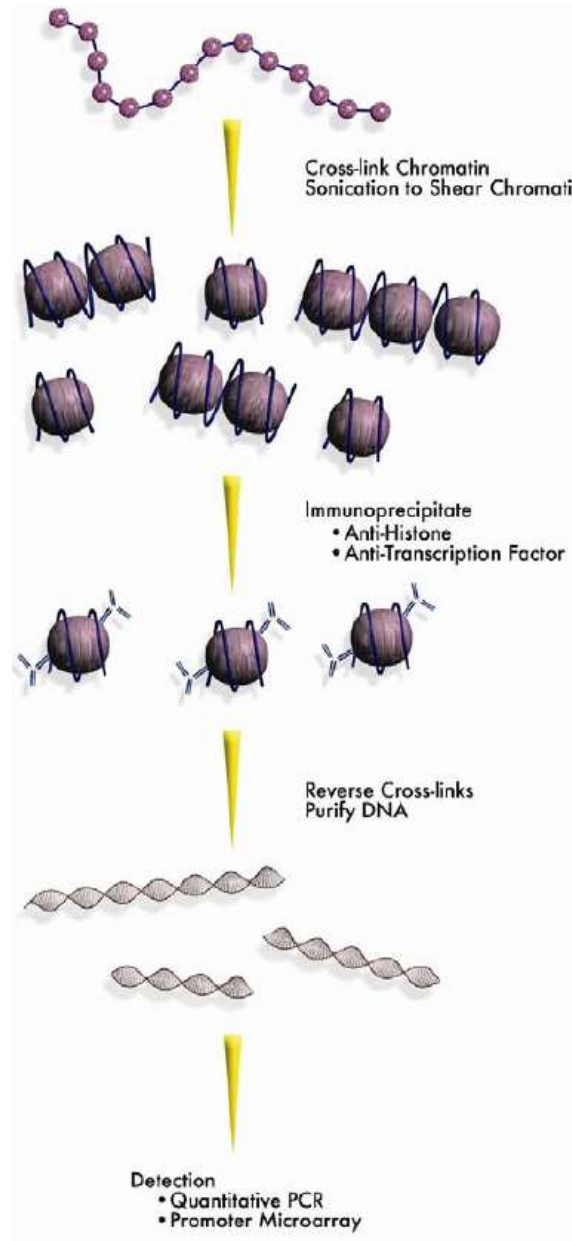
- lýze buněk
- inkubace buněčných extraktů s protilátkou
- precipitace
- varem se cílové proteiny oddělí od imunoglobulinů a kuliček
- elektroforéza, western



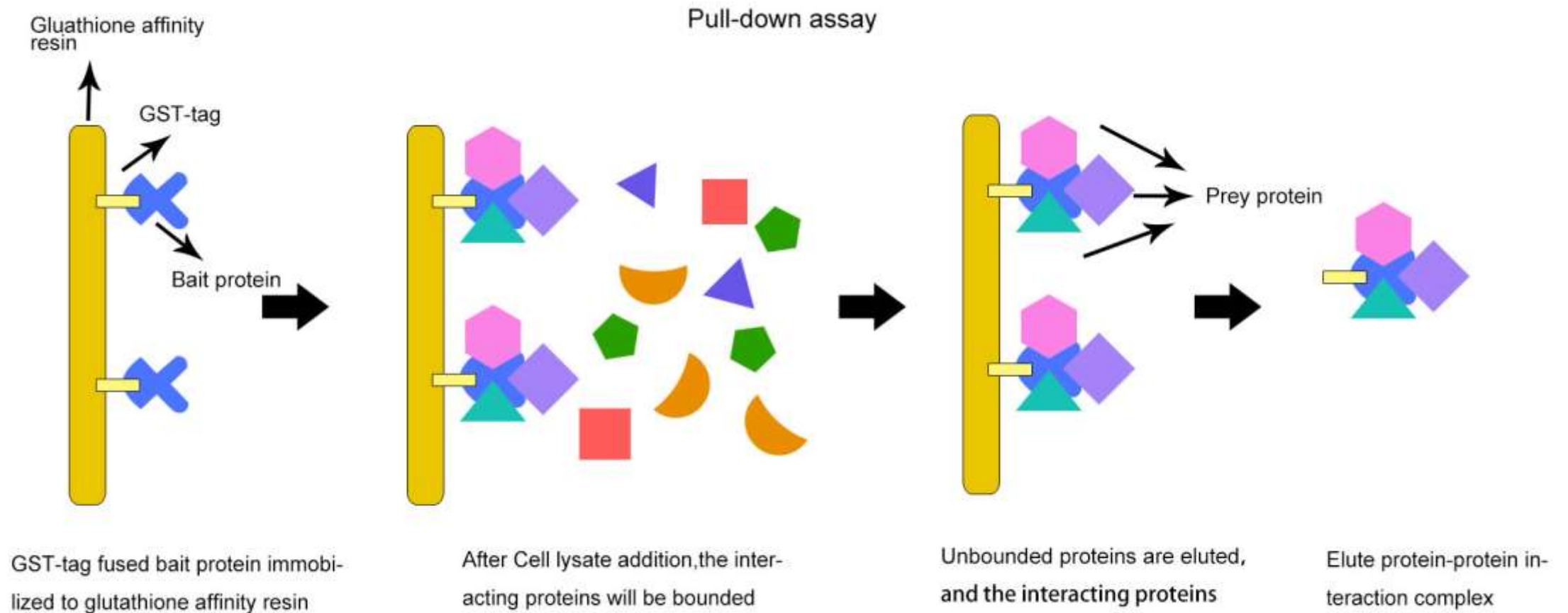
- 1** Suitable antibody is added.
- 2** Antibody binds to protein of interest.
- 3** Protein A or G added to make antibody-protein complexes insoluble.
- 4** Centrifugation of solution pellets antibody-protein complex. Removal of supernatant and washing.

Detekce DNA/RNA vazebných míst

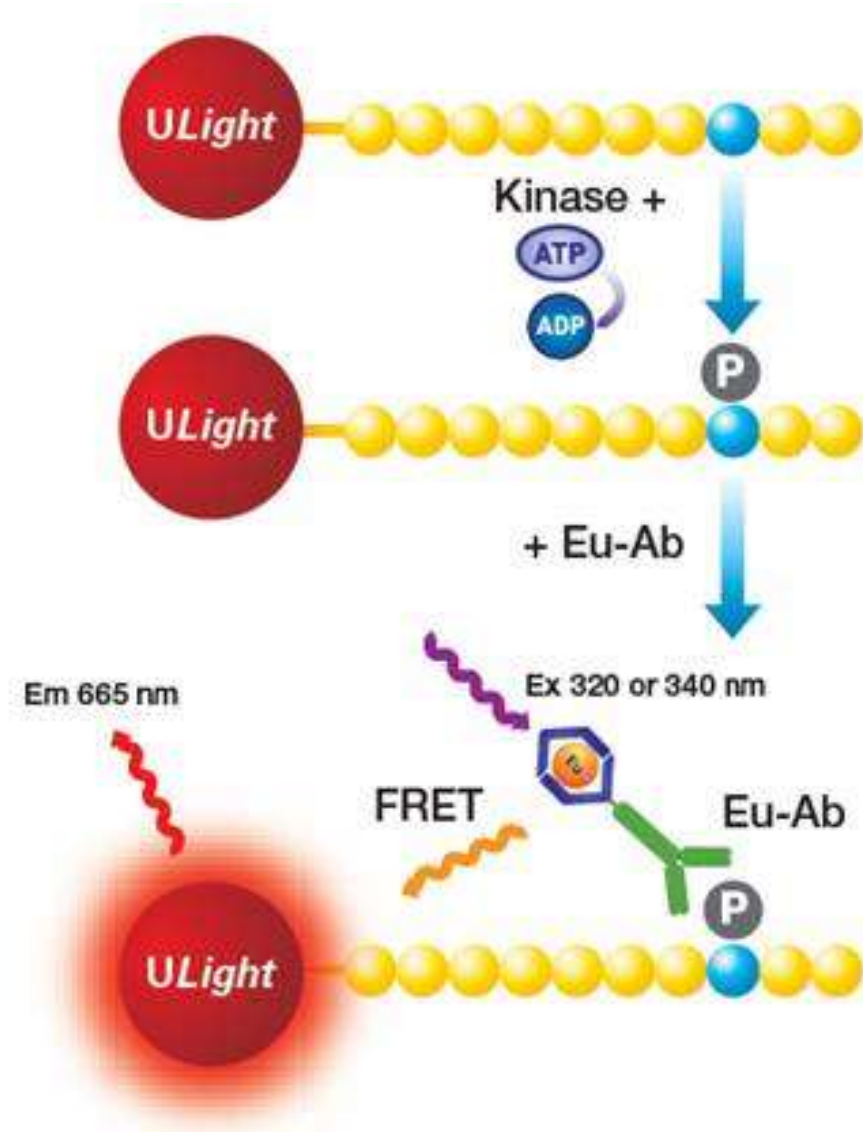
(např. ChIP =
Chromatin Immunoprecipitation)



Izolace specifických proteinů (tzv. pull-down)



Měření aktivity specifických proteinů (např. kinázové assaye)

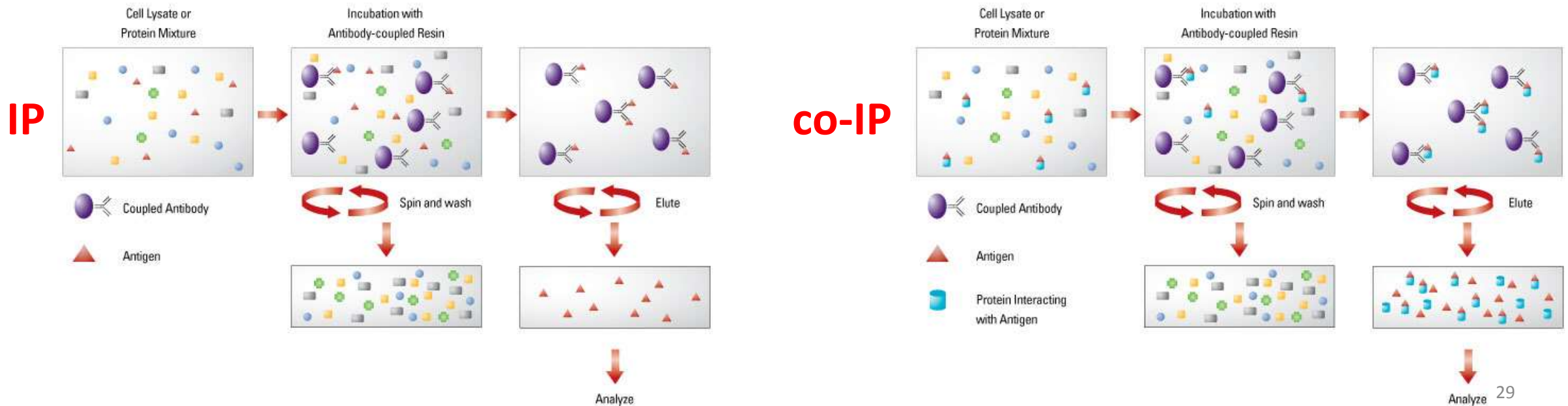


Použití imunoprecipitace pro studium meziproteinových interakcí

technika kombinující imunoprecipitaci za nativních podmínek a westernový přenos („co-immunoprecipitation“)

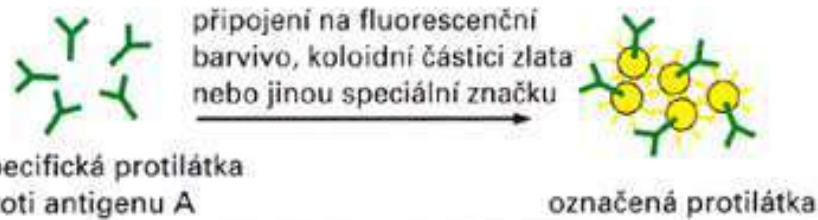
Postup:

- precipitace cílového proteinu z buněčných extraktů protilátkou za takových podmínek, které neničí vazby mezi proteiny
- cílový protein se precipituje v komplexu se svými přirozenými partnery
- purifikované komplexy se denaturují a podrobí SDS-PAGE
- přítomnost současně precipitovaných partnerských proteinů se stanoví westernovým přenosem

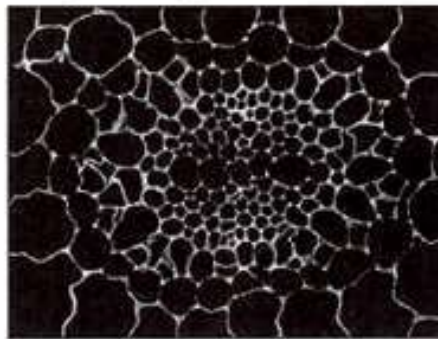


Imunohistochemie

- určuje, ve kterých buňkách je daný protein přítomen (obdoba hybridizace nukleových kyselin *in situ*)
- určuje, ve které části buňky je daný protein přítomen (membránový, cytoplazmatický, jaderný) – lokalizace naznačuje funkci
- buňky se fixují, penetruje se membrána a inkubují se s konkrétní Ab



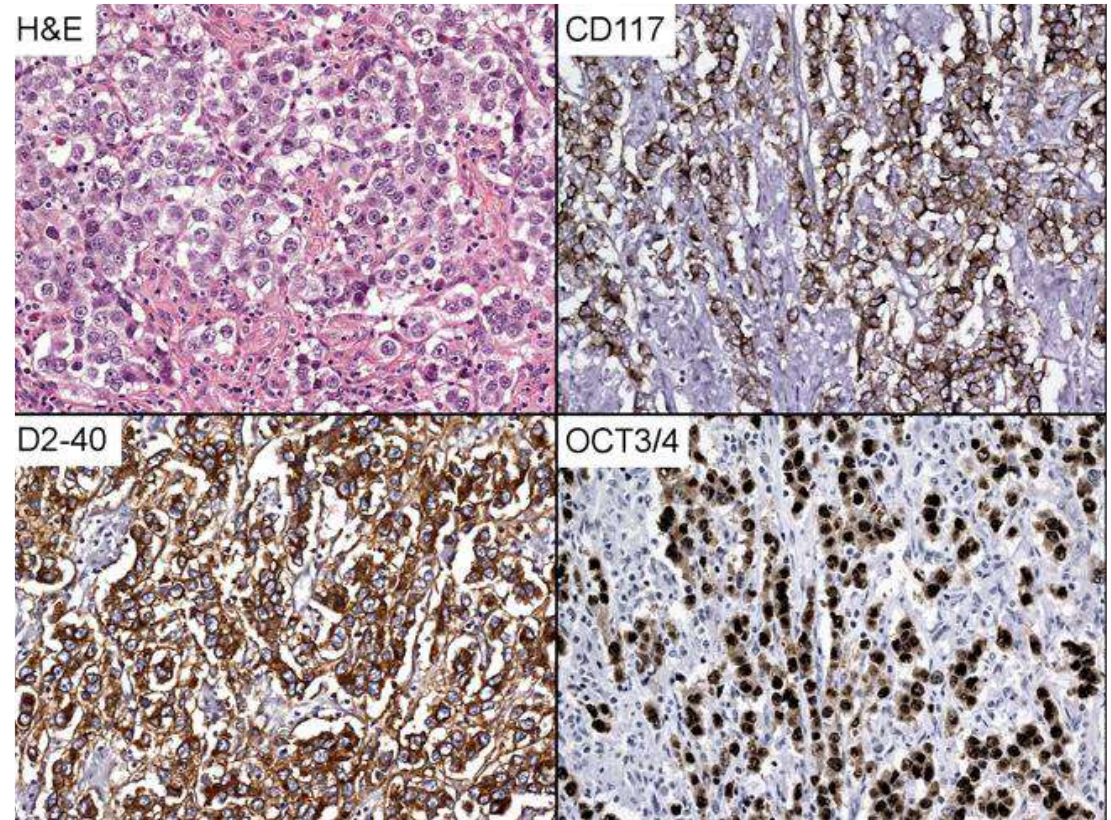
Mikroskopická detekce



Fluoreskující protilátka váže antigen A ve tkáni a lze ji detegovat ve světelném mikroskopu. Antigenem je tu pektin v rostlinných buňkách.



Zlatem označená protilátka se váže na antigen A ve tkáni a lze ji odhalit v elektronovém mikroskopu. Antigenem je opět pektin ve stěně rostlinné buňky.



Izoelektrická fokusace

- varianta elektroforézy, kde je podpůrným médiem polyakrylamidový gel obsahující směs **amfolytů**

Amfolyty:

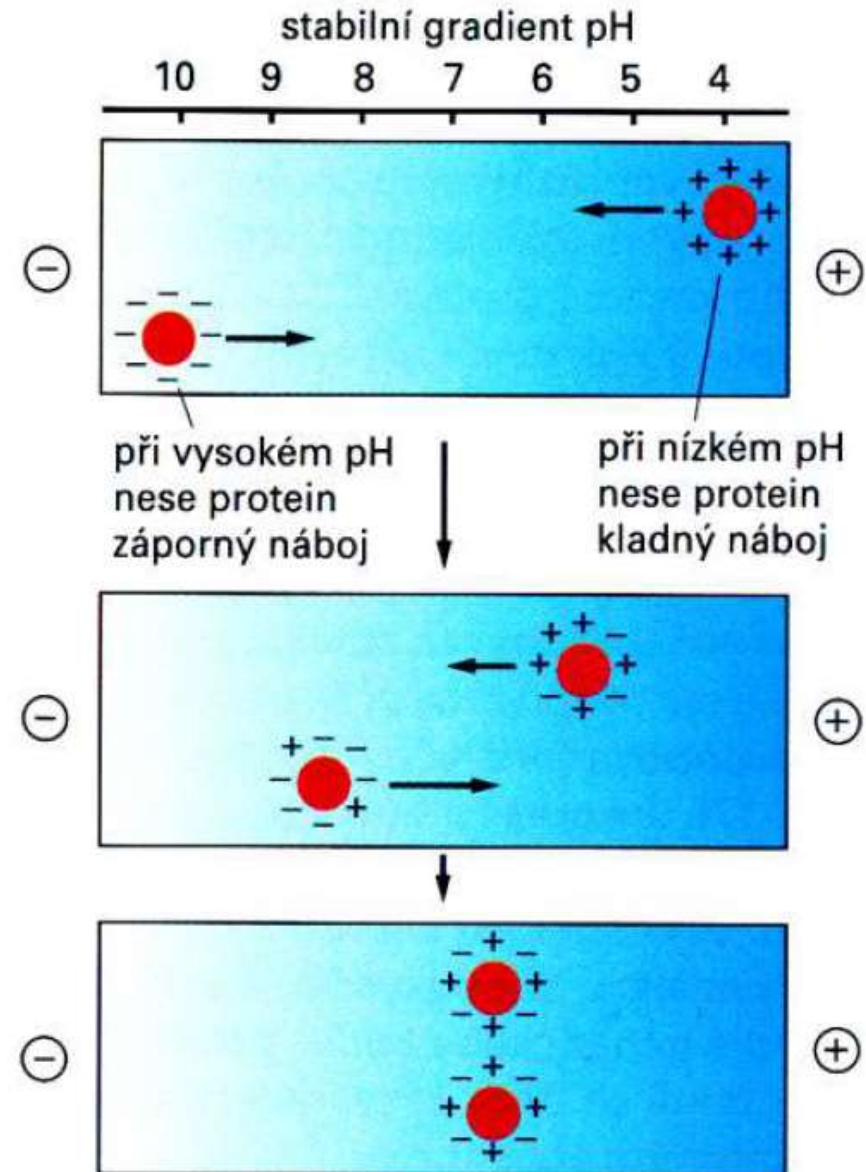
- polymery o nízké molekulové hmotnosti, které mají různé poměry pozitivně nabitých aminoskupin a negativně nabitých karboxylových skupin
- při elektroforéze se amfolyty rovnoměrně rozdělují v gelu podle náboje a tak v něm vytvářejí gradient pH

Princip:

- proteiny se pohybují gelem s velkými póry (nenastává efekt síta) a jsou vystaveny gradientu pH
- změnou pH se mění iontový náboj, který proteiny nesou
- protein se dostane do oblasti takového pH, při kterém nemá žádný náboj (**je v izoelektrickém bodu**) a jeho pohyb se zastaví
- protein je soustředěn do velmi ostrého proužku
- používá se jako první krok dvourozměrné elektroforézy

IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

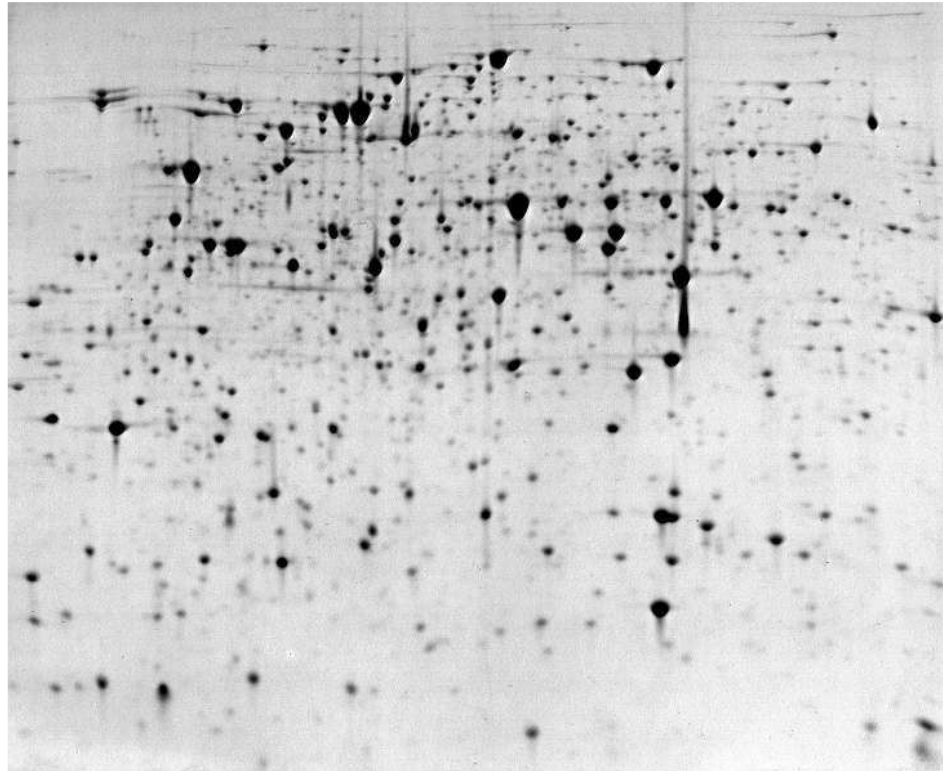
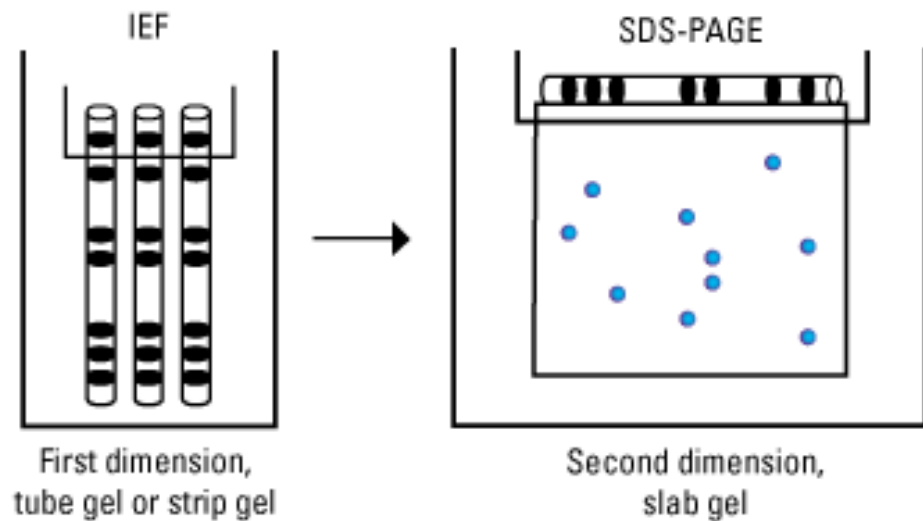
Každý protein je charakterizován svým **izoelektrickým bodem**, což je pH, při kterém protein nese žádný výsledný elektrický náboj. V tomto bodě se nebude pohybovat v elektrickém poli. Při **izoelektrické fokusaci** se proteiny dělí elektroforézou v tenké trubičce s polyakrylamidovým gelem, v níž je vytvořen gradient pH ze směsi speciálních pufrů. Každý protein se pohybuje až do vzdálenosti, která odpovídá jeho izoelektrickému bodu, a tam setrvává.



Protein v naší ukázce má izoelektrický bod při pH 6,5

Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

- pro dělení komplexních směsí proteinů, které nelze řádně rozdělit jednorozměrnou elektroforézou
- možno srovnat úplný proteom buněk vystavených různým podmínkám, buněk zdravých a nemocných, zjistit změny proteomu v průběhu buněčné diference, apod.

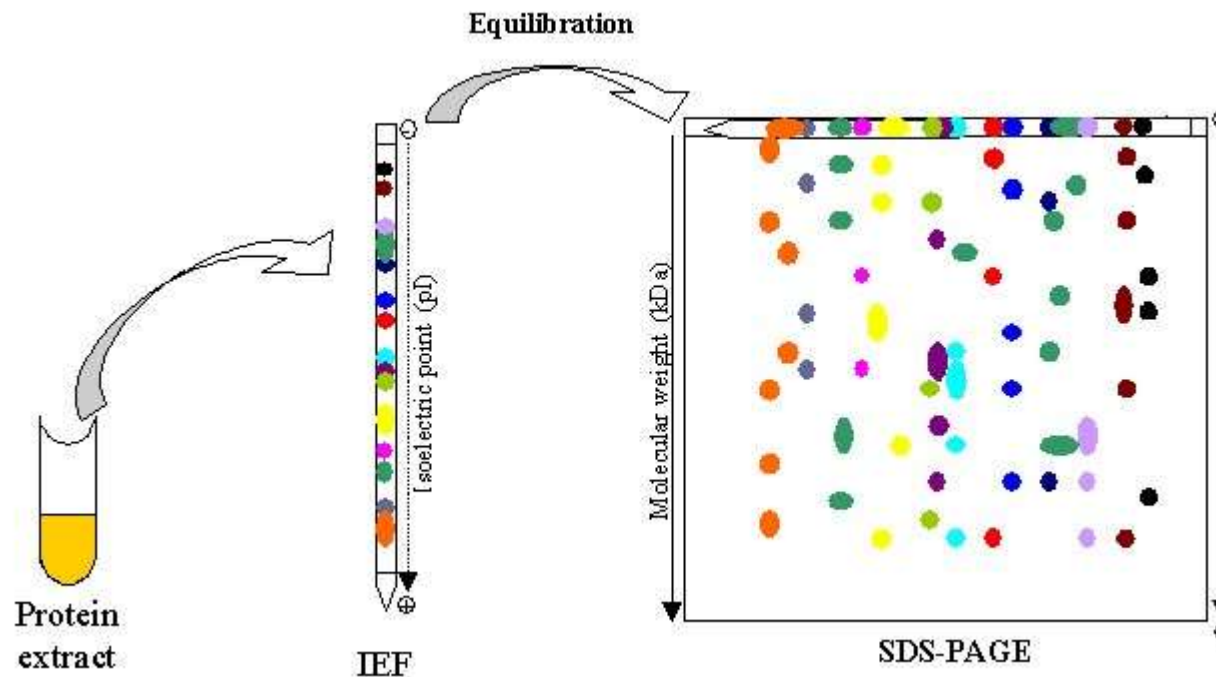


Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

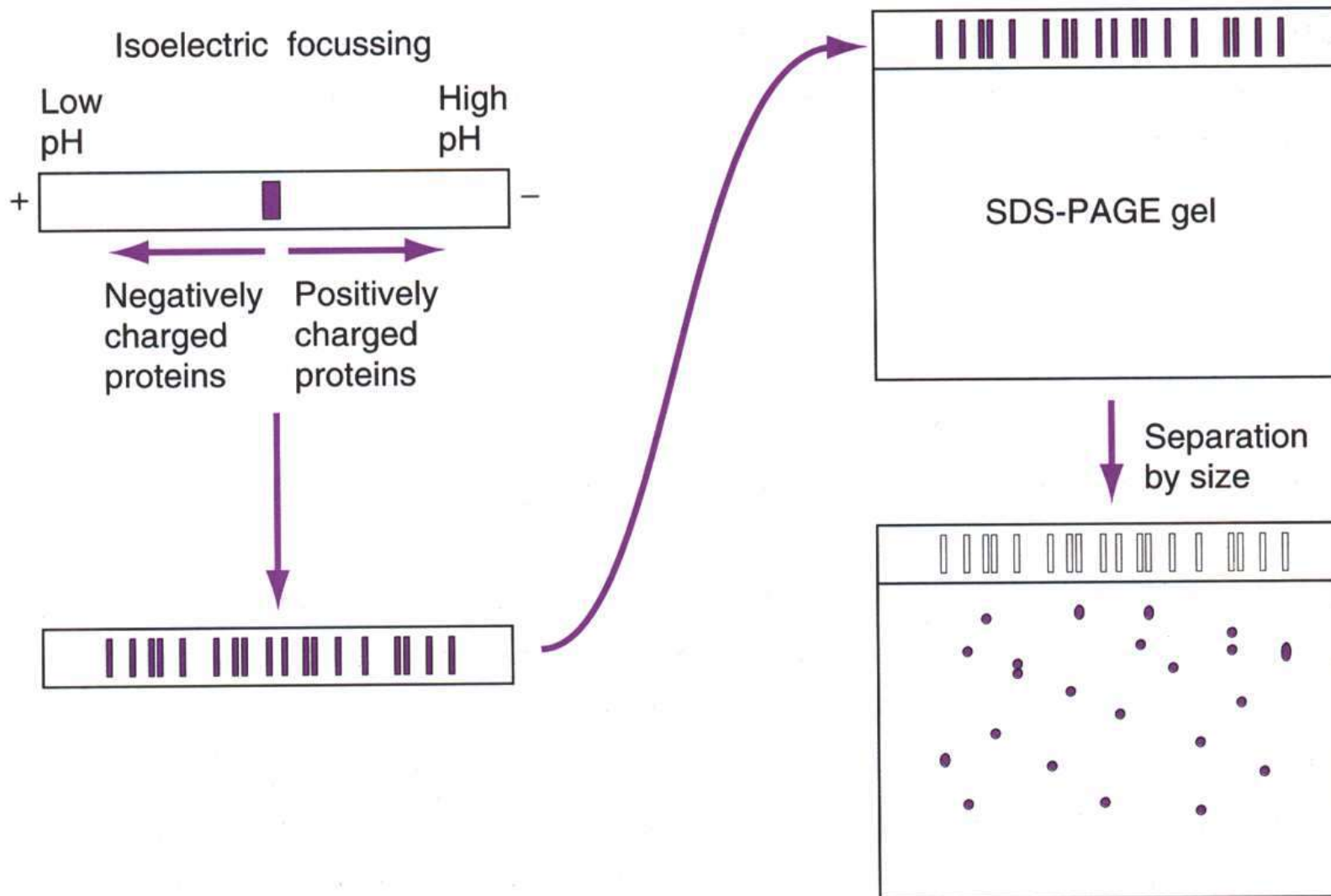
Postup:

- nativní proteiny se dělí v úzkém pásu gelu podle elektrického náboje izoelektrickou fokusací
- pruh gelu s proteiny se umístí na desku gelu a zapojí se elektrické pole jako u SDS-PAGE ve směru kolmém ke směru fokusace
- každý protein má na ploše gelu jedinečné místo

Výhoda: vysoká rozlišovací schopnost - více než 1000 proteinů/gel

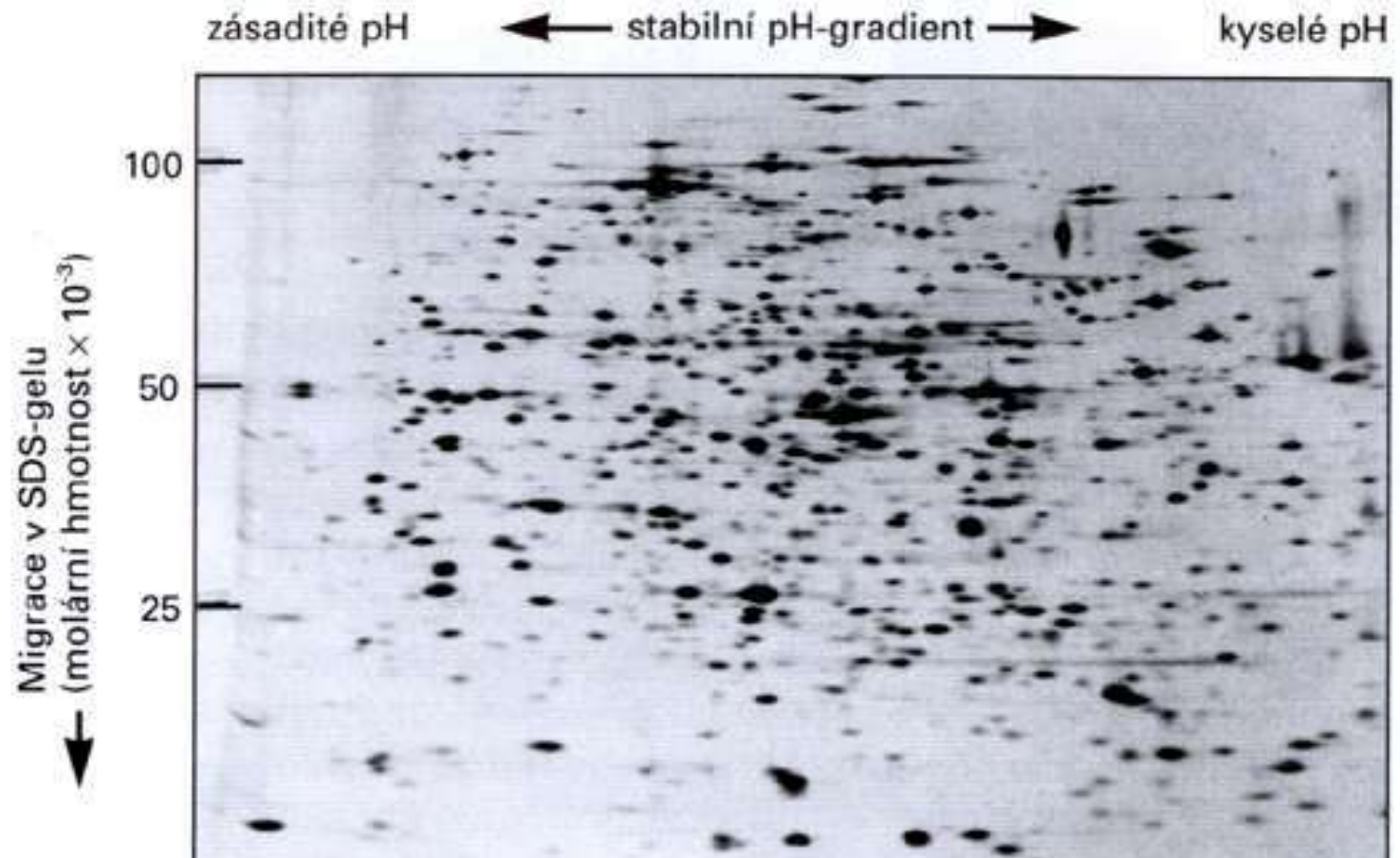


Dvourozměrná elektroforéza proteinů



DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU

Všechny proteiny
buňky bakterie
Escherichia coli jsou
rozděleny na tomto
dvourozměrném
gelu, na němž každá
skvrna odpovídá
jinému polypeptidu.
Nejdříve byl vzorek
rozdělen
izoelektrickou
fokusací zleva
doprava a pak
elektroforézou podle
své hmotnosti shora
dolů.



Interpretace 2D-elektroforetogramů

- obtížná
- výsledky nepřehledné
- nutné opakování
- analýza obrazu, software

Hlavní proteomické přístupy

dvourozměrná elektroforéza

definování proteinů rozdělených v gelu:

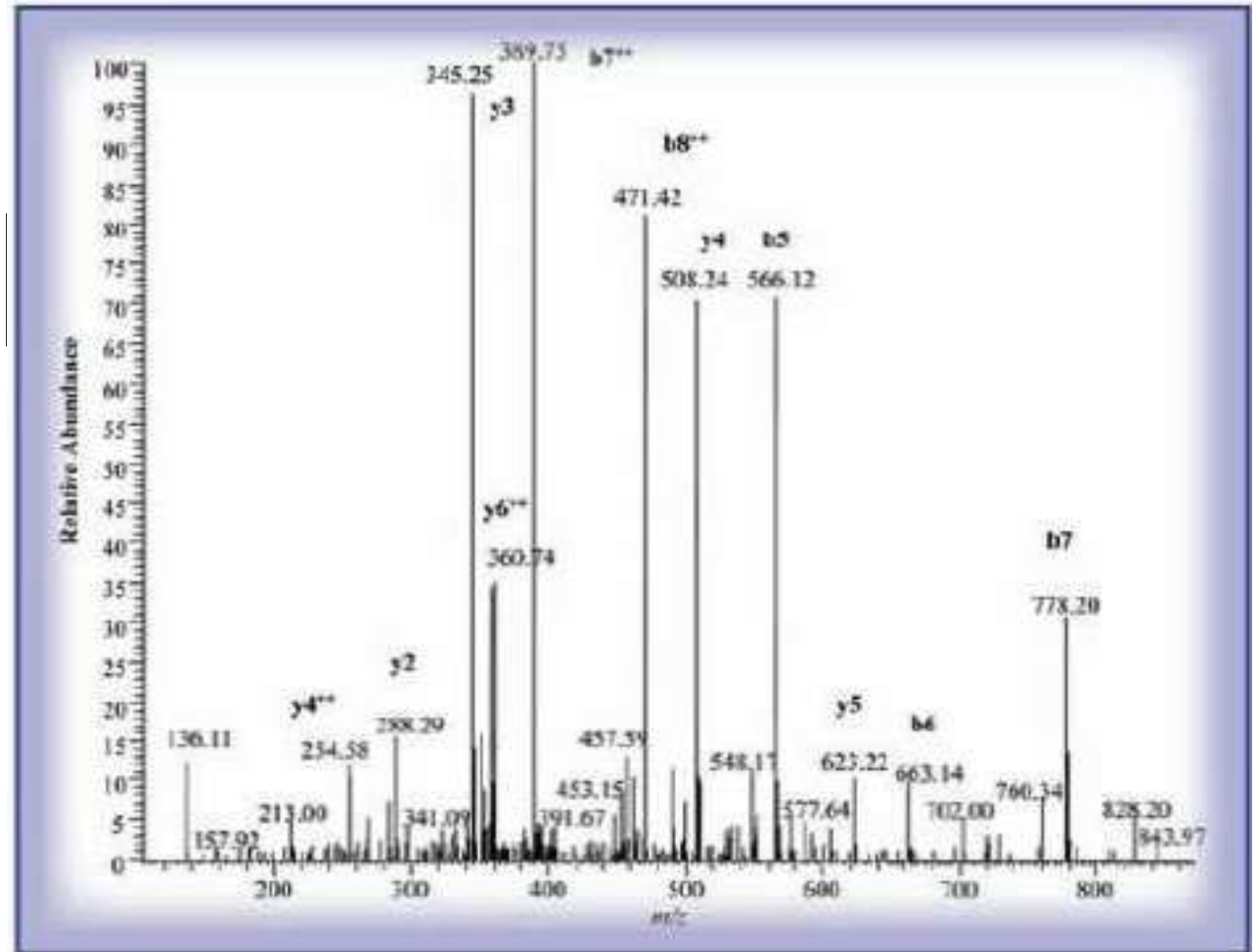
- určení sekvence aminokyselin
- westernový přenos
- štěpení eluovaných proteinů proteolytickým enzymem a stanovení molekulové hmotnosti vzniklých **peptidů hmotnostní spektrometrií, srovnání hmotnostních spekter s databázemi**



Hmotnostní spektrometrie

umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu látek
principem je tvorba pozitivně
či negativně nabitých částic
(iontů), které se rozliší na
základě poměrů jejich
hmotnosti a náboje (m/z) a
poté jsou zaznamenány
detektorem

výsledkem je hmotnostní
spektrum, které graficky
znázorňuje četnost iontů na
hodnotě m/z



Hmotnostní spektrometr

obsahuje

iontový zdroj, ve kterém dochází k ionizaci a převodu vzorku do plynné fáze

hmotnostního analyzátoru, kde probíhá separace iontů na základě poměru m/z

detektoru
vyhodnocovacího zařízení

Základní části hmotnostního spektrometru

1/ iontový zdroj - slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace), konstrukce se liší podle použité ionizační techniky

2/ hmotnostní analyzátor - slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)

3/ detektor - slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle m/z a k určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů

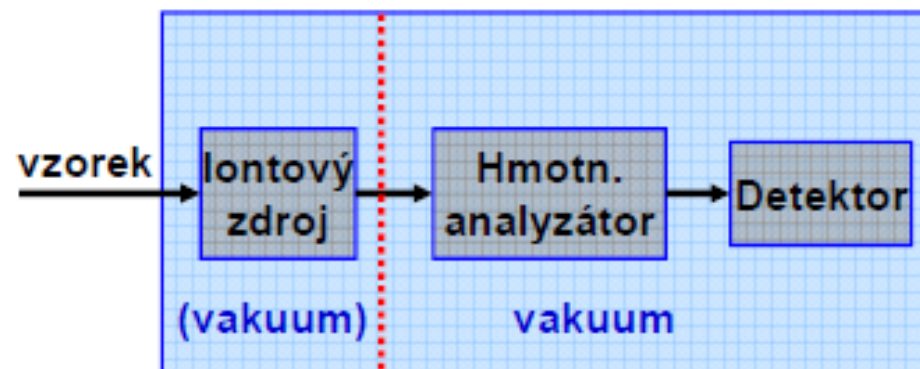
• další důležité části přístroje:

- vakuový systém

- iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů

- počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat, porovnání spekter s knihovnou

Hmotnostní spektrometr



Využití hmotnostní spektrometrie

hlavní výhoda - vysoký stupeň analytické spolehlivosti

- využití základní výzkum/medicína

diagnostika identifikace metabolických onemocnění (analýza obsahu metabolitů a malých molekul v moči a krvi)

identifikace alergenů v potravě

identifikace infekčních agens (např. bakteriálních ribozomových proteinů)

analýza bioaktivních peptidů a malých regulačních molekul (např. hormonů)

analýza toxických látek (pesticidů, bakteriálních toxinů, kontaminantů) léčiv a drog v biologických tekutinách, potravinách a životním prostředí

expresní profilování