

Patobiochemie

1. a 2. cvičení

SDS-PAGE elektroforéza
Barvení
Western blotting
Imunodetekce proteinů

Mgr. Marie Brázdová, Ph.D.

Mgr. Zuzana Bábková

Školení o bezpečnosti a ochraně zdraví a požární ochraně

Elektroforetické techniky

- 1. Elektroforéza proteinů v přítomnosti SDS (SDS-PAGE elektroforéza)**
- 2. Barvení**
- 3. Přenos proteinů na membránu (blotting)**
- 4. Imunodetekce proteinů na membráně**

Gelová elektroforéza

- Historicky první byla elektroforéza na škrobovém gelu (nebo parciálně hydrolyzovaný škrob), nyní podle účelu preferován polyakrylamidový nebo agarosový gel.
- Při přípravě gelu je možné ovlivňovat stupeň polymerace (zesíťování) - tedy velikost pórů. U gelů s velmi velkými póry lze docílit stavu podobnému volné elektroforézy v roztoku, u malých pórů se uplatňuje **efekt gelové filtrace**.

Princip elektroforézy

1. Využívá schopnosti **nabitých částic** pohybovat se v elektrickém poli.
2. Rychlost pohybu částic je závislá na **velikosti náboje** a **velikosti molekuly**.
3. Různě velké a různě nabité molekuly se pohybují odlišnou rychlostí.

Použití

- pro účely analytické i preparativní
- k separaci velkých molekul (proteiny nebo nukleové kyseliny)
- k separaci menších nabitých molekul (cukry, peptidy, nukleotidy)

Faktory ovlivňující pohyblivost látky

1. **Celkový povrchový náboj**
2. **Velikost a tvar**
3. **Koncentrace**

Dva hlavní typy gelové elektroforézy

1. Nativní gelová (nedenaturační) elektroforéza

- Probíhá **bez** denaturačních činidel.
- Proteiny i DNA migrují gelem podle svého **celkového náboje, velikosti a tvaru**.
- Podle **velikosti pórů v gelu**.

2. Denaturační elektroforéza

- Proteiny jsou denaturovány dodecylsíránem sodným (**SDS**) a **β -merkaptetanolem** (zruší disulfidické vazby).
- Pohyblivost závisí na **molekulové hmotnosti** polypeptidových řetězců.
- Vhodná pro analýzu **makromolekulárních komplexů**.
- DNA je denaturována **močovinou**.

Gelová elektroforéza

- Gely tvoří přechod mezi pevným a kapalným stavem, 99% je voda.
- Vytváří se trojrozměrná síť, póry slouží jako molekulové síto.
- Velikost pórů odpovídá velikosti proteinů a nukleových kyselin.

Agaróza (A) - síť tvořená dlouhými cukernými polymery vázanými nekovalentními vodíkovými můstky a hydrofóbními vazbami.

Akrylamid (B) – síť monomerů akrylamidu ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) spojených kovalentními příčnými vazbami pomocí N,N'-metylylenbisakrylamidu ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), vytváří dlouhé řetězce.

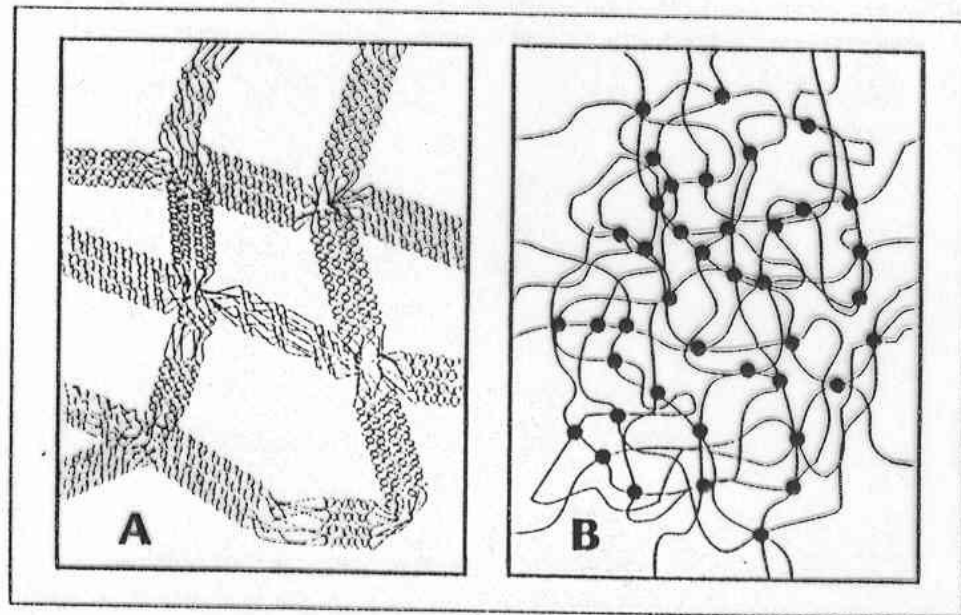


Figure 1.5. Agarose and acrylamide gels. (A) Agarose gels form by non-covalent hydrogen and hydrophobic bonds between long sugar polymers. (B) Acrylamide gels have covalent cross-links (•) between polymer strands.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE)

- patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody pro dělení makromolekul
- polyakrylamidový gel:
 - tvořen polymerací **akrylamidu a N,N'-methylenbisakrylamidu** v pufru, zahájenou volnými radikály.
 - Ty vzniknou při rozkladu **persíranu amonného**
- fyzikální vlastnosti gelu a velikost pórů dány podílem polyakrylamidu v gelu a stupněm jeho zesíťování.
- nejčastěji používané koncentrace polyakrylamidu jsou **5-15%** (přičemž koncentrace N, N'-methylebisakrylamidu je obvykle 5% celkového množství akrylamidu)

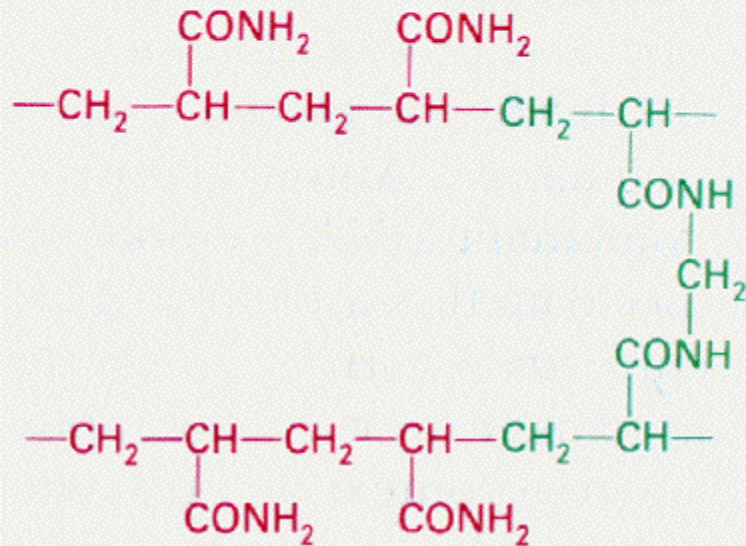
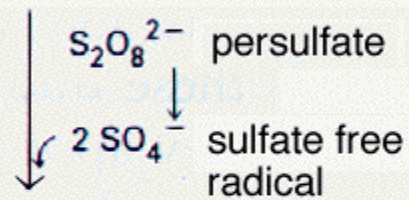
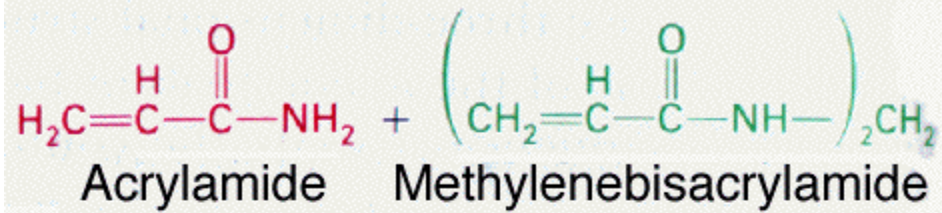
Polymerace akrylamidu

Smísením roztoku monomeru a dimeru (bis-akrylamidu). Pozor jde o látky škodlivé zdraví. **Akrylamid je karcinogenní a neurotoxický s kumulativním účinkem.**

Radikálová polymerace

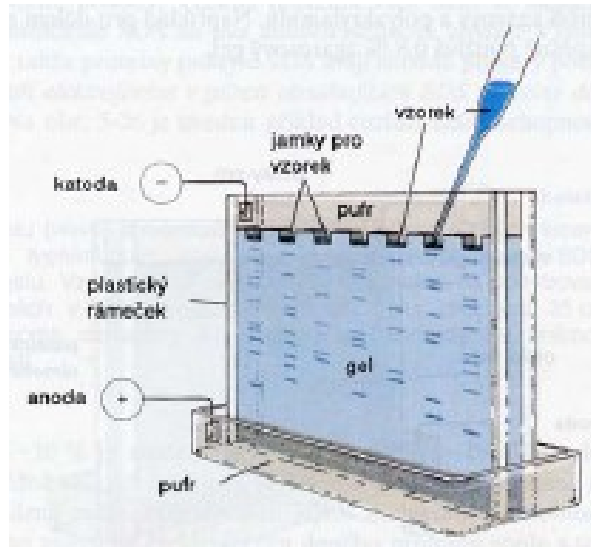
Iniciátorem reakce je **persíran amonný** (peroxodisulfát $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$) a **katalyzátorem** je **N,N,N',N'-tetramethylendiamin** (TEMED). Tyto látky lze ve funkci nahradit riboflavinem za přítomnosti světla a malého množství kyslíku. Inhibitory polymerace jsou kyslík (O_2) v nadbytku, látky s SH- skupinami.

Koncentrace **monomeru** ovlivňuje délku řetězců, obsah **dimeru** stupeň zesíťování.



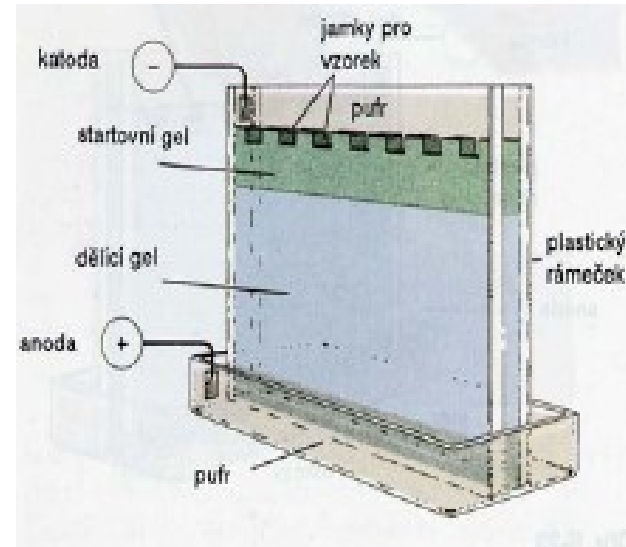
PAGE

Gelová ELFO (obyčejné)



nativní page, vazba proteinů na DNA...

Diskontinualní gelová ELFO



Dělicí gel se překryje asi 1 cm vrstvou startovního gelu o nižším pH než gel dělicí a s velkými póry. Elektrodový pufr musí obsahovat slabou kyselinu, obvykle glycin.

SDS-PAGE

- koncentrační gel (molekuly proteinu se nedělí ale zakoncentrovávají)
- separační gel

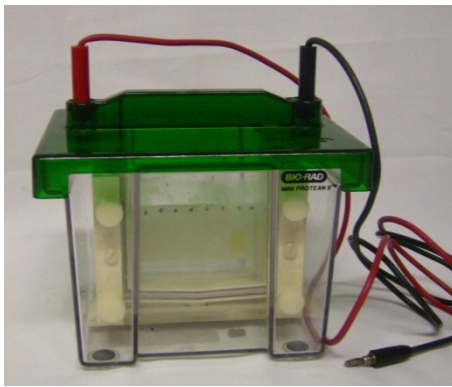
SDS-PAGE

Nejčastější elektroseparační technika pro proteiny. Provádí se v prostředí 0.1% **dodecylsulfátu sodného** (laurylsulfát, SDS), anionogenního detergentu. **Proteiny v gelu mají uniformní záporný náboj, pro separaci je důležitá jen jejich velikost.**

Vzorek proteinu se zpracuje s **tzv. vzorkovým pufrem** („sample buffer“), který mimo SDS obsahuje i redukční činidlo dithiothreitol nebo β -merkaptoethanol. Působením těchto látek dojde k rozrušení kvartérní, terciární a do značné míry i sekundární struktury.

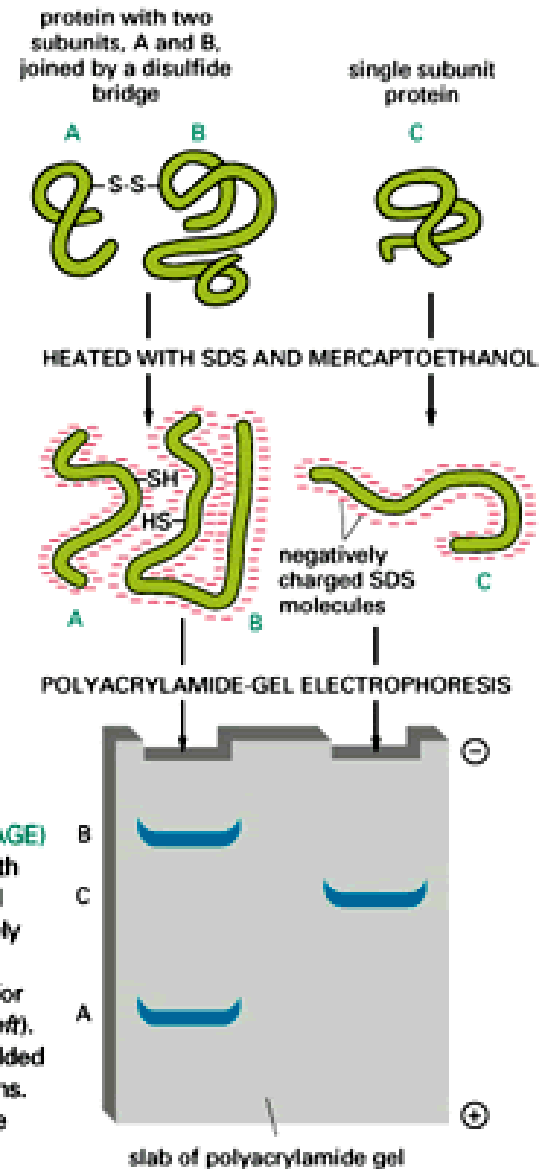
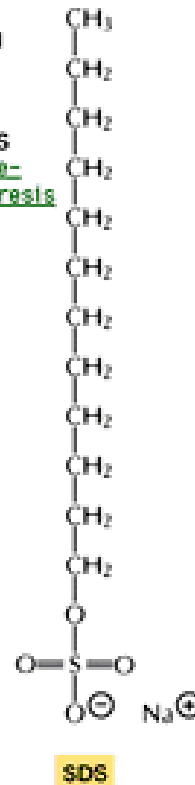
Lineární závislost (se záp. směrnici) mezi log molekulové hmotnosti a elektroforetickou mobilitou (10 - 200 kDa).

Pro vlastní odhad molekulové hmotnosti neznámého proteinového vzorku se používají komerční směsi proteinů - standardy.



- vzorek nanášen v denaturované formě, možnost nativních struktur je téměř vyloučena
- chlazení vhodné pouze z důvodu zachování ostroty bendů a pevnosti gelu (teplo, vznikající při elfo, zvyšuje difuzi)
- možnost použití hmotnostních standardů – rychlost pohybu proteinu zde závisí **POUZE** na jeho velikosti

the detergent sodium dodecyl sulfate (SDS) is used to solubilize proteins for SDS polyacrylamide-gel electrophoresis



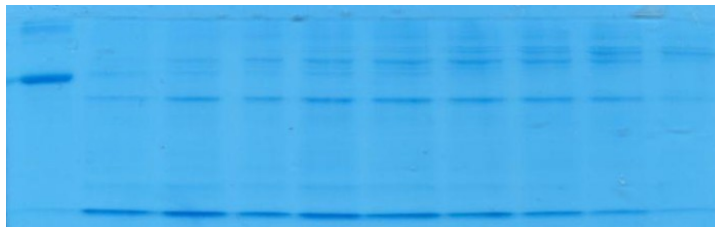
SDS polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE) Individual polypeptide chains form a complex with negatively charged molecules of sodium dodecyl sulfate (SDS) and therefore migrate as a negatively charged SDS-protein complex through a slab of porous polyacrylamide gel. The apparatus used for this electrophoresis technique is shown above (left). A reducing agent (mercaptoethanol) is usually added to break any -S-S- linkages in or between proteins. Under these conditions, proteins migrate at a rate that reflects their molecular weight.

Barvení proteinových gelů

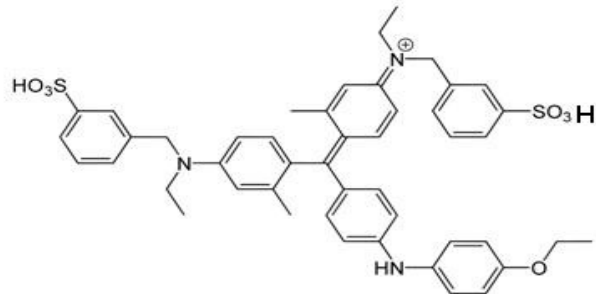
Pro vizualizaci separovaných proteinů se používají dvě techniky barvení, které se liší citlivostí a náročností provedení:

Modré barvivo Coomassie Brilliant Blue (G-250, R-250), barvení se provádí v **kyselém prostředí** (7% k. octová). Protein je tak fixován v gelové struktuře a **pozitivně nabit**, což umožňuje **vazbu barviva**, které se váže i hydrofobními interakcemi. Citlivost 0,1 mg. Odbarvování roztokem methanolu a kyseliny octové (koncentrace dle požadované rychlosti odbarvování). Tzv. **koloidní barvení** se provádí 0.08% CBB v prostředí 8% síranu amonného, 1.6% k. fosforečné a 20% (v/v) methanolu.

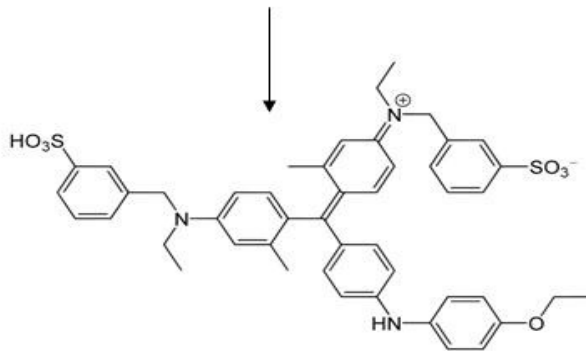
Obdobné použití má barvivo **Coomassie Violet R-150**, které se používá v prostředí 10% kyseliny fosforečné. Odbarvování se děje 3% k. fosforečnou.



Coomassie Brilliant Blue R-250 a Coomassie Violet R-150

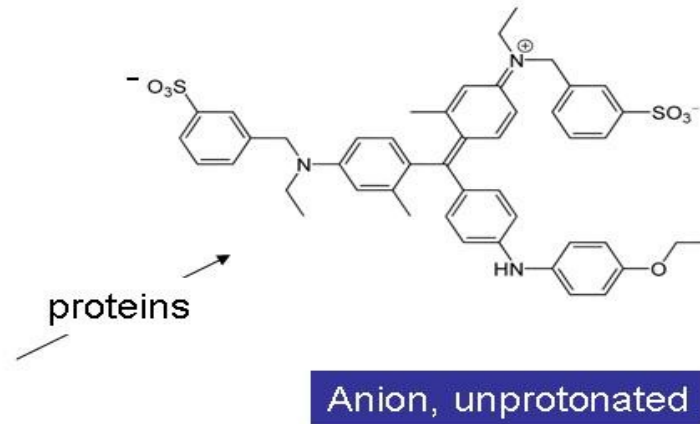


Cation, doubly protonated



Neutral, singly protonated

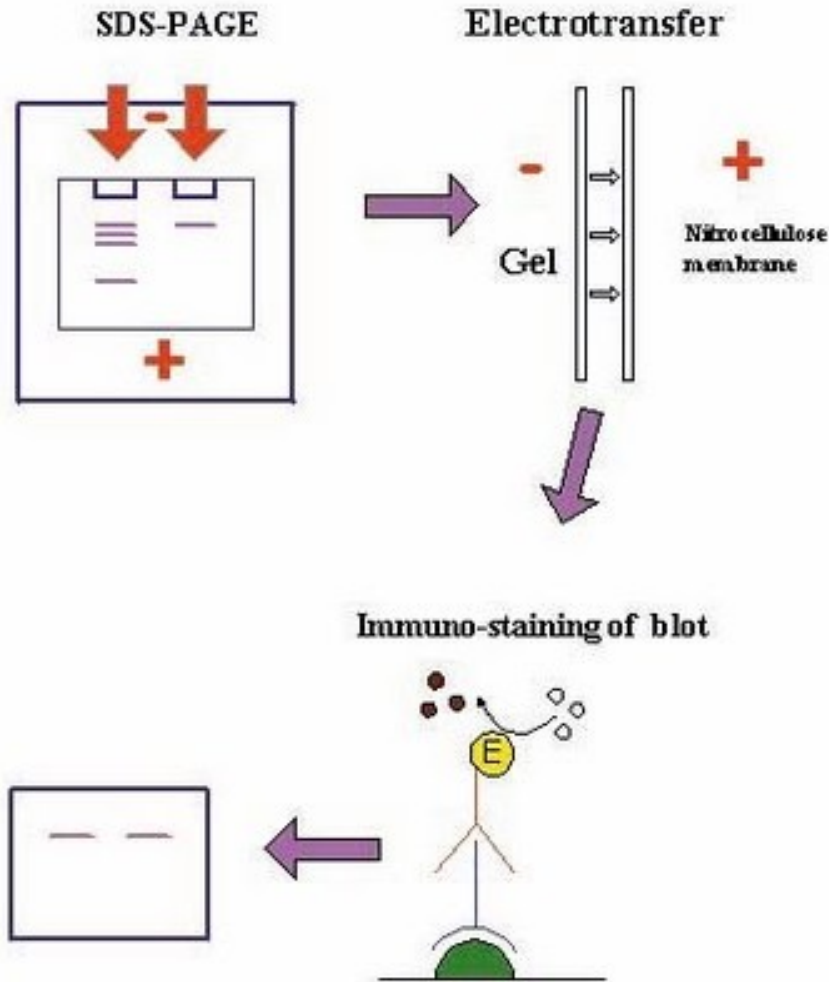
Coomassie dye changes from a red cationic form to a blue anionic form in the presence of proteins



Anion, unprotonated

basic (arginine) and aromatic amino acids residues (Compton and Jones 1985). The protein-dye complex causes a shift in the absorption maximum of the dye from 465 nm (red) to 595 nm (blue)

Western blot (imunoblot)



Technika na bázi elektroforézy a enzymové reakce

1. fáze: klasická **SDS-PAGE**

Antigen nanesen do polyakrylamidového gelu a separován v elektrickém poli dle molekulární hmotnosti proteinů antigenu.

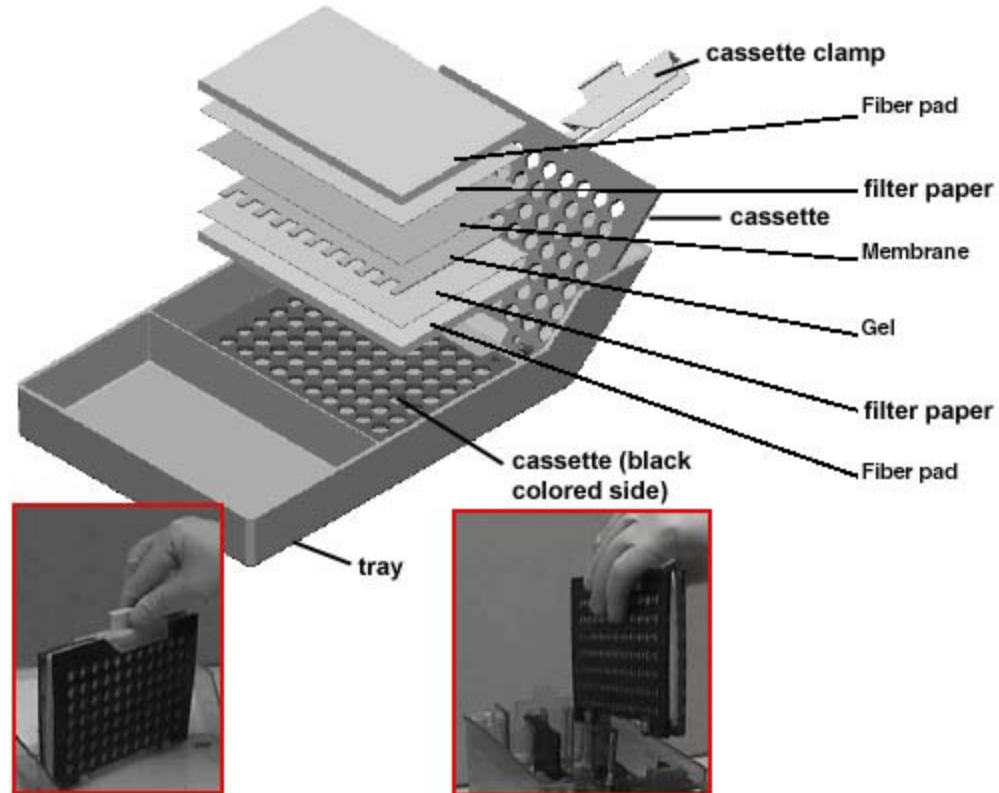
2. fáze: **blotování**

Gel z elektroforézy se následně přiloží na nitrocelulózovou membránu.

Na blotovacím zařízení dojde působením elektrického proudu k **přeblotování** proteinů z gelu do membrány.

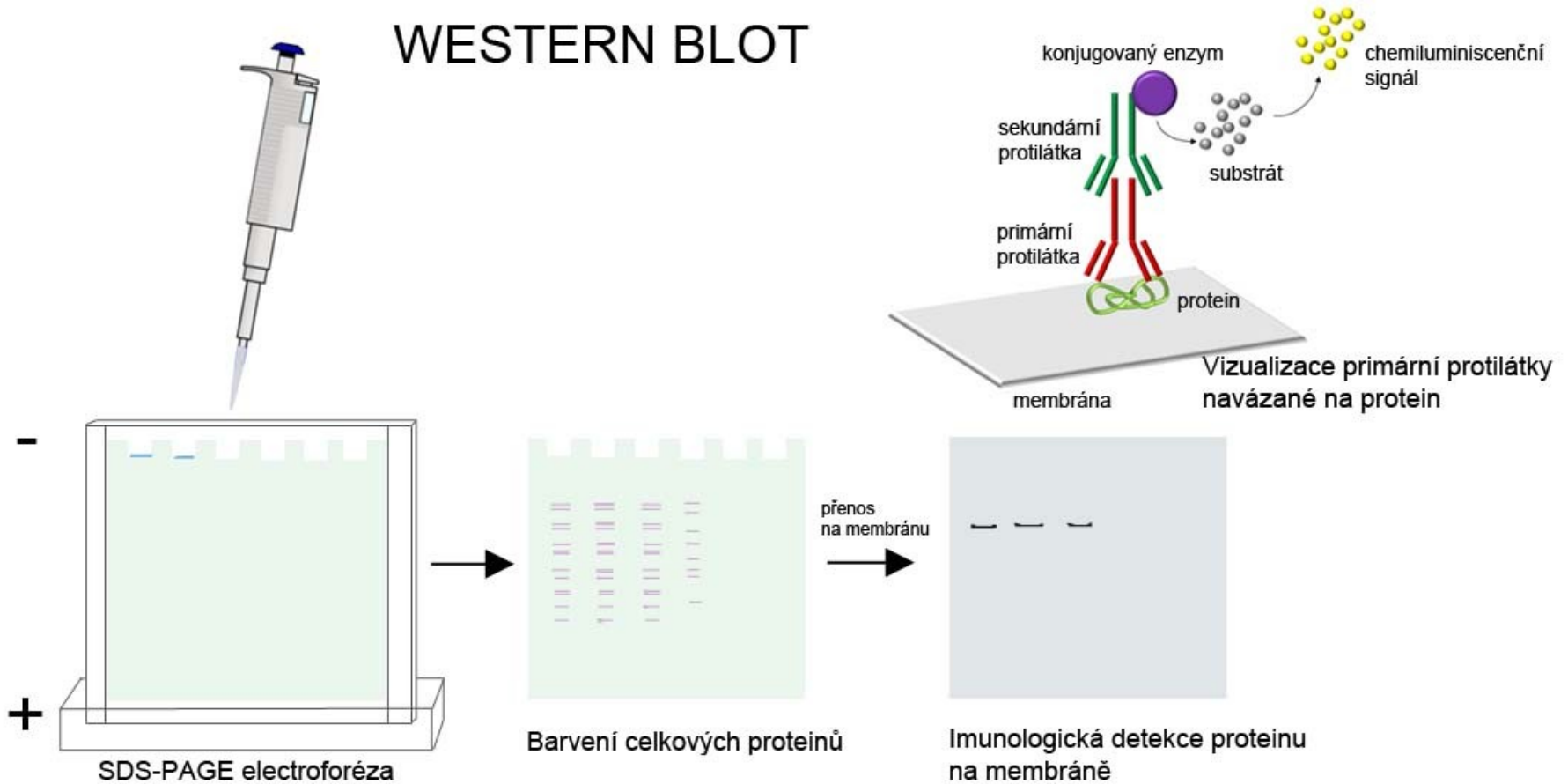
Na membráně vznikne jakoby „kopie“ proteinů separovaných na gelu.

Western blot (imunoblot)



Imunodetekce proteinů

WESTERN BLOT



Imunodetekce proteinů

- Detekci proteinů provádíme **imunochemickými metodami**
- Postup
 - **vysycení** volných vazebných míst
 - inkubace v **primární protilátce** (silná specificita vůči studovanému proteinu)
 - **promytí**
 - inkubace v **sekundární protilátce** konjugované s enzymem (druhově specifická – dle druhu organismu, ve kterém byla produkována)
 - **promytí**
 - **imunodetekce**



Imunodetekce proteinů

- Imunochemická detekce - využití reakce **antigen-protilátka**
- **Antigeny** jsou látky, které organismus rozpoznává jako cizorodé.
 - Jejich přítomnost stimuluje tvorbu protilátek.
- Každý antigen obsahuje antigenní determinanty (**epitopy**) tvořené 5-8 aminokyselinami.
 - Schopnost protilátek rozlišovat i malé rozdíly epitopů je základem specifity imunitních reakcí.

Imunodetekce proteinů

- **Protilátky** patří mezi **imunoglobuliny** a jsou produkovány jako součást imunitní odpovědi.
 - třídy: IgG, IgM, IgA, IgE a IgD
- Protilátky jsou charakterizovány
 - **afinitou**
 - síla vazby protilátky s jednou vazebnou determinantou antigenu
 - **aviditou**
 - síla vazby mezi protilátkou a celou molekulou antigenu (většina antigenů je multivalentních, tzn. má více vazebných determinant pro různé protilátky)
 - **specifitou**
 - protilátky jeví minimální interferenci s látkami, pro které není protilátka určena
- Protilátky mohou být polyklonální či monoklonální.

Imunodetekce proteinů

- **Polyklonální protilátky** se připravují imunizací zvířat, kdy se zvířeti aplikuje příslušný antigen.
 - Polyklonální protilátka může obecně reagovat s **několika antigenními determinantami**.
 - Výhodou je vyšší citlivost a avidita.
- Nevýhodou je individuální imunitní odpověď a tedy i **nereprodukovatelnost**.
- **Monoklonální protilátky** nejsou produkovány organismem, ale **buněčnou kulturou**.
 - Myš je imunizována antigenem, následně se ze sleziny získají lymfocyty produkující protilátky. Klonováním lze vybrat buňky, které produkují protilátky proti konkrétní antigenní determinantě antigenu. Takto syntetizovaná protilátka obsahuje jediný typ vazebného místa, a tedy rozeznává **jedinou antigenní determinantu**. Monoklonální protilátky se vyznačují **vyšší čistotou a specifitou**, jsou reprodukovatelné, mají však nižší afinitu.

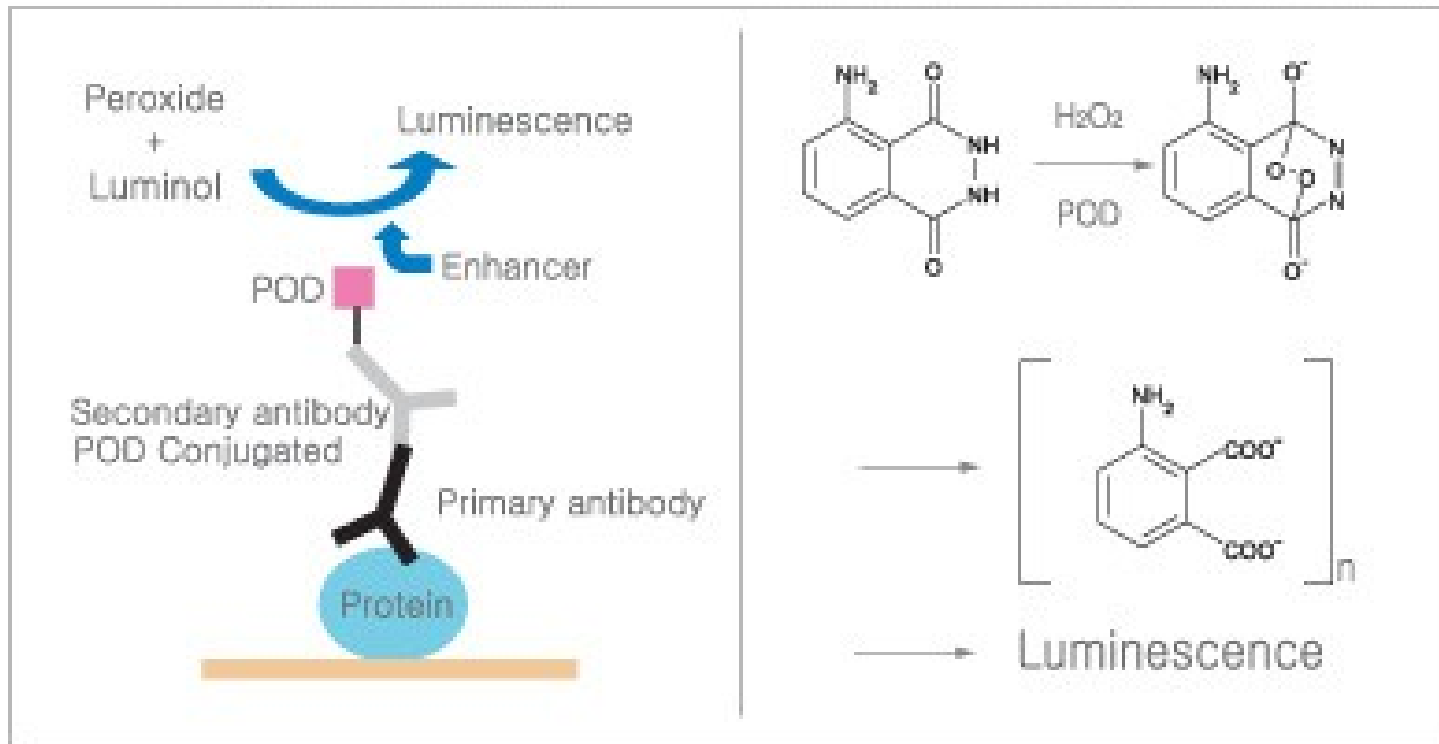
Imunodetekce proteinů

- specifické **primární protilátky** proti tomuto proteinu
 - DO1, která specificky rozpoznává N-konec přirozené i mutantní formy proteinu p53. Jedná se o **myší monoklonální protilátku** třídy IgG.
- **sekundární protilátky konjugované s reportérovým enzymem.**
 - Sekundární protilátka je produkována imunizací pomocí dané primární protilátky. Imunizace probíhá v jiném druhu hostitelského organismu, než u primární protilátky. V našem případě byla protilátka DO1 produkována myší, proto **sekundární polyklonální protilátka** (anti-mouse IgG) byla produkována kozou, které byla injikována primární protilátka.
- Sekundární protilátka se tedy váže na primární protilátku a je konjugována s reportérovým enzymem umožňujícím detekci, v našem případě **křenovou peroxidázou a alkalická fosfatáza.**

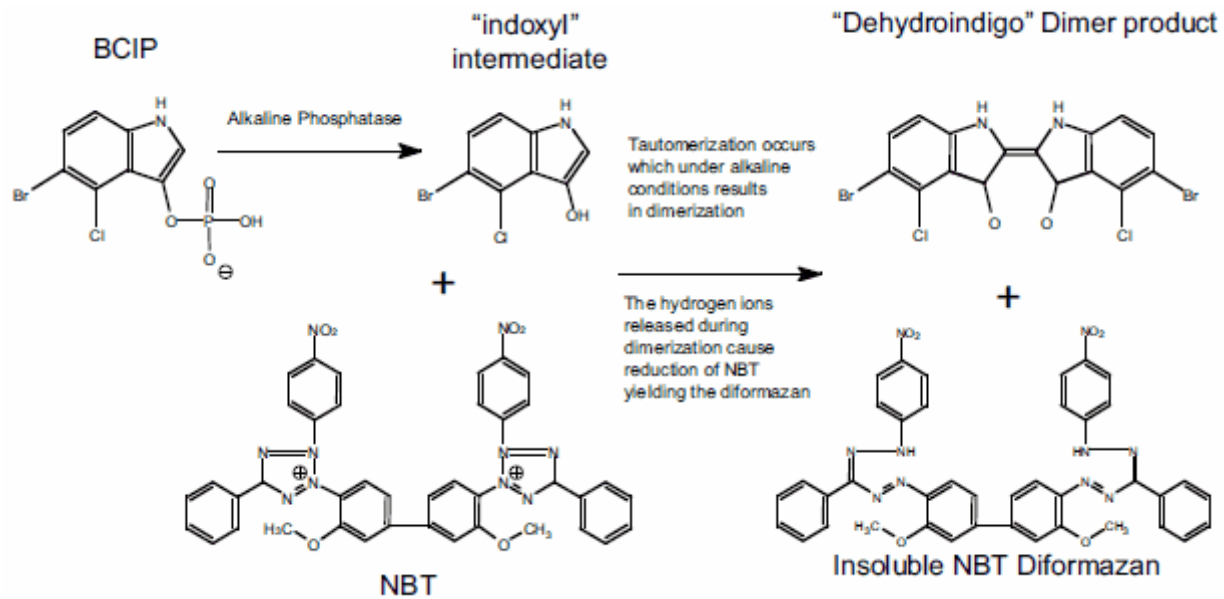
Imunodetekce proteinů

Principles of detection

The mechanism of chemiluminescence



Imunodetekce proteinů



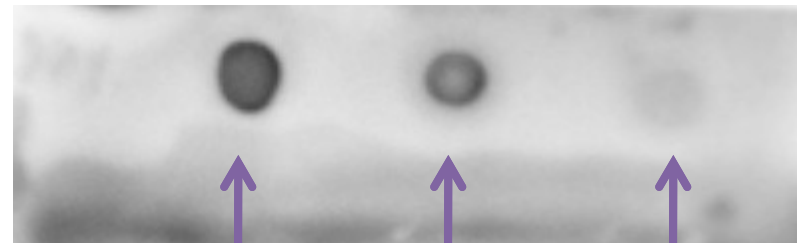
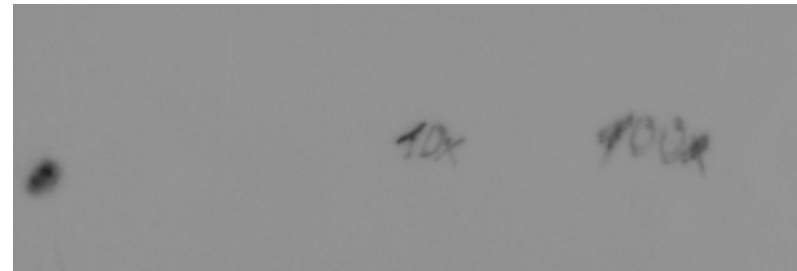
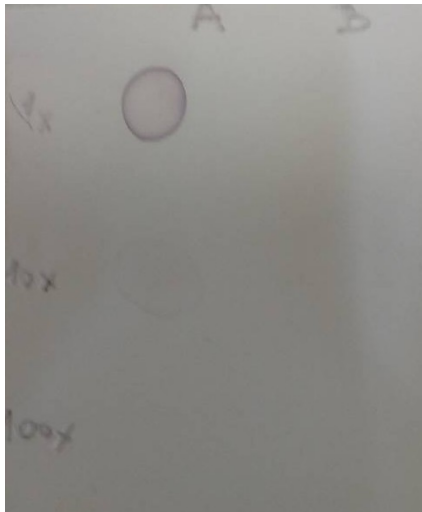
Děkuji za pozornost

1. část



Vzorek A

1. neředěný
2. 10 × zředěný (1 μ l z neředěného vzorku + 9 μ l deionizované vody)
3. 100 × zředěný (1 μ l 10⁻¹ naředěného vzorku + 9 μ l deionizované vody)



1.

2.

3.

2. část

Stanovení koncentrace celkových bílkovin ve vzorku séra pomocí automatizovaného fotometrického analyzátoru BS 200