

9_ Přístupy k analýze buněčných proteinů

Zuzana Soldánová

Marie Brázdová

Metody

- stanovující fyzickou přítomnost buněčných proteinů
 - Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)
 - SDS-PAGE
 - Westernův přenos
 - Imunodetekce proteinů
 - ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay)

 - Imunoprecipitace
 - Imunohistochemie
 - Izoelektrická fokusace
 - Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Purifikace proteinů

– 1. krok

- získání suspenze buněk nebo tkáně

– 2. krok

- rozbití buněk nebo tkáně
 1. ultrazvukem
 2. použitím mírného detergentu na perforaci plasmatické membrány
 3. protlačení buněk malým otvorem
 4. rozbití buněk těsnícím rotačním pístem v tlustostěnné nádobce

– 3. krok

- získání hustého homogenitu nebo extraktu s většími i menšími molekulami z cytosolu (enzymy, ribosomy, metabolity, membránou uzavřené organely)
- získání organel v neporušeném stavu

Homogenizace buněk nebo tkání



Elektroforetické techniky

- schopnost pohybu elektricky nabitých molekul v elektrickém poli
- vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)
 - používají se alkalické pufrы
 - udělení negativního náboje proteinům – proteiny se poté pohybují ke kladné elektrodě (anodě)
 - různé varianty
 - gel vložený mezi dvě nádoby naplněné pufrem, do kterých se ponoří elektrody
 - desková varianta (vzorky jsou naneseny do jamek na horní straně gelu)

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 je hustota náboje tím vyšší je pohyblivost v gelu

– Koncentrace akrylamidu

- se vzrůstající koncentrací pohyblivost klesá

PAGE

- proteiny
 - různé tvary molekul
 - disponují také různými náboji
- DNA
 - uniformní z hlediska tvaru a rozdělení náboje
- Interpretace elektroforetogramu v nativní podobě je obtížná.

SDS-PAGE

- denaturační varianta PAGE
- běžně používaná metoda
- používá se pro separaci proteinů
- příprava vzorků
 - rozpouštění v roztoku obsahujícím negativně nabitou molekulu (**SDS: dodecylsulfát sodný**)
 - eliminace disulfidových vazeb v proteinech redukčním činidlem (**β -merkaptoetanol**)
 - dokončení přípravy vzorků **varem**

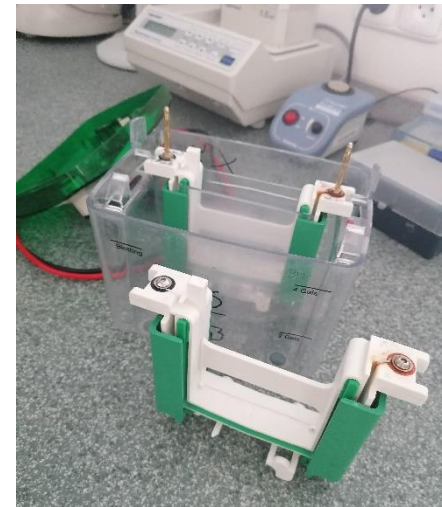
SDS-PAGE

– SDS

- negativně nabitý
- váže se k proteinům
 - zamaskování vlastního náboje proteinu
 - denaturace proteinu a eliminace vlivu tvaru proteinu
 - počet molekul SDS navázaných na protein je zhruba úměrný jeho molekulové hmotnosti
 - ekvivalentní hustota náboje
 - větším proteinům v gelu kladen větší odpor
 - Pomalejší pohyb (efekt molekulárního síta)

– Proteiny se separují pouze podle **molekulové hmotnosti**

SDS-PAGE



Způsoby přenosu

– kapilární přenos

- závaží, skleněná destička, papír, filtrační papír, nitrocelulózový filtr, gel, filtrační papír, skleněné destičky ponořené v přenosovém pufru
- suchý papír nasává kapilárními silami pufr, vzorek je tak tažen z gelu na membránu

– elektroforetický přenos

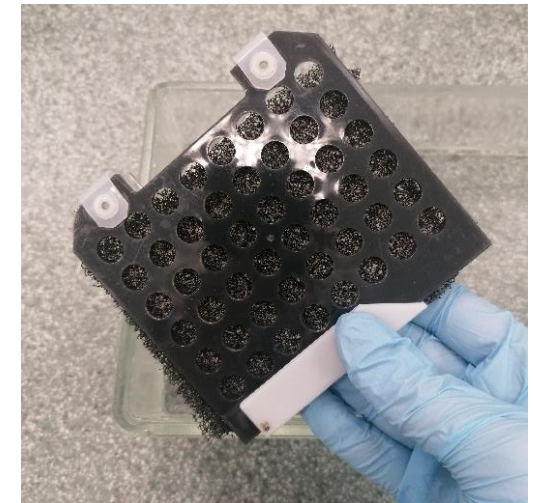
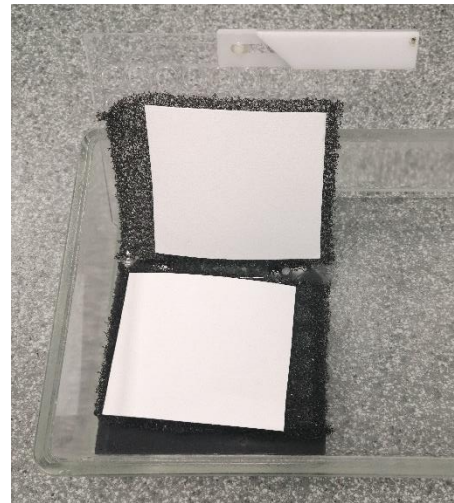
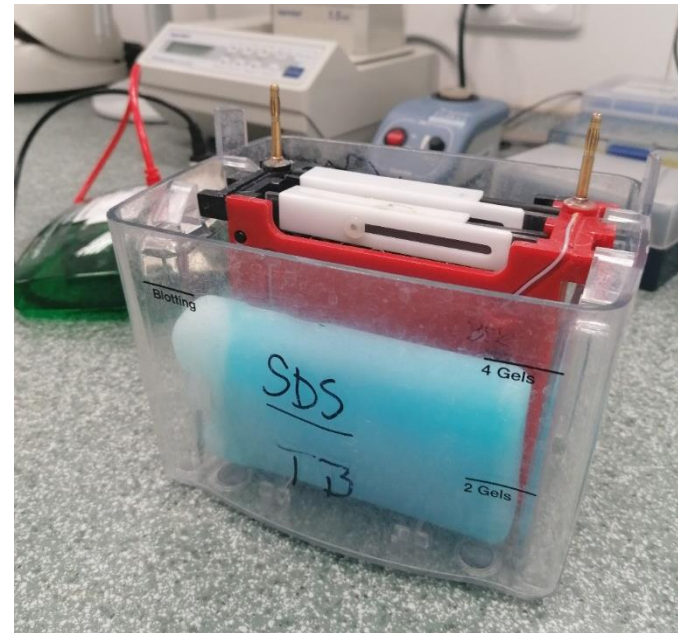
- Westernův přenos (proteiny jsou záporně nabitě a putují ke kladné elektrodě – anodě)
- hnací silou je síla elektrického pole

– vakuový přenos

- obdobné uspořádání jako o kapilárního přenosu, avšak vzorek je tažen vakuem
- rychlejší než kapilární přenos

Westernův přenos

- přenos proteinů
rozdělených
elektroforézou z gelu na
pevný filtr (membránu)
- složení: hubka, filtrační
papír, gel, membrána,
filtrační papír, hubka



Zviditelnění proteinů

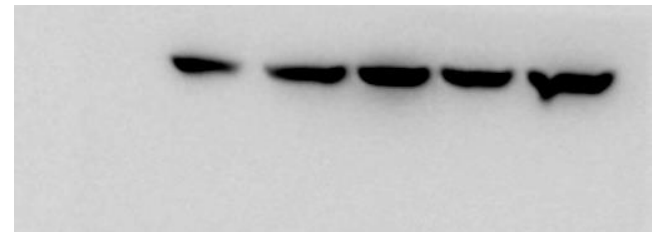
– Nespecificky

- obarvení všech proteinů v gelu
 - Coomassie Brilliant Blue
 - Stříbro



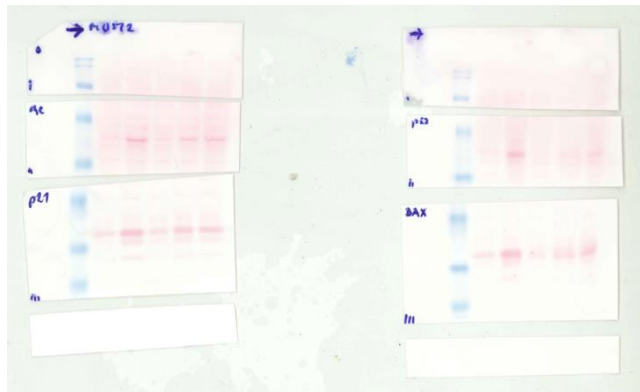
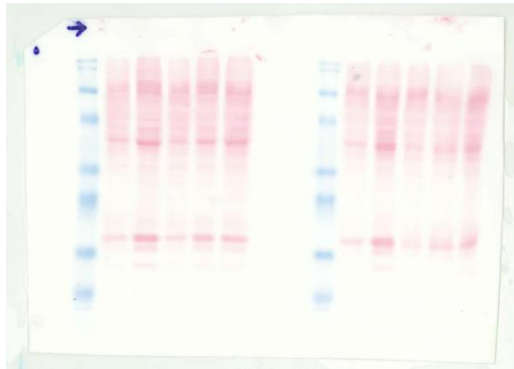
– Specificky

- obarvení pouze vybraného proteinu
 - protilátky

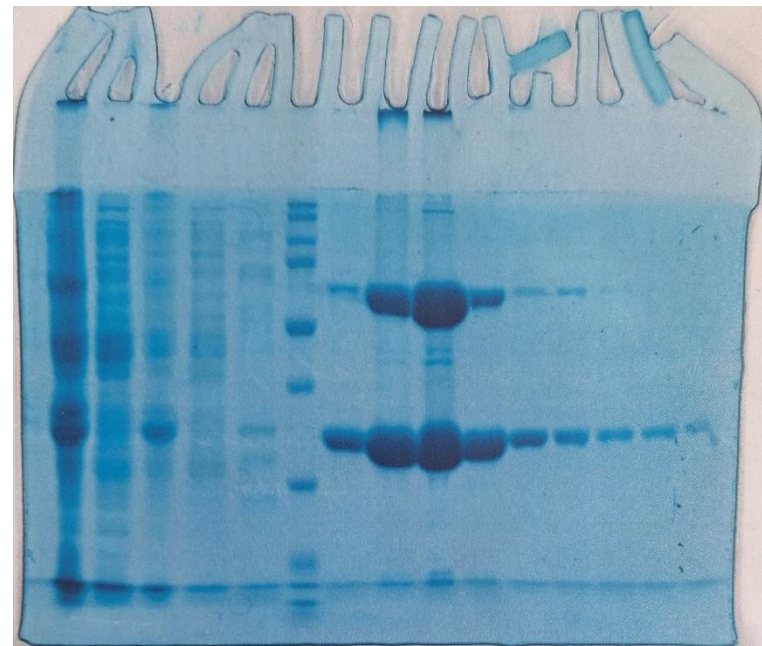


Barvení

Ponceau S



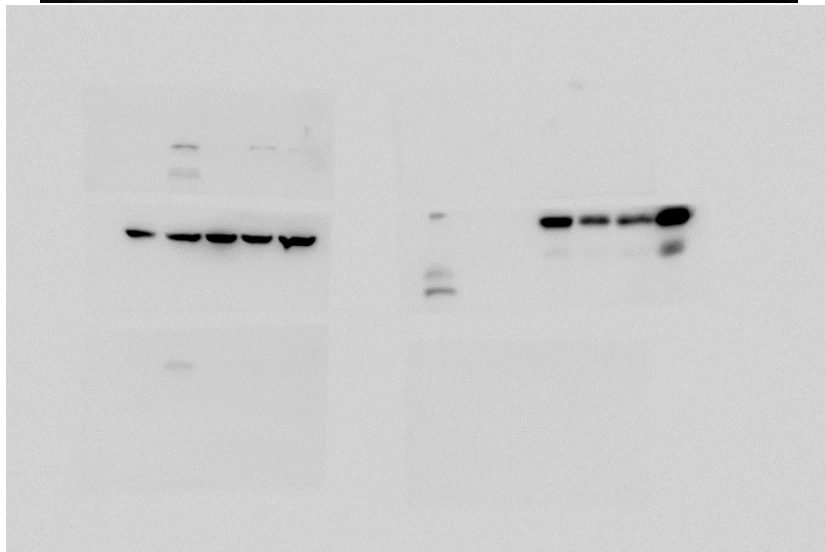
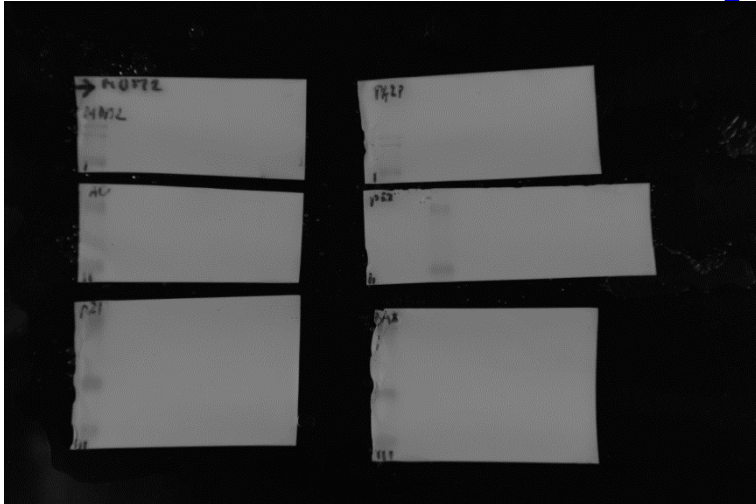
Coomassie Brilliant blue



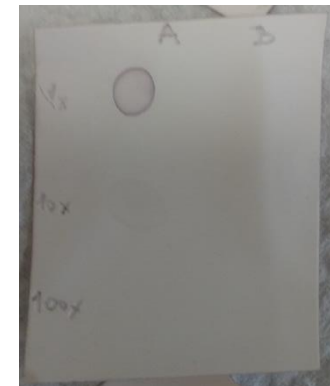
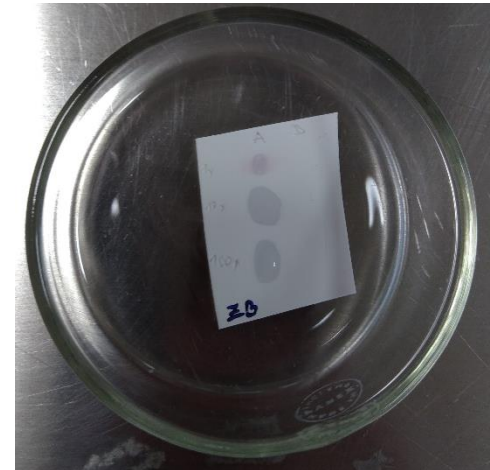
Imunodetekce proteinů

1. vysycení volných vazebných míst na membráně
 - roztoky levného proteinu (mléko, BSA,...)
 2. navázání primární protilátky na příslušný antigen při promývání filtru roztokem specifické protilátky
 3. promývání
 4. navázání sekundární protilátky obsahující konjugovaný enzym
 5. promývání
 6. dodání příslušného substrátu pro konjugovaný enzym
 7. detekce signálu
 - chemiluminiscence
 - detekce zbarvení
- pro zviditelnění proteinu na membráně se užívají například radioaktivní sondy nebo výše zmíněné sekundární protilátky

Imunodetekce proteinů



Patobiochemie 2. cvičení



Protilátky

- jsou schopny rozeznat konkrétní epitopy proteinů
- slouží jako sondy
- rozdělení
 - **monoklonální**
 - získávají se z hybridomů
 - **polyklonální**
 - získávají se z krve imunizovaných zvířat

Monoklonální protilátky

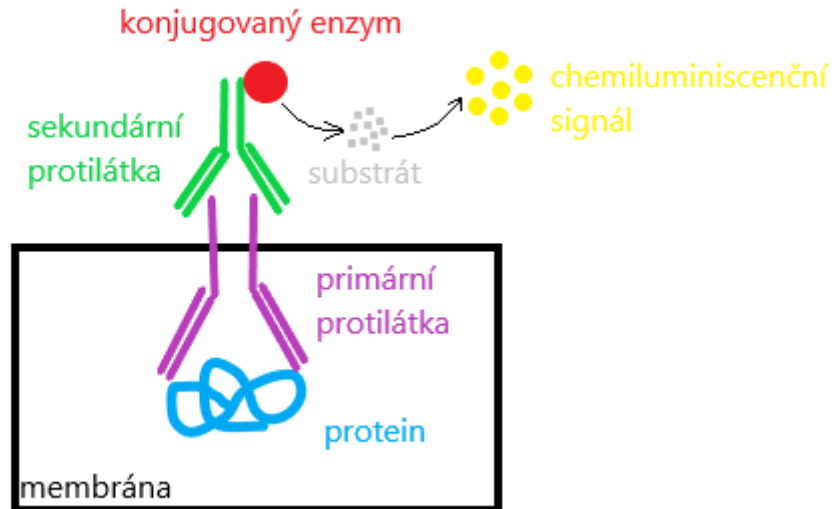
- produkují se pomocí hybridomů
 - ten vzniká fúzí nádorové leukemické buňky (nesmrtelnost) a B-lymfocyty imunizovaného zvířete (produkce protilátek)
- drahá příprava, ale na konci téměř neomezený zdroj protilátky
- specifické pouze k jednomu epitopu

Polyklonální protilátky

- získávají se ze séra imunizovaných laboratorních zvířat
- relativně levná a rychlá příprava
- reagují s více epitopy

Primární protilátka

- váže se na specifický epitop antigenu
- váže se na ni značená sekundární protilátka



Sekundární protilátka

- jsou specifické pouze proti malému počtu primárních protilátek
 - anti-myší IgG
 - anti-králičí IgG
- značené různými způsoby
 - radioaktivně
 - křenová peroxidáza (horseradish peroxidase – HRP)
 - alkalická fosfatáza
 - biotin
 - fluorescenční značka

Detekční metody

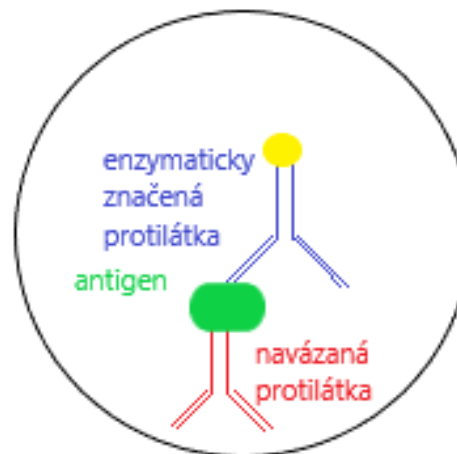
- kolorimetrické metody
- chemiluminiscence
- bioluminiscence
- chemifluorescence
- fluorescence/autoradiografie
- zlatem značené protilátky

Imunobloting

1. rozdělení proteinů daného vzorku gelovou elektroforézou
2. přenos proteinů na membránu (western blotting)
3. inkubace membrány se specifickou protilátkou
4. inkubace membrány se sekundární značenou protilátkou
5. detekce navázané protilátky

ELISA

- **E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay
- využívá dvě protilátky proti jednomu proteinu
 - 2 různé epitopy
- jedna protilátka je navázána na nosiči
 - nejčastěji na stěně reakční nádoby



ELISA

– výhody

– vysoká citlivost

- pg/ml
- potřeba malého množství vzorku

– možnost využití poloautomatických systémů



ELISA

– provedení:

1. vazba proteinu na první protilátku
2. promytí
3. vazba druhé protilátky na protein
4. promytí
5. detekce druhé protilátky

AlphaLISA

- modifikace metody ELISA
- „ELISA v roztoku“
- žádné promývání
- donor i akceptor je navázán na cílové molekule
- donor produkuje singletový kyslík
 - výsledkem je zesílení signálu
- rozsáhlé spektrum využití

AlphaLISA

