

# Metody separace proteinů

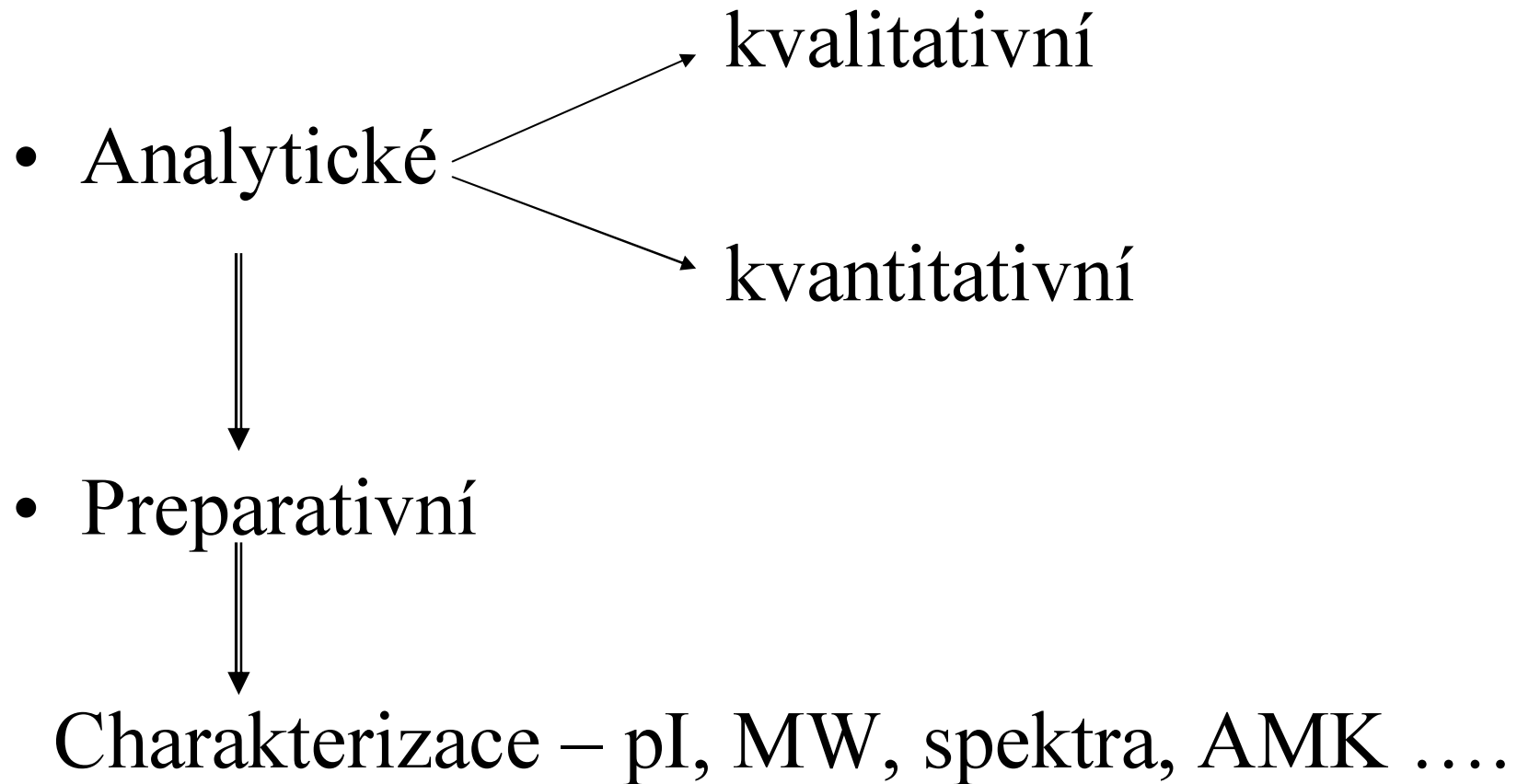
# Literatura

- *Anzenbacher, Kovář* : Metody chemického výzkumu pro biochemiky
- *Ferenčík* : Biochemická laboratorní technika
- *Scopes* : Protein Purification
- *Harris* : Protein Purification Methods – Practical Approach
- *Deutcher* : Guide to Protein Purification
- *Janson* : Protein Purification
- *Kastner* : Protein Liquid Chromatography

# Metody separace proteinů

- Vychází z klasických metod chemické analýzy
- Uplatňují se zde i speciální metody

# Separace



# Problémy se vzorkem

- Komplexnost
- Malá množství
- Labilita

# Zásady pro práci s biologickým materiálem

1. Teplota
2. pH + iontová síla
3. Koncentrace bílkoviny
4. Pěnění
5. Lokální přebytky
6. Proteázy

# Plánování separace bílkovin

# Cíl izolace

- Získání homogenní bílkoviny
- Zachování biologické aktivity
- Čistota



Závěr : získat vzorek o patřičné  
čistotě s vynaložením  
patřičného úsilí



# Volba vstupního materiálu

- Preparát z daného organismu
- Preparát s největším obsahem dané bílkoviny
- Preparát s nejmenším obsahem nečistot

# Volba a kombinace separačních metod

- Rozlišovací schopnost
- Selektivita
- Kapacita
- Zpětný výtěžek
- Náklady – materiál, přístroje, člověk
- Stupeň zředování a koncentrace
- Slučitelnost mezi metodami

# Základní zásady

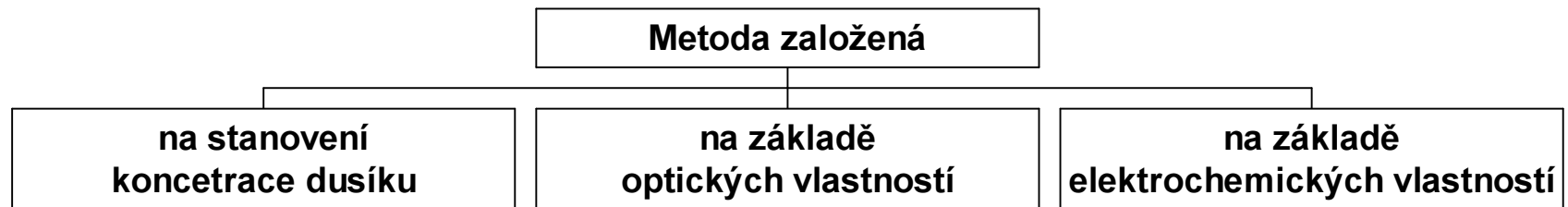
- Na začátek zařadit metody s vysokou kapacitou a malým výtěžkem a rozlišením  
→ velké množství levného vstupního materiálu
- Později metody s vysokým rozlišením a výtěžkem, kapacita méně významná  
→ ve vzorku již investovaná práce

- Pořadí volit tak, aby metody na sebe vhodně navazovaly
- Metody zřed'ovací kombinovat s metodami koncentrujícími
- Metody nepoužívat opakovaně

# Sledování průběhu separace

Metoda	Celková bílkovina	Celková aktivita	Specifická aktivita	Přečištění	Výtěžek
extrakt	100	100	1	-	100 %
HIC	50	99	1.99	1.99	99 %
IEX	25	75	3	1.5	75 %

# Stanovení koncentrace bílkoviny



# Kjeldahlova metoda – stanovení



- Mineralizace vzorku – převedení organického dusíku na  $\text{NH}_4^+$
- Stanovení  $\text{NH}_4^+$  - titrace, fotometrie, selektivní elektrody

# UV spektrofotometrie

- 280 nm – aromatické AMK  
interference nukleotidů
- 180 - 230 nm – peptidická vazba

Výhody - nedestruktivní metoda  
- není třeba kalibrace



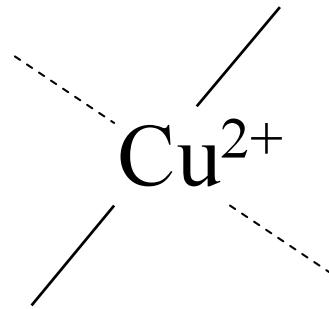
# VIS spektrofotometrie

Přídavek činidla → barevný derivát

- Destruktivní metoda
- Nutná kalibrační závislost

# Biuretová metoda

Princip :  $\text{Cu}^{2+}$  vytváří v alkalickém prostředí  
komplex se 4 N peptidické vazby



Měření : 540 – 560 nm

310 nm

# Folinova metoda

Princip : hydroxyfenolová skupina tyrosinu  
redukuje fosfomolybdenany na  
molybdenovou modř

Měření : 725 nm

# Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a Biuretové metody

Měření : 600 nm

# Metoda dle Bradfordové

Princip : při vazbě Coomassie Brilliant Blue G 250 na bílkovinu dochází k posunu absorpčního maxima z 465 na 595 nm.

Meření : 595 nm

# Fluorescence

Princip : - vazba fluoroforu na bílkovinu →  
měření vzniklé fluorescence

- zhášení fluorescence přidavkem  
bílkoviny

# Polarografie

Princip : Brdičkova reakce – SH skupiny  
bílkoviny vstupují v přítomnosti  
 $\text{Co}^{2+}$  katalytické reakce na Hg  
elektrodě  $\rightarrow$  proud

# Nejčastěji používané metody

<b>Metoda</b>	<b>Rozsah (ng)</b>	<b>Poznámka</b>
<b>Biuretová</b>	0.5 - 5	okamžitý vývoj
<b>Lowryho</b>	0.05 - 0.5	pomalý vývoj
<b>UV - 280 nm</b>	0.05 - 2	interference
<b>UV – 205 nm</b>	0.01 - 0.05	interference
<b>Bradfordové</b>	0.01 - 0.05	sorpce barviva



# Stanovení biologické aktivity

Enzymatické, imunologické, toxické,  
hormonální receptorové atd..

# Vlastní separace

# Obecné schéma

Získání vstupního materiálu



Rozrušení buněk



Separace

# Vstupní materiál

# Mikroorganismy

Bakterie, kvasinky, plísně, řasy

- Výhody - lze je snadno získat v dostatečné množství
- selekce mutantů o požadovaných vlastnostech
  - genetické inženýrství
  - termofilní organismy

# Bezobratlí

Hmyz, plži, mlži

Nevýhody - málo se používá, nesnadno se získává

# Živočišné tkáně

- Laboratorní zvířata – myši, krysy, králíci
- Jateční zvířata – orgány
- Člověk – tělní tekutiny

# Rostlinné tkáně

Špenát, řepa, hrách

Nevýhoda – problematický růst za  
definovaných podmínek



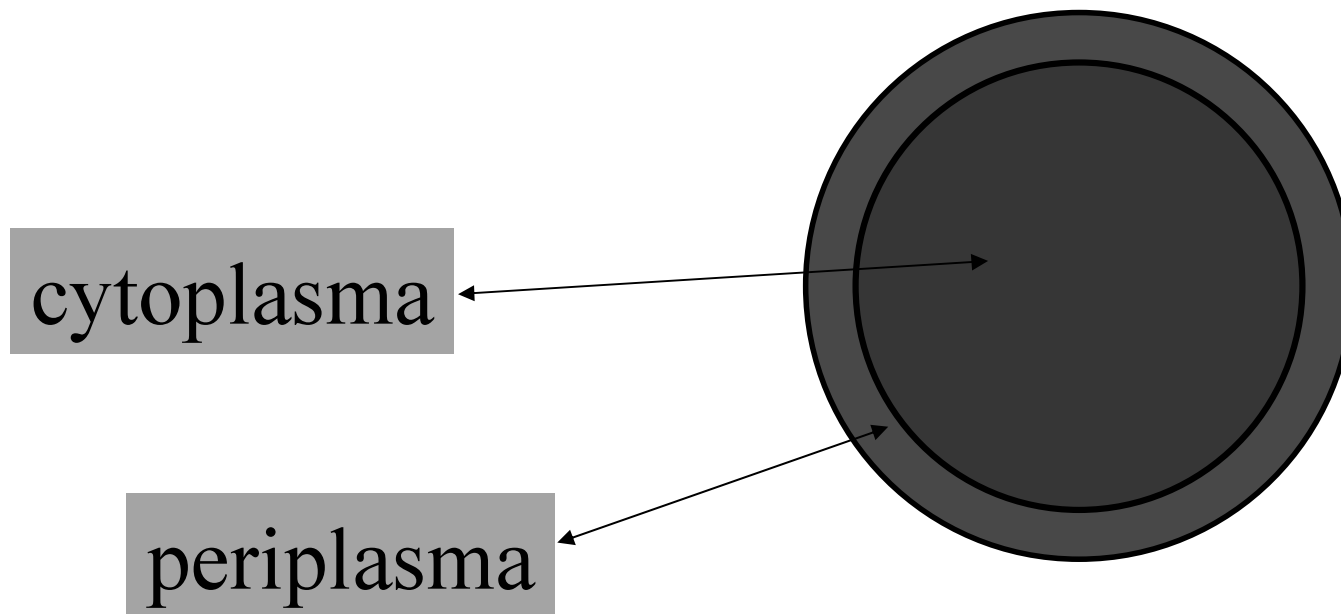
# Manipulace s biologickým materiálem

- Pokud možno zpracovat co nejdříve
- Zmražení – při – 60 – 80 °C
- Rozmrazování – co nejrychleji

# Rozbití a extrakce

# Bakterie

- Záleží na lokalizaci

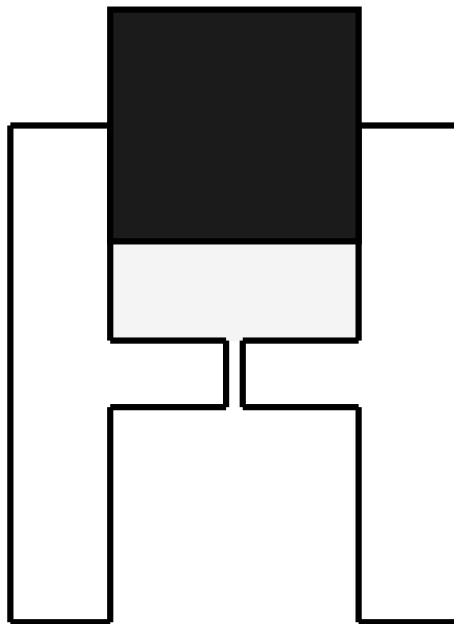


# Balotina

Princip – jemné skleněné kuličky přidány do bakteriální suspenze a rychle třepány nebo míchány – nutno chladit

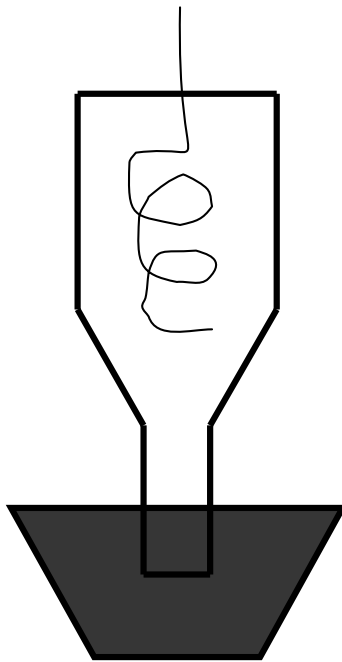
# French (X) press

Princip – zmražená bakteriální suspenze  
protlačována malým otvorem,  
přičemž dochází k rekrystalizaci a  
rozrušení buněk



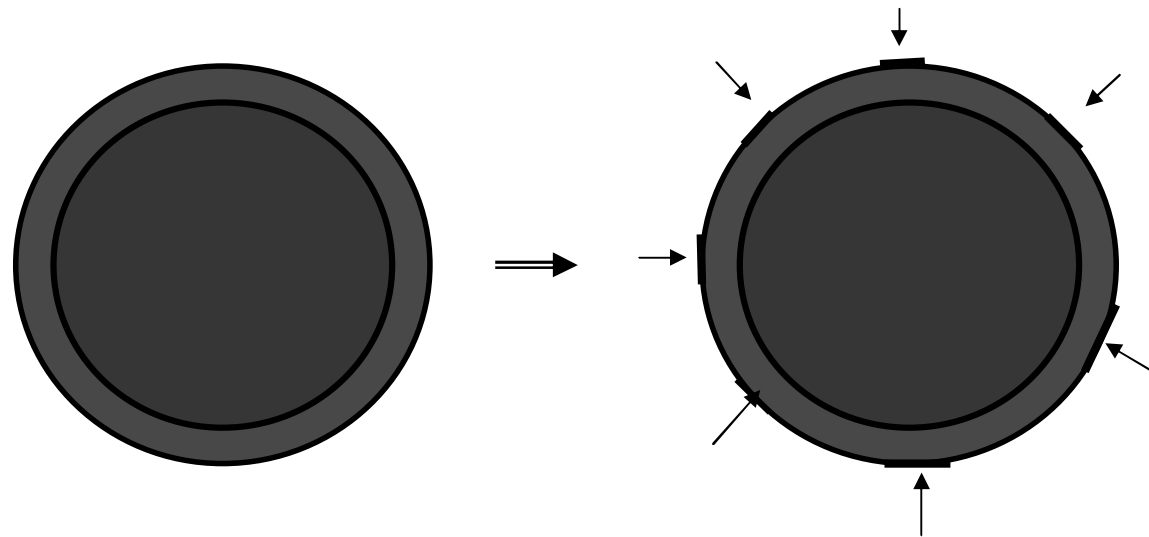
# Ultrazvuk

Princip – ultrazvuk ( $> 20$  kHz) v roztoku  
vyvolává střižní síly – nutno chladit



# Lysozym + osmotický šok (mírný osmotický šok)

Princip – lysozym rozruší buněčnou stěnu,  
následně je bakteriální suspenze zředěna  
destilovanou H<sub>2</sub>O – bakterie popraskají



# Další

- Alumina  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – roztírání v třecí misce
- Opakované zmrazování a rozmrazování



# Kvasinky

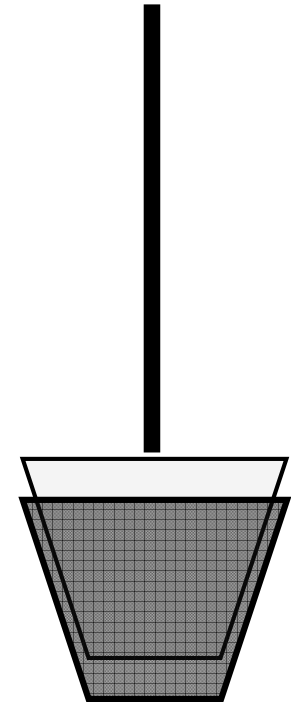
Toluenová autolýza

Princip – toluen extrahuje při 35 –40 °C  
fosfolipidy buněčné stěny →  
osmotický šok → enzymová  
autolýza

Balotina, French press,

# Živočišné tkáně

- Třecí miska s pískem
- Ruční homogenizatory – Potter – Elvehjemův
- Mixery
- Osmotická lyse - erythrocyty



# Rostlinné tkáně

- Rozrušení buněčné stěny pomocí celulas,
- Obsahují hodně fenolických látek, které mohou být oxidovány na chinony – melaniny, které mohou modifikovat bílkoviny

# Optimalizace extrakce

- Teplota – 4 – 6 °C chlazení
- pH – optimální pro danou bílkovinu – práce v pufrech
- I – v prostředí o definované iontové síle
- Přídavky látek – EDTA,  $\beta$ -merkaptoethanol, kovové ionty, inhibitory proteáz

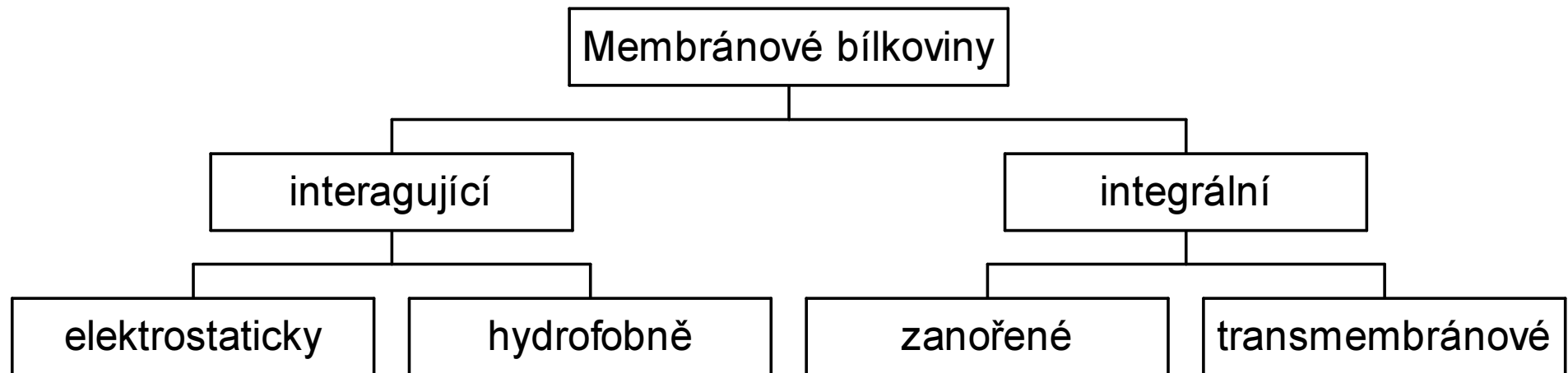
# Separace subcelulárních organel

<b>Organela</b>	<b>Tíhové zrychlení</b>	<b>Čas</b>
Eukar.buňky	1 000 g	5'
Jádra, chloroplasty	4 000 g	10'
Mitochondrie, bakterie	15 000 g	20'
Lysozomy, membrány	30 000 g	30'
Ribozomy, fragmenty end.retikula a Gold.system	100 000 g	60'

# Enzymy - markery

<b>Organela</b>	<b>Enzym</b>
Cytoplasma	LDH
Endoplazmatické retikulum	Glukosa-6-fosfatasa
Goldiho systém	galaktosyltransferasa
Peroxisom	katalasa
Lysozom	Kyselá fosfatasa
Mitochondrie in	cytochromoxidasa
Mitochondrie out	monoaminoxidasa

# Membránově vázané bílkoviny



# Izolace membránových bílkovin

- *Chemicky* – detergenty, chaotropní soli, organická rozpouštědla, nízká iontová síla,
- *Fyzikálně* - homogenizace, sonikace
- *Enzymaticky* – fosfolipasy, lipasy, proteasy



# Centrifugace

- Odstranění hrubých částic z roztoku  
Sediment (pelet) – supernatant
- Izolace organel nebo biomakromolekul
- Stanovení základních parametrů – MW, hustota, sedimentační koeficient

# Použití

Centrifugace

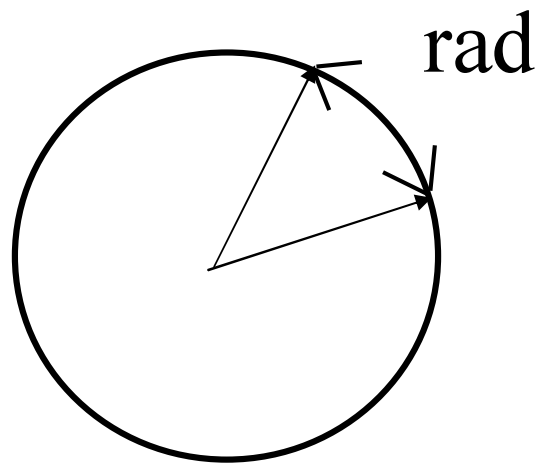
```
graph TD; A[Centrifugace] --> B[Preparativní]; A --> C[Analytická]
```

Preparativní

Analytická

Otáčky  $\rightarrow$  g

$$g = \omega^2 \cdot r$$

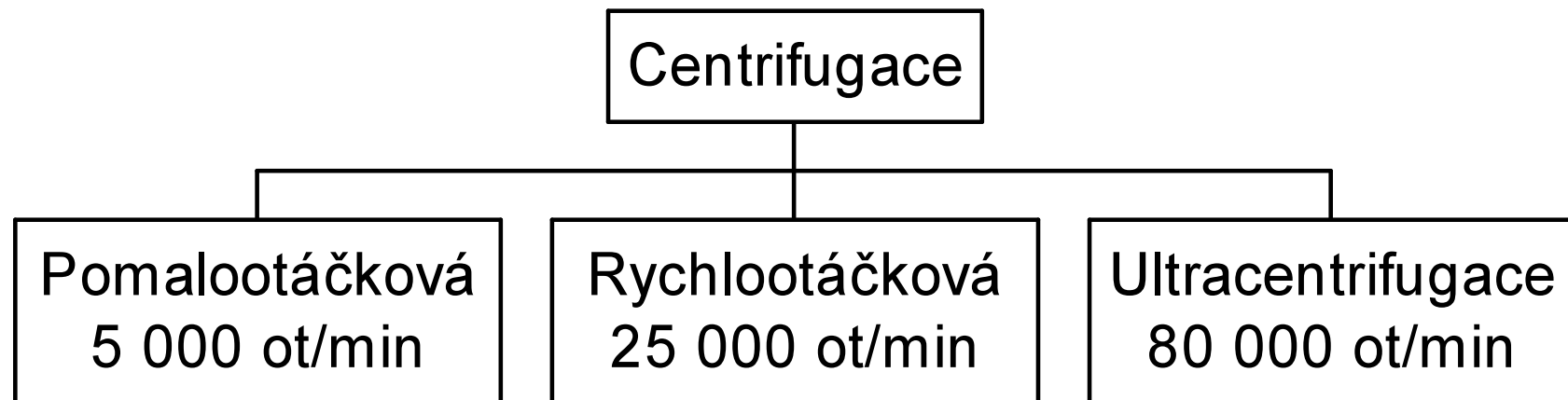


$\omega$  - uhlová rychlost  
(rad/s)

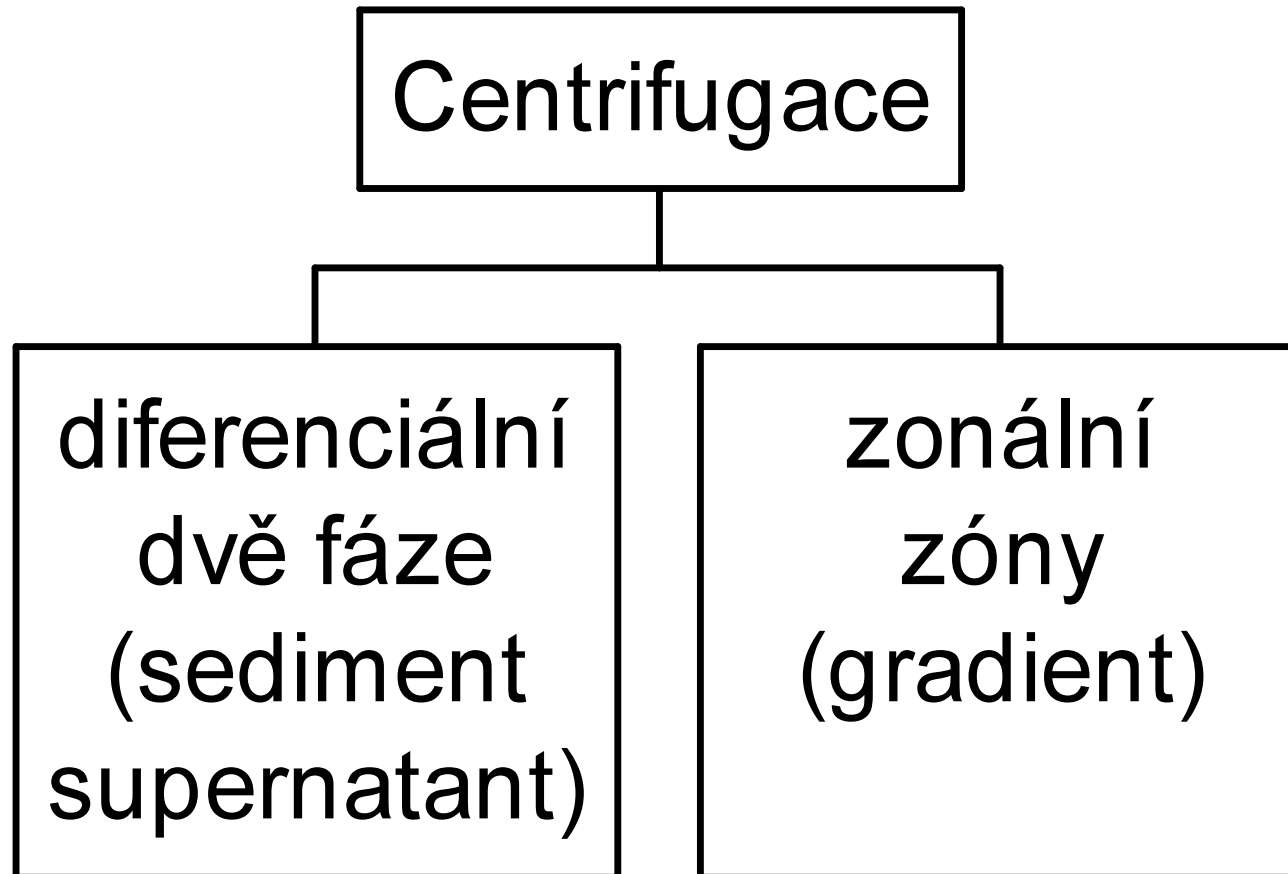
$$\omega = 2\pi \cdot f$$

f – otáčky/min

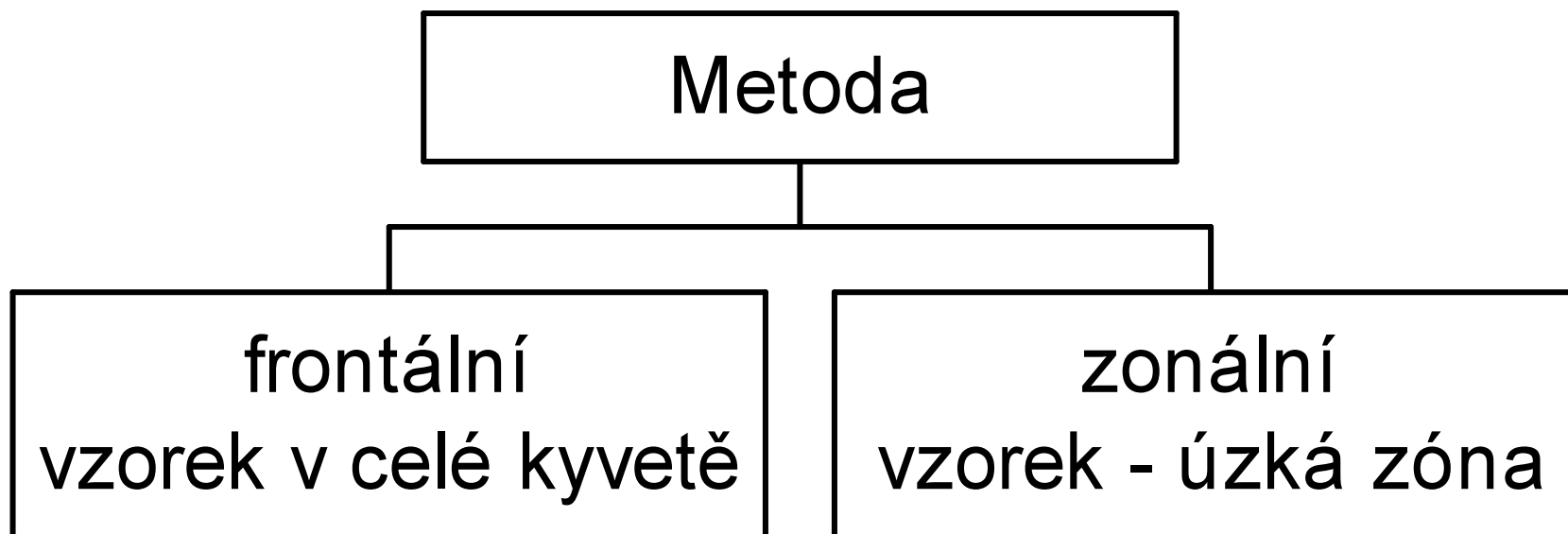
# Rozdělení centrifug



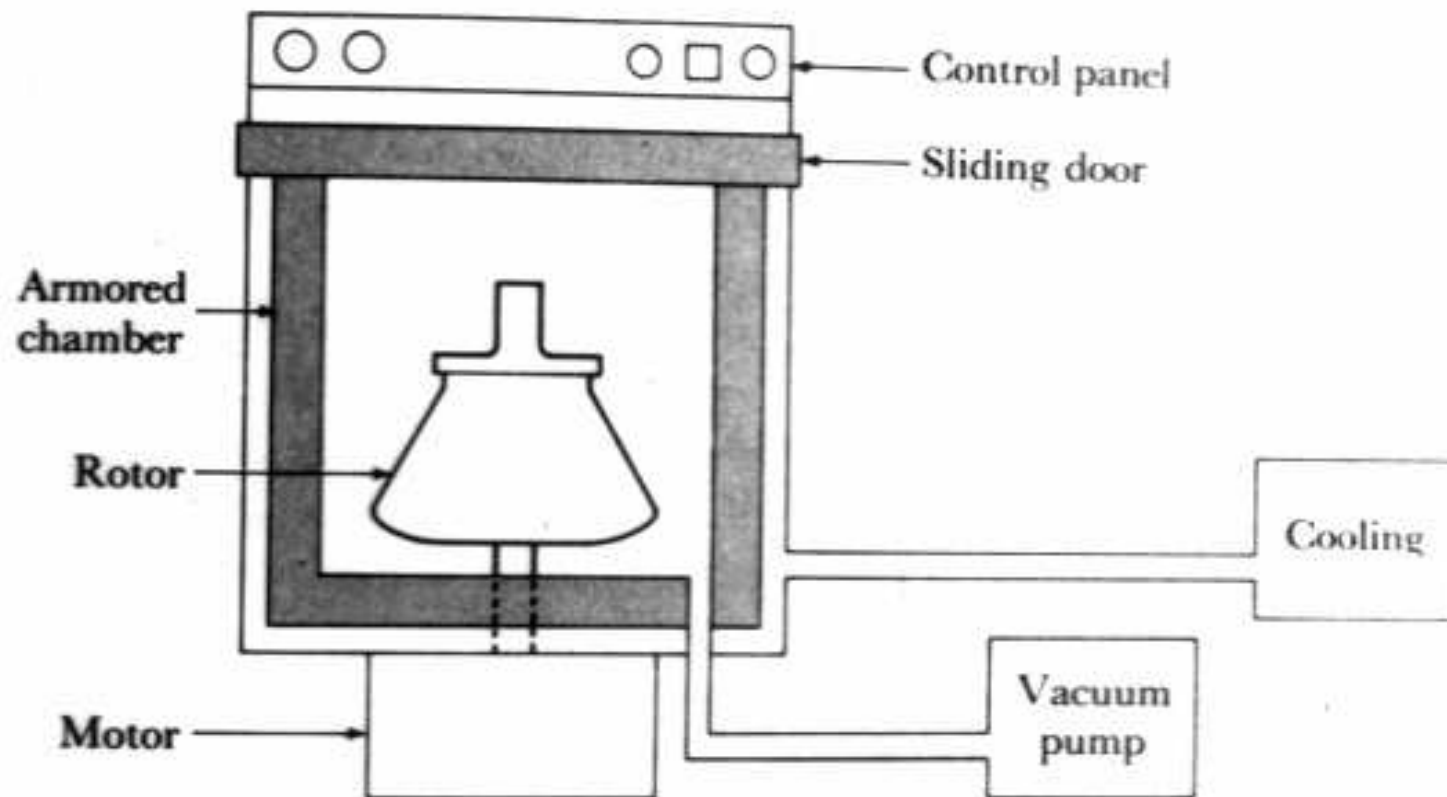
# Preparativní centrifugace



# Metody nanášení vzorku



# Preparativní centrifuga



# Preparativní centrifuga





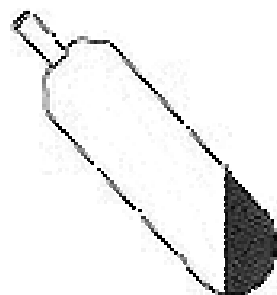
# Preparativní ultracentrifuga



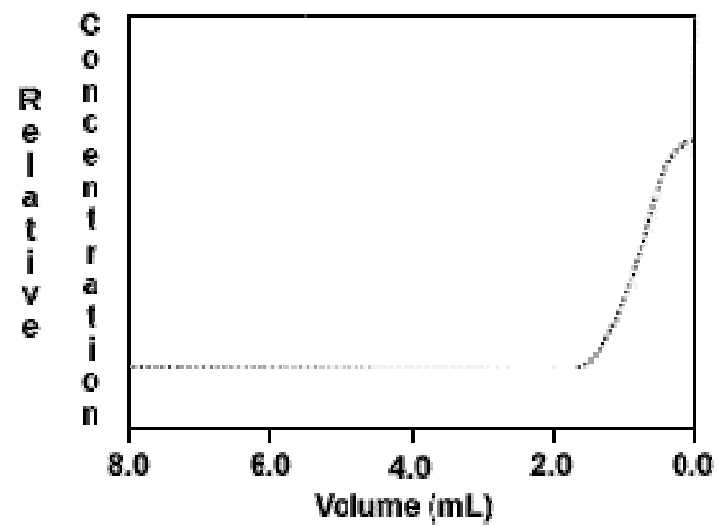
# Rotory

- Úhlový – diferenciální centrifugace
- Výkyvné – zonální centrifugace
- Zonální – bez kyvet, vzorek je uvnitř rotoru

# Úhlový rotor



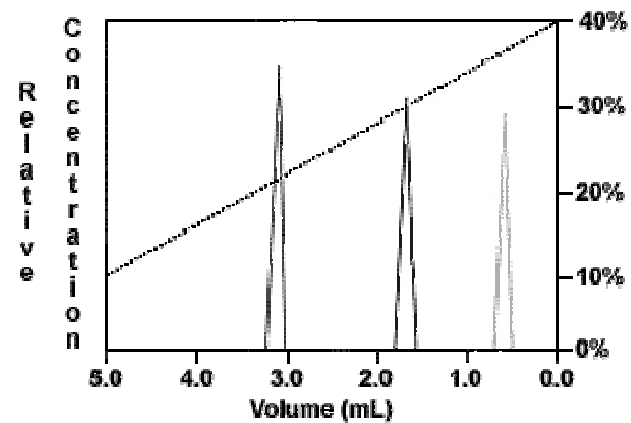
**Figure 4**



# Výkyvný rotor



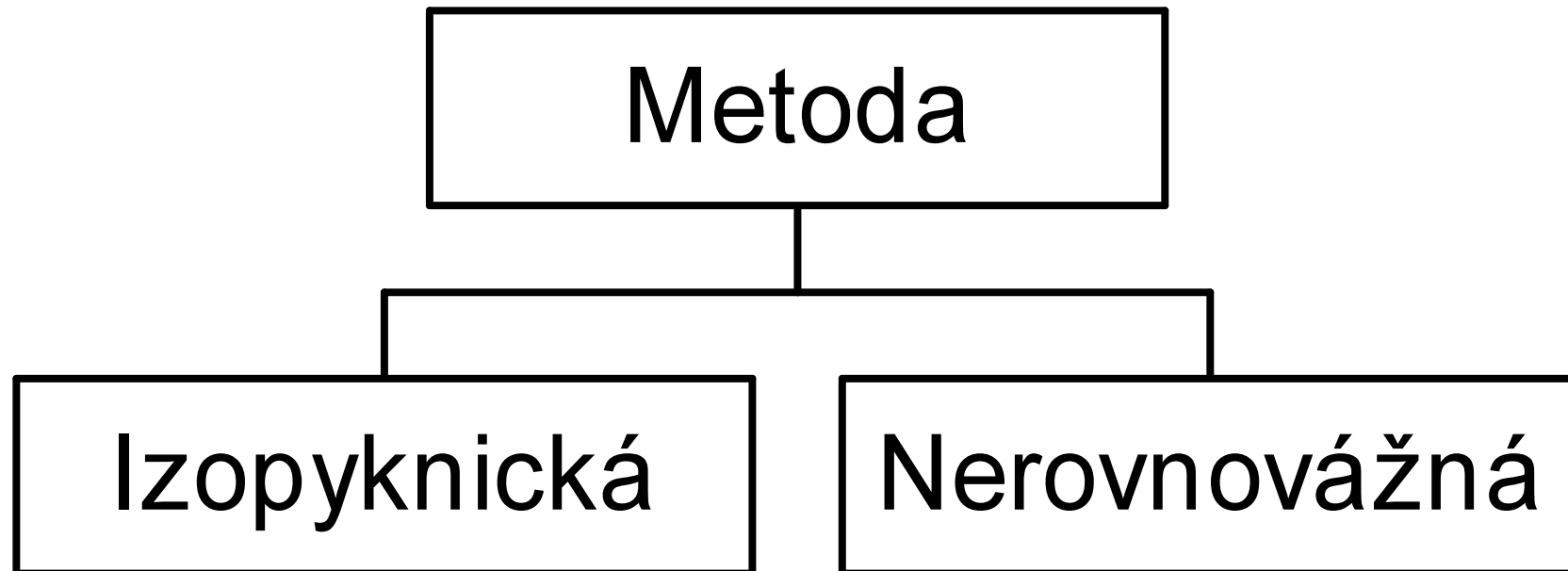
*figure 2*



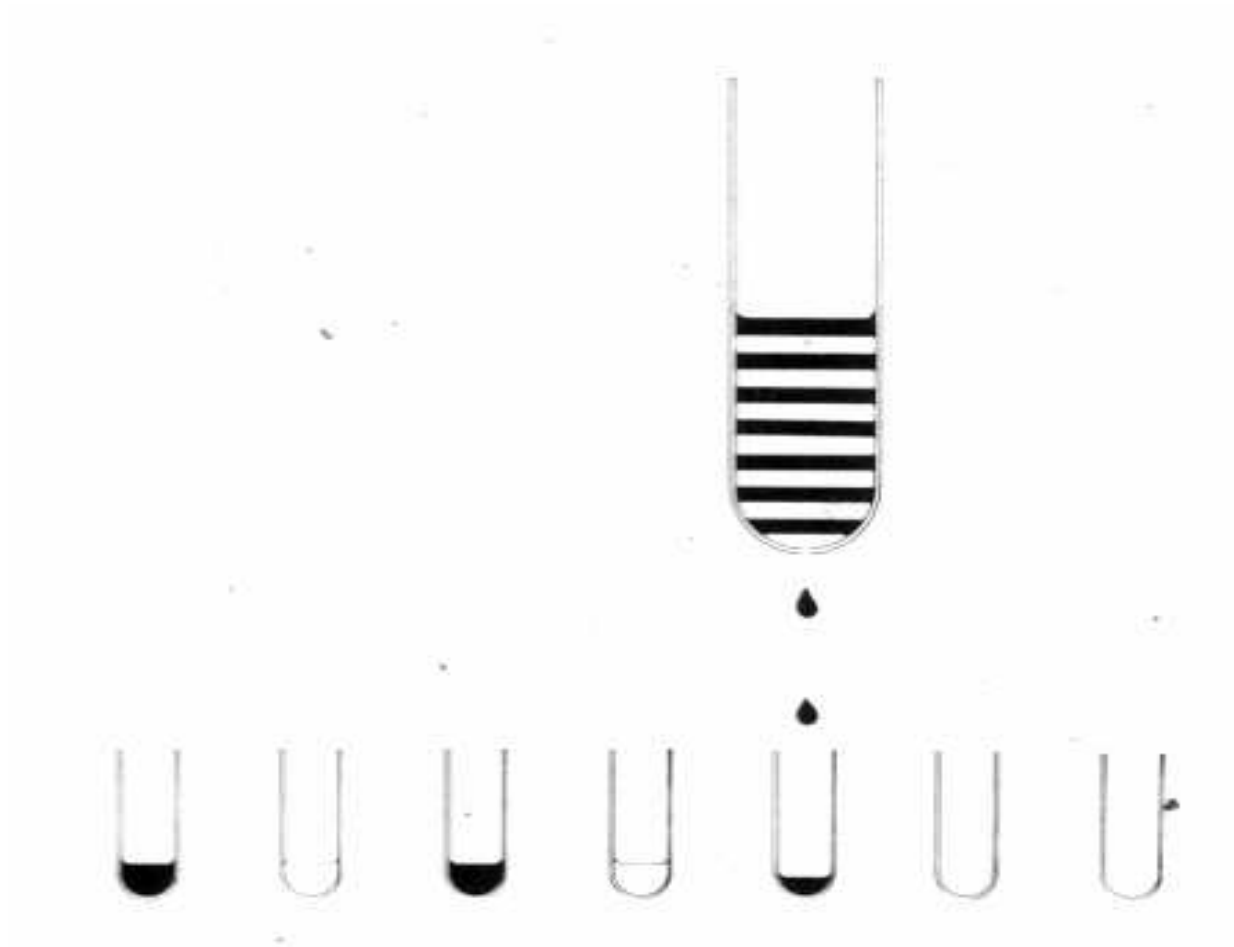
# Gradientová centrifugace média

- Sacharosa
  - Glycerol
  - Ficoll - dextran
  - Percoll – SiO<sub>2</sub>
  - CsCl – gradient vzniká během centrifugace
- Hypertonické prostředí
- Nutno připravit gradient

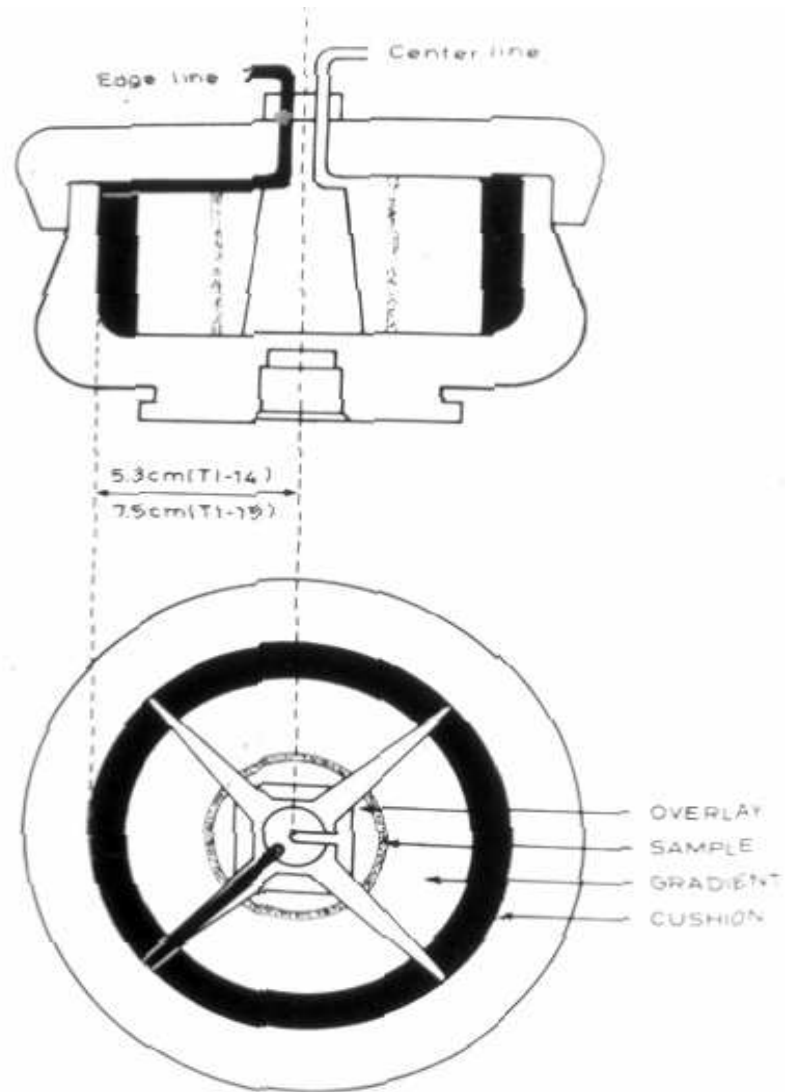
# Gradientová centrifugace



# Gradientová centrifugace

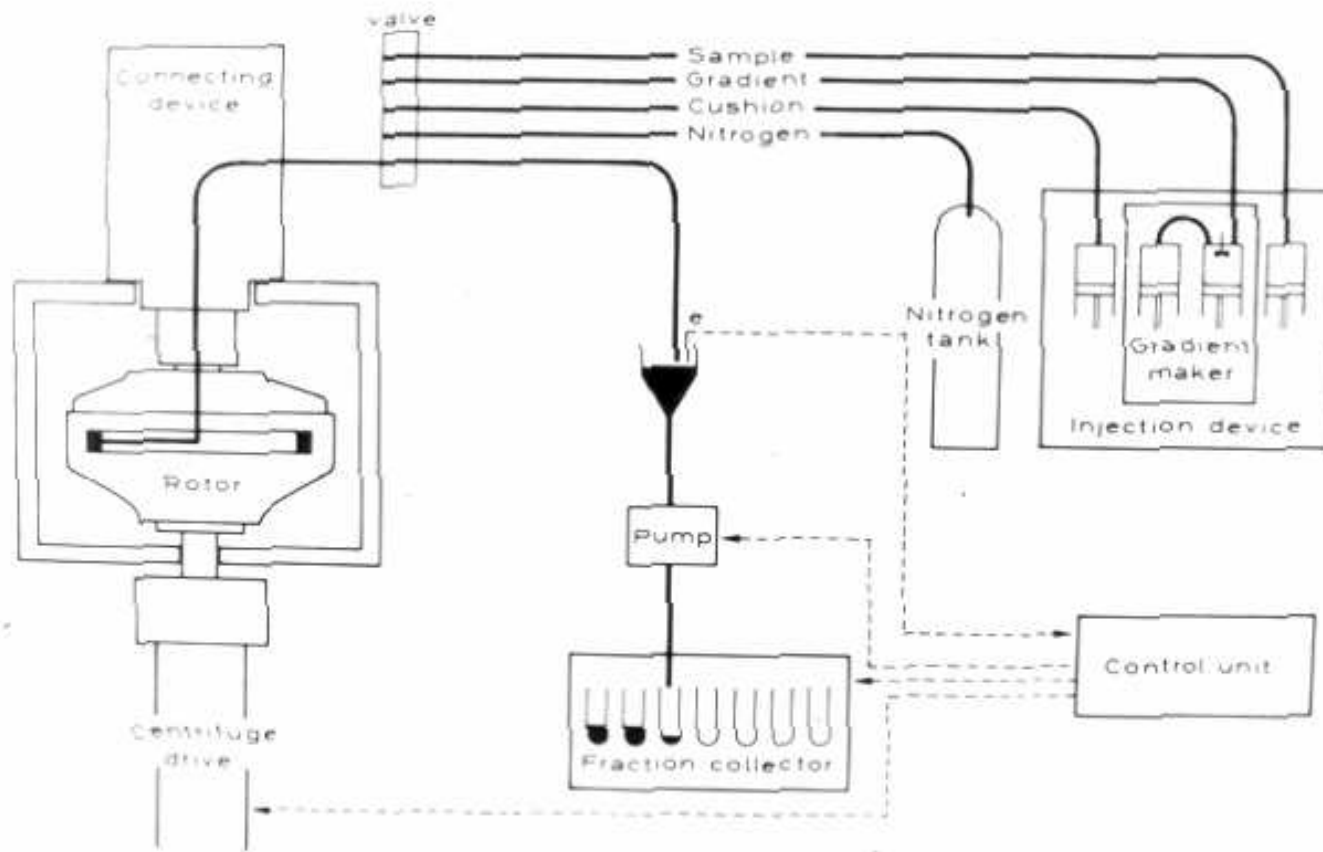


# Zonální rotor

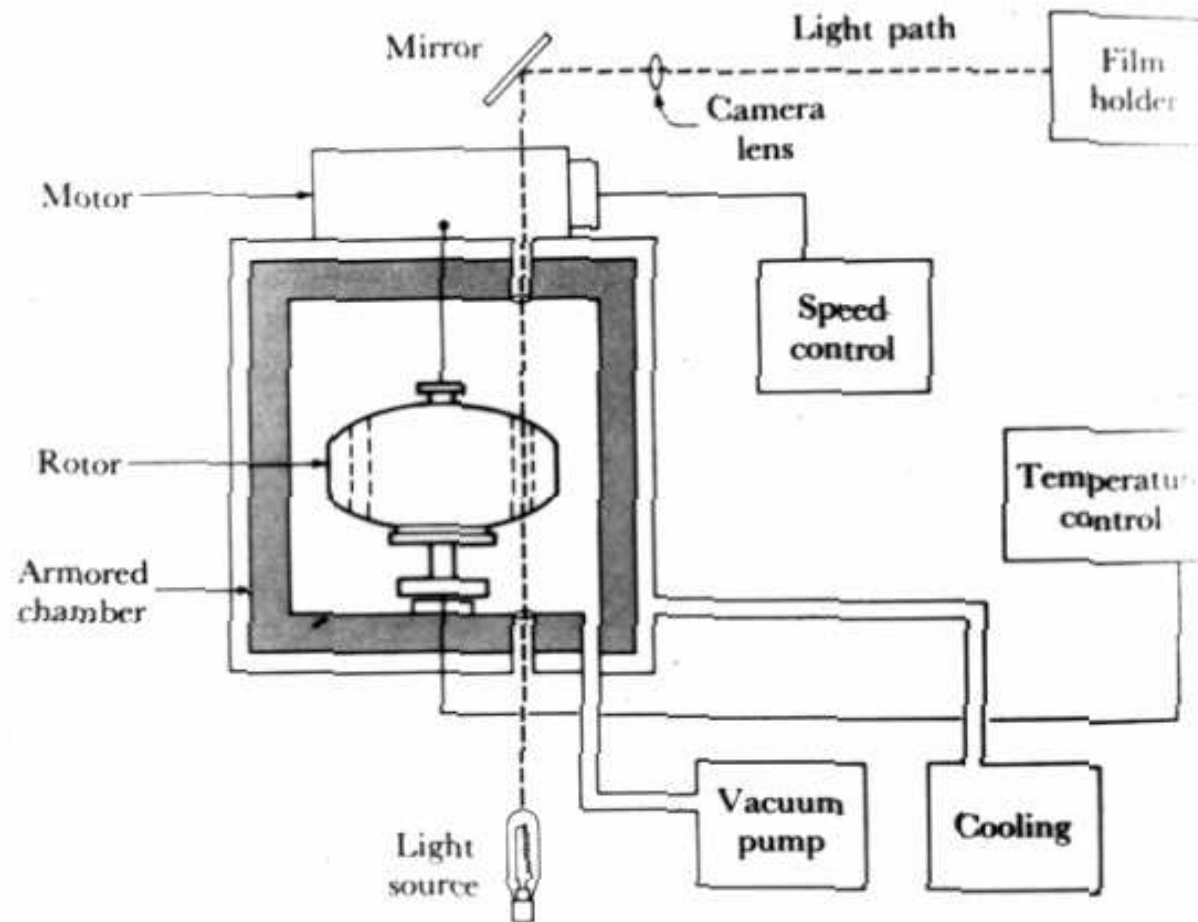




# Centrifugace se zonálním rotorem



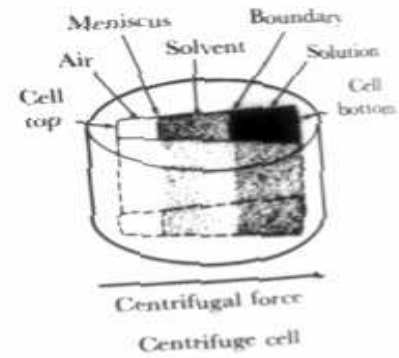
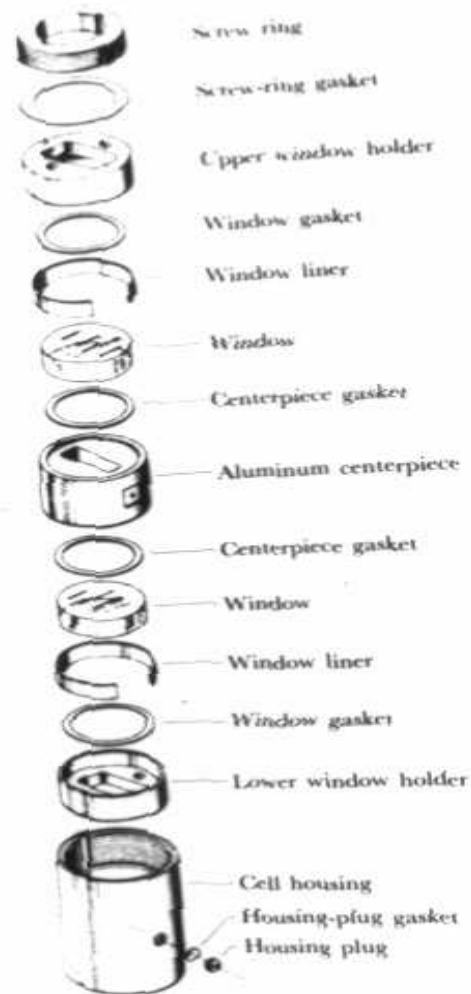
# Analytická ultracentrifuga



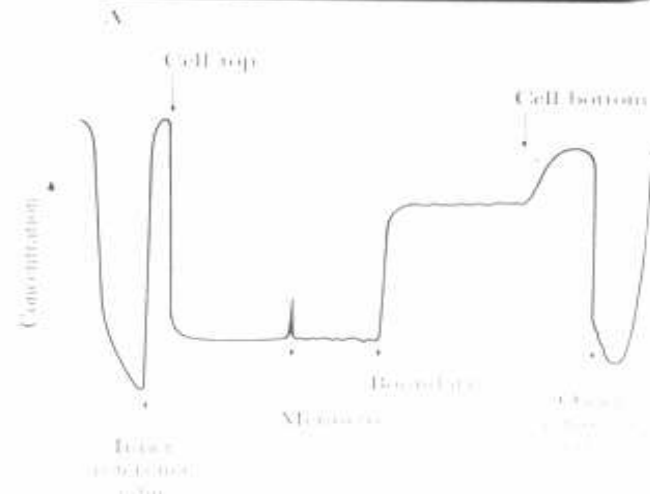
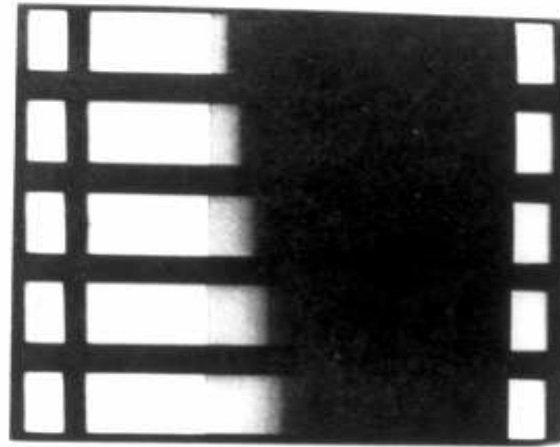
# Analytická ultracentrifuga



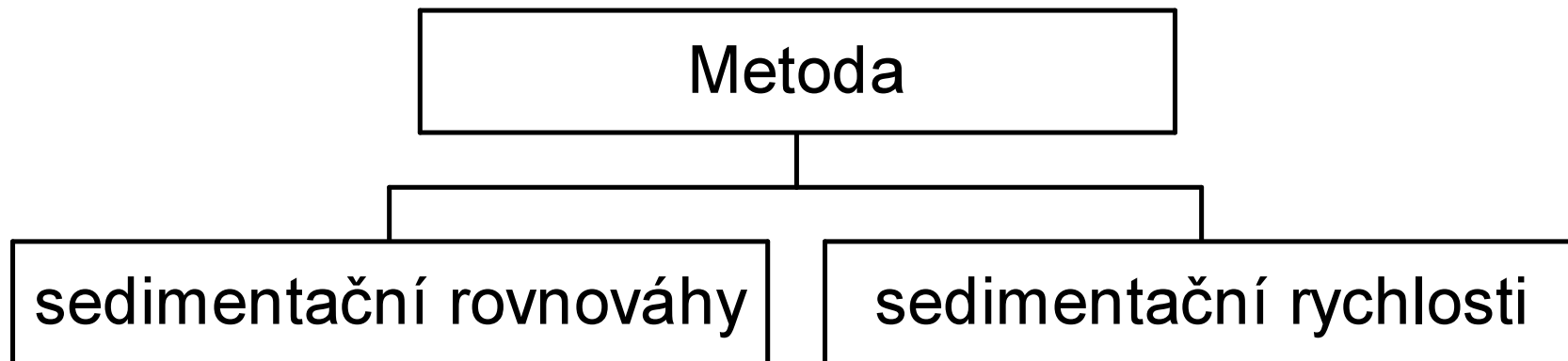
# Kyveta



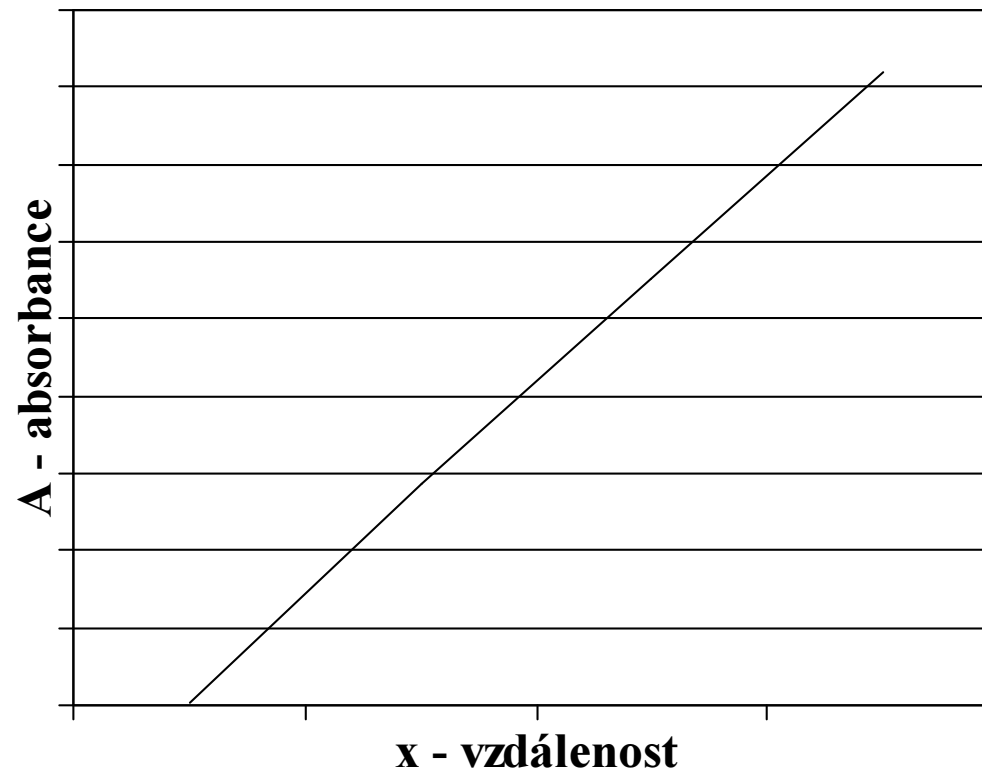
# Analytická centrifugace



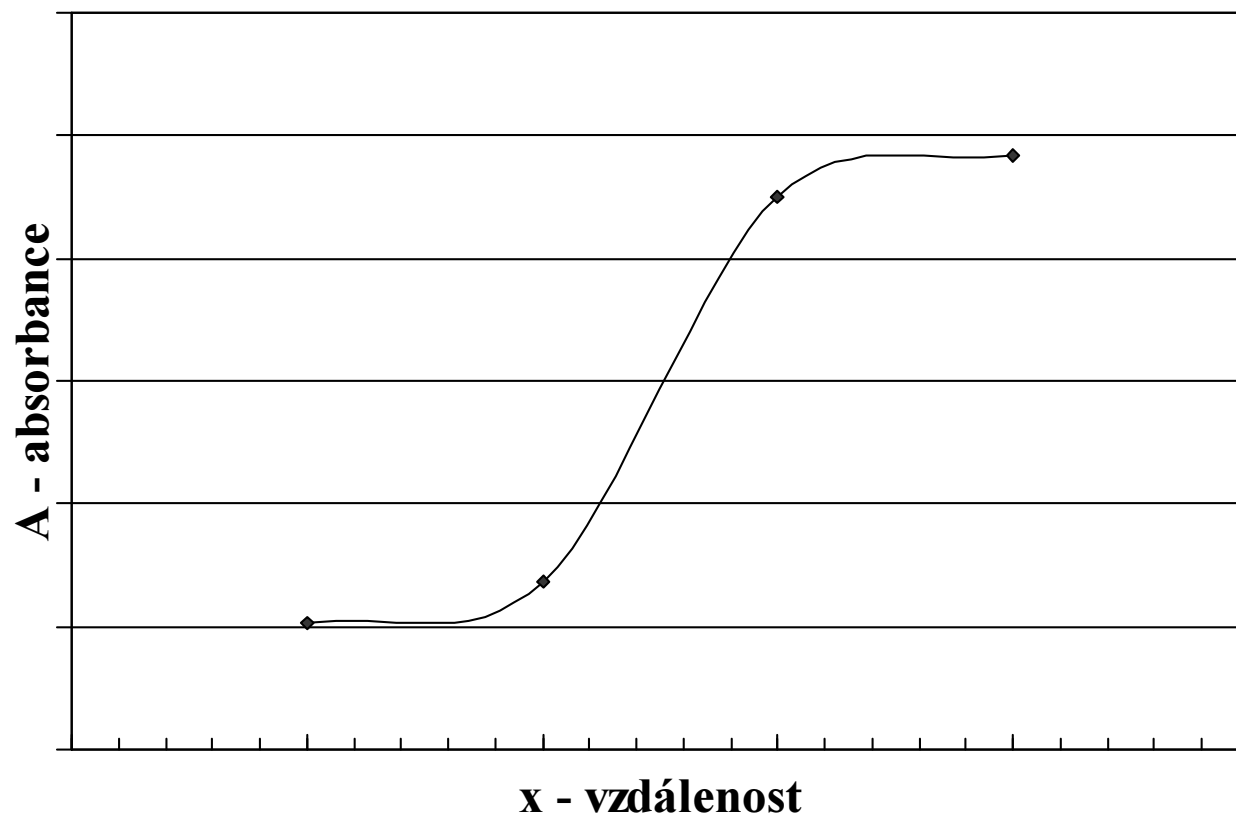
# Analytická ultracentrifugace



# Metoda sedimentační rovnováhy



# Metoda sedimentační rychlosti





# Fázové separace

# Odstranění H<sub>2</sub>O rotační vakuová odparka



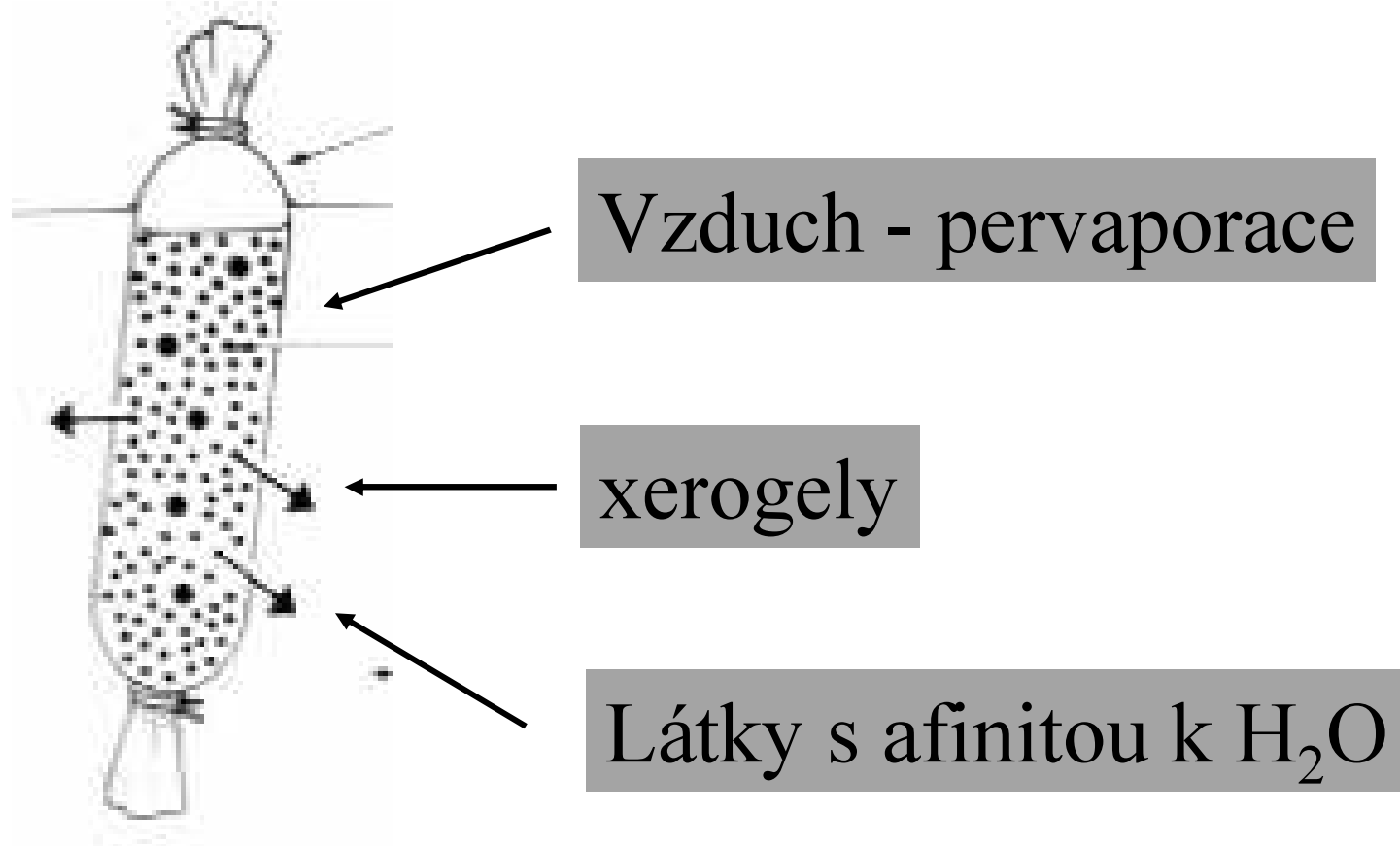
# Odstranění H<sub>2</sub>O lyofilizace

- Namražení
- Mrazová sublimace



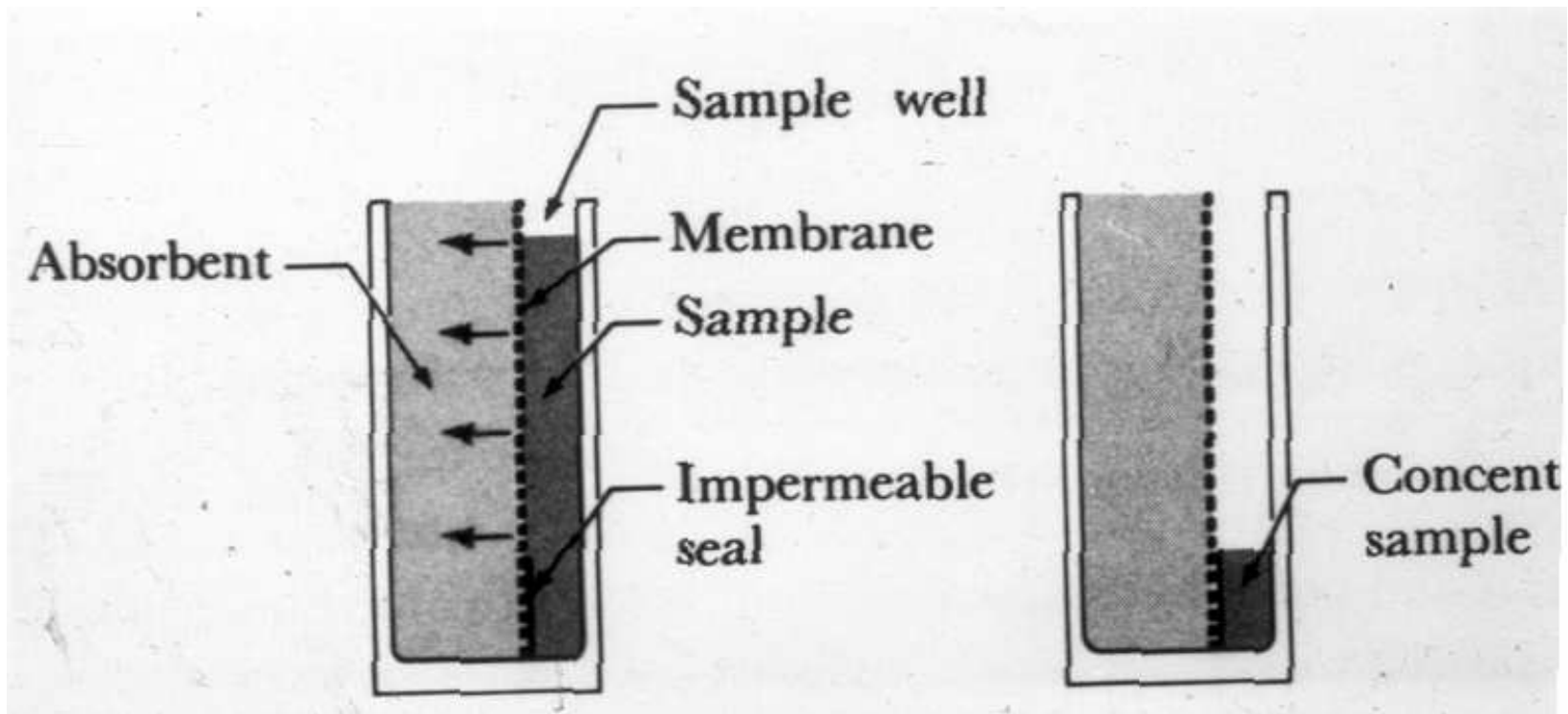
# Odstranění H<sub>2</sub>O zahuštění

Použití semipermeabilní membrány



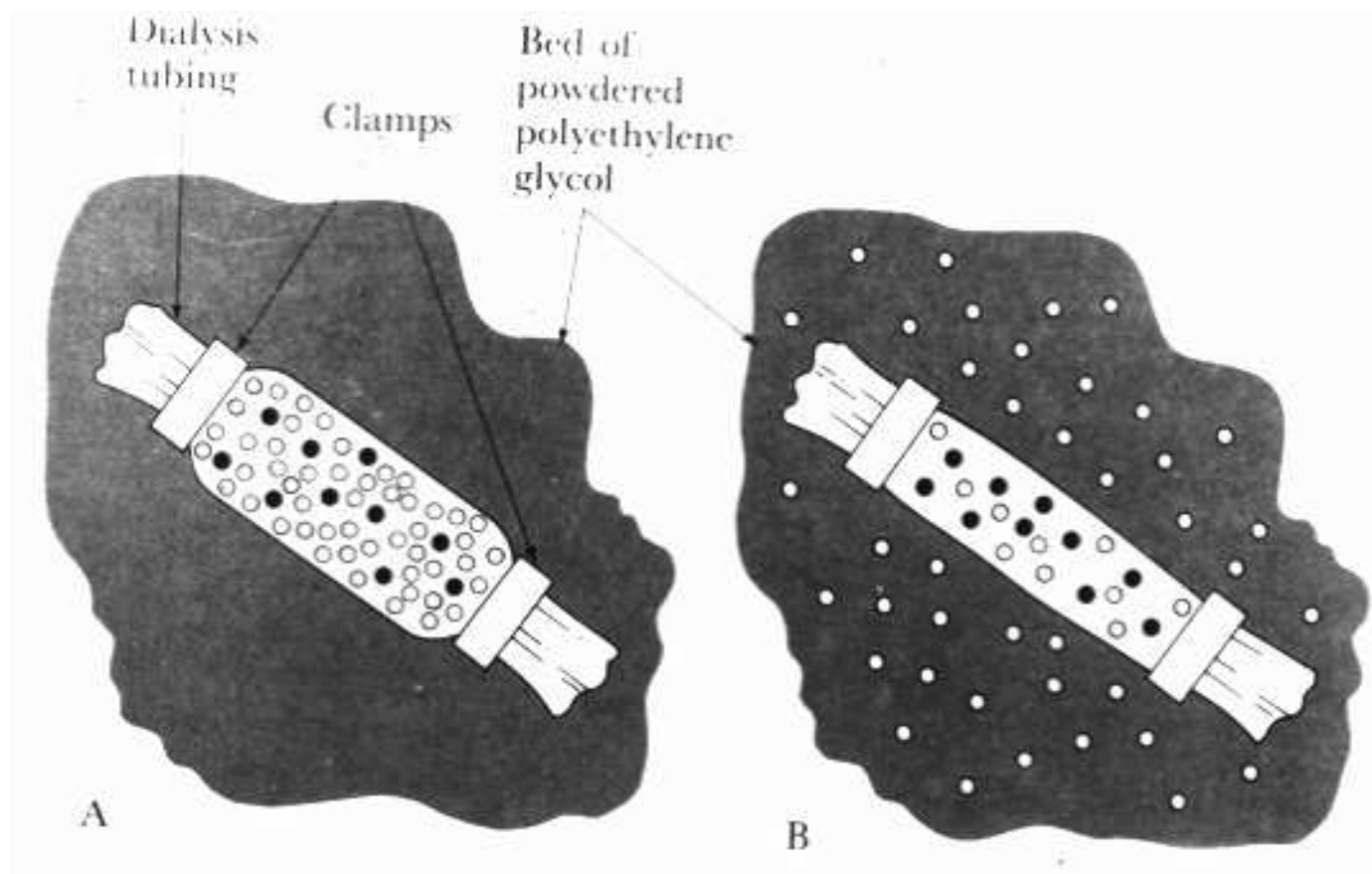
# Odstranění H<sub>2</sub>O zahuštění

Použití semipermeabilní membrány



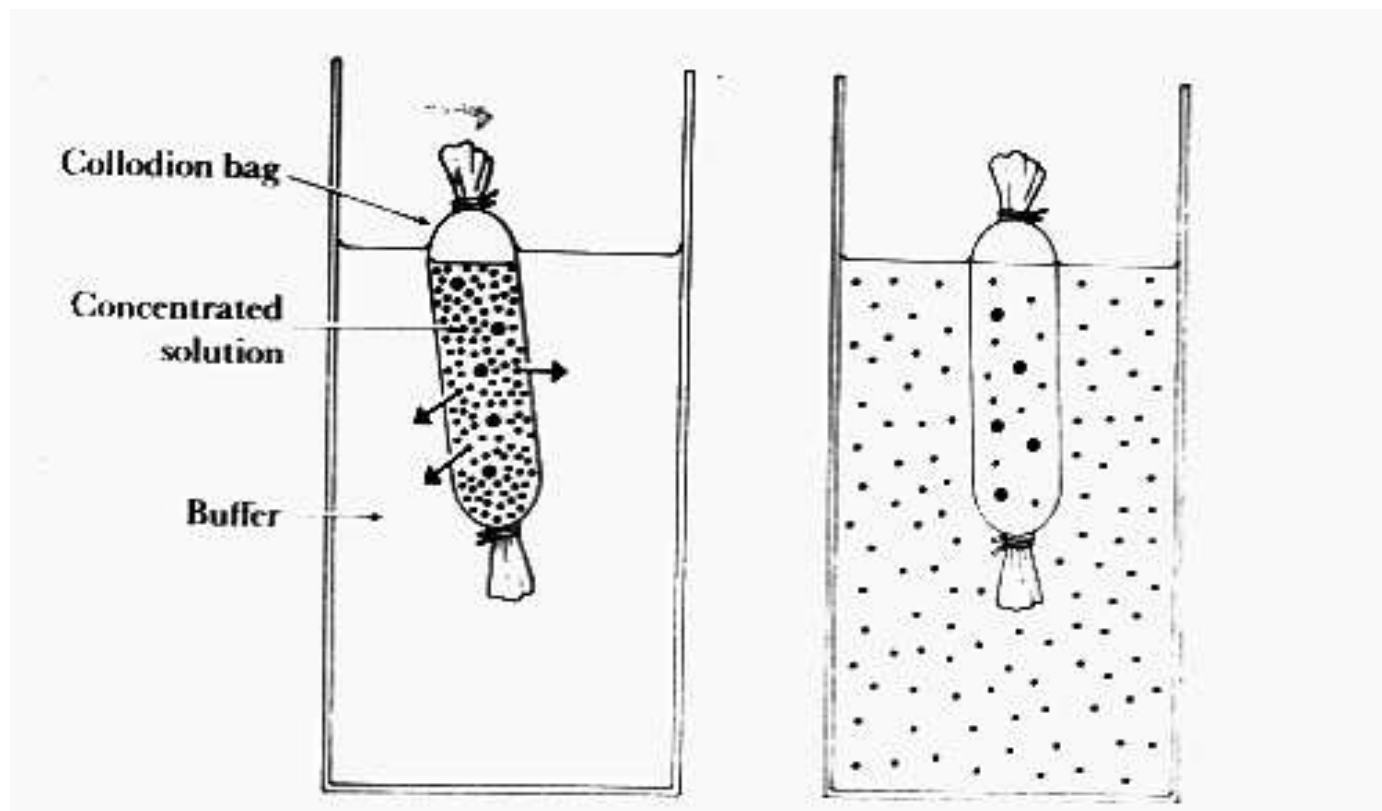
# Odstranění H<sub>2</sub>O zahuštění

Použití semipermeabilní membrány



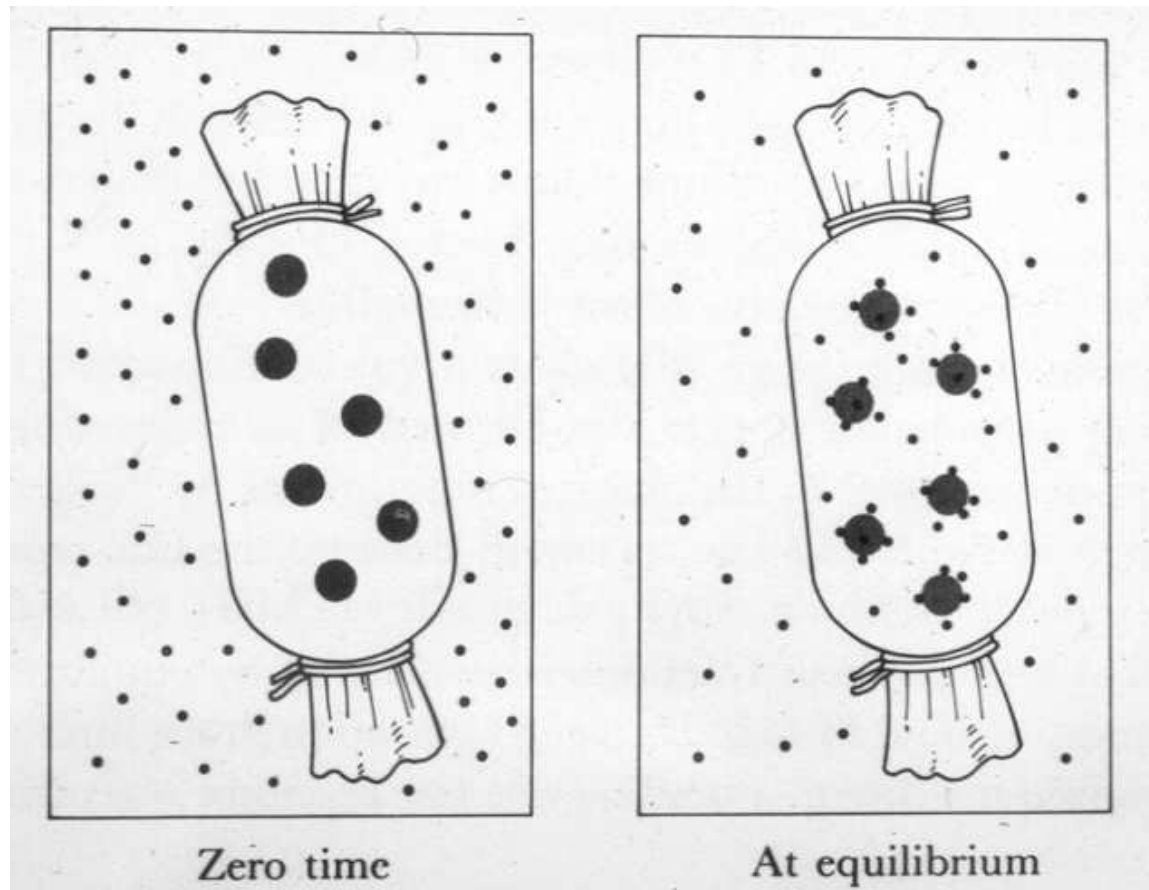
# Odstranění nízkomolekulárních složek

## Dialýza



# Stanovení interakční konstant

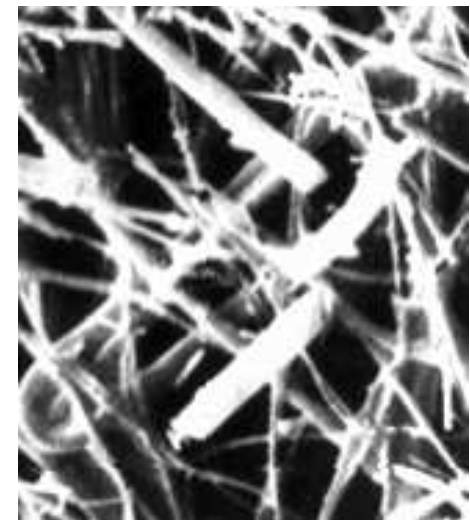
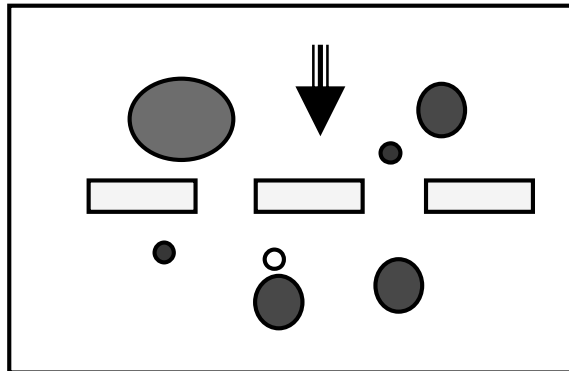
## Rovnovážná dialýza



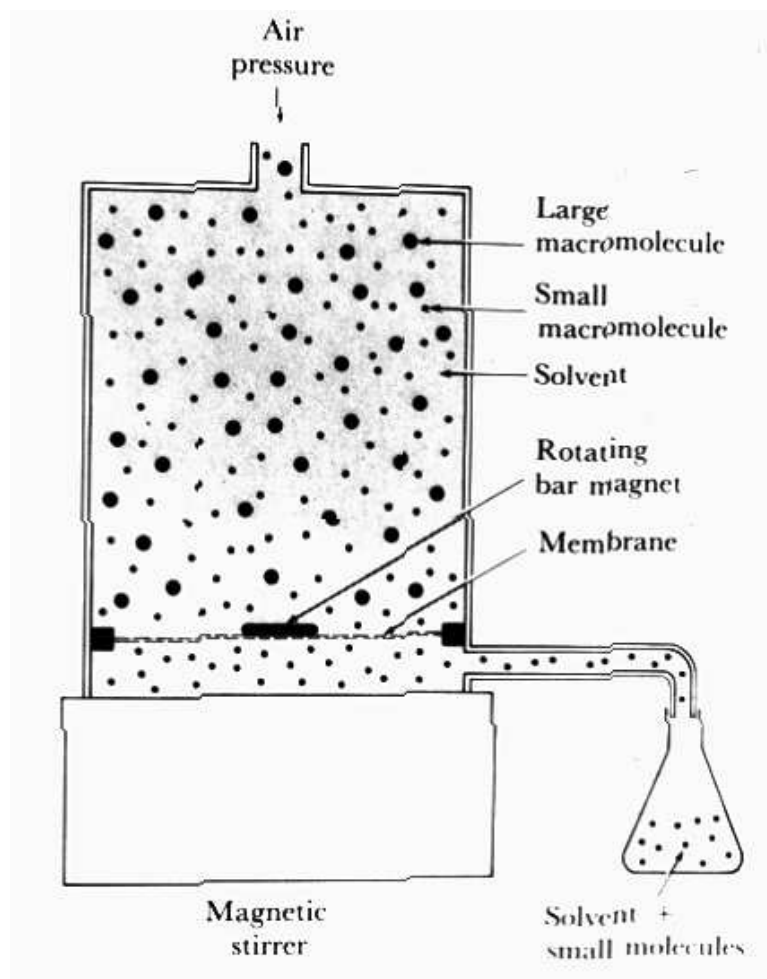


# Ultrafiltrace

Použití speciálních membrán s definovanou velikostí pórů - tzv. cut-off limit



# Ultrafiltrace míchané cely

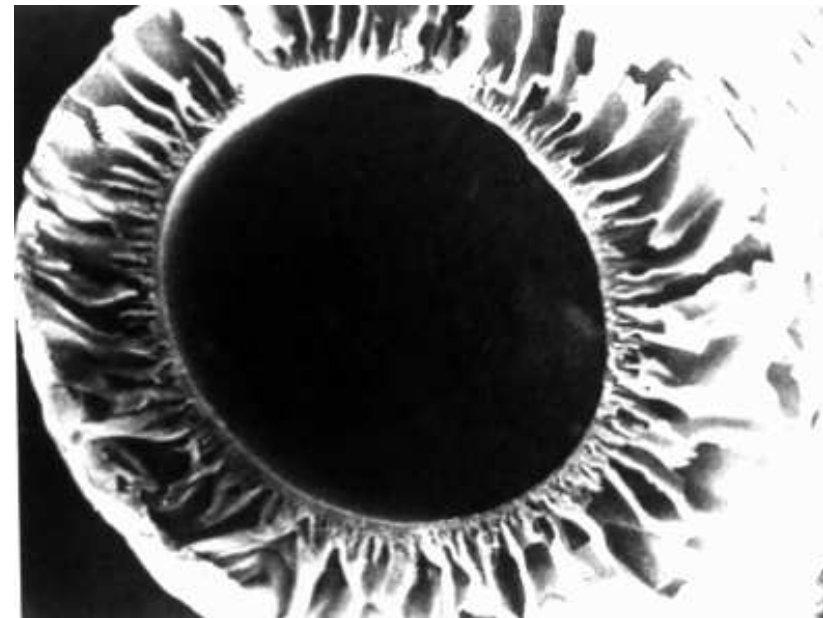
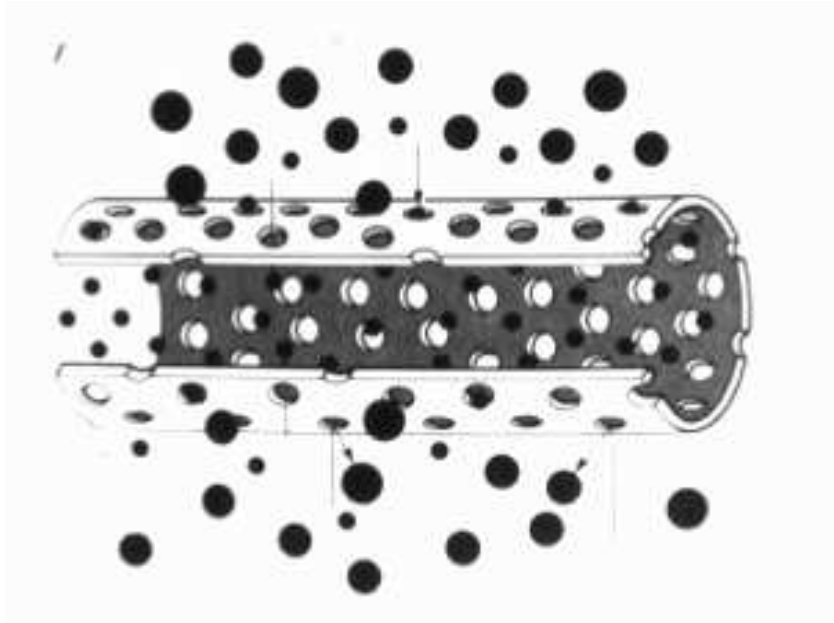


# Ultrafiltrace centrifugační přípravky



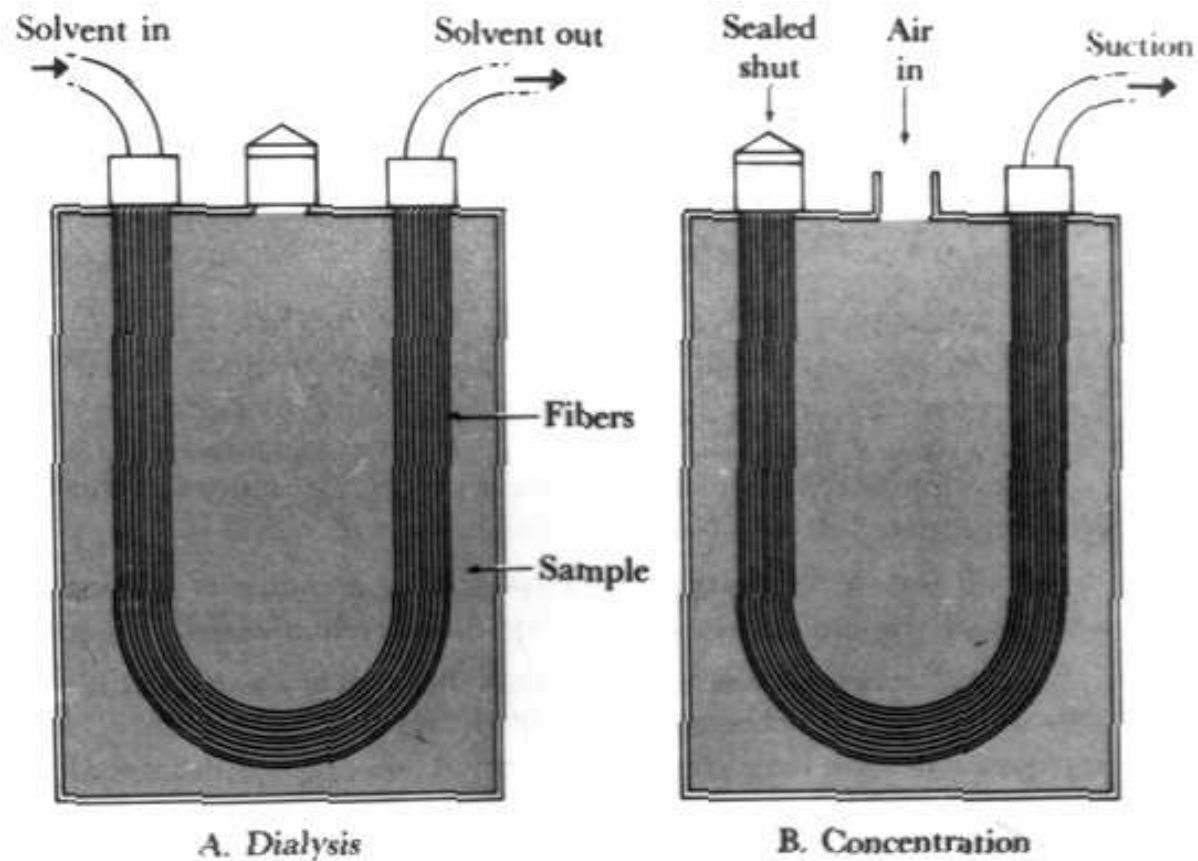
# Ultrafiltrace

Hollow fiber – dutá vlákna



# Ultrafiltrace

Hollow fiber – dutá vlákna



# Příprava laboratorní vody

# Nečistoty ve vodě

- Soli – těžké kovy - denaturace
- Organické látky – HPLC, GC
- Hrubší částice – mikroorganismy
- Koloidní částice - biomakromolekuly

# Kriteria čistoty

- Vodivost – 18 M $\Omega$ /cm
- Těžké kovy – AAS
- Pyrogenita

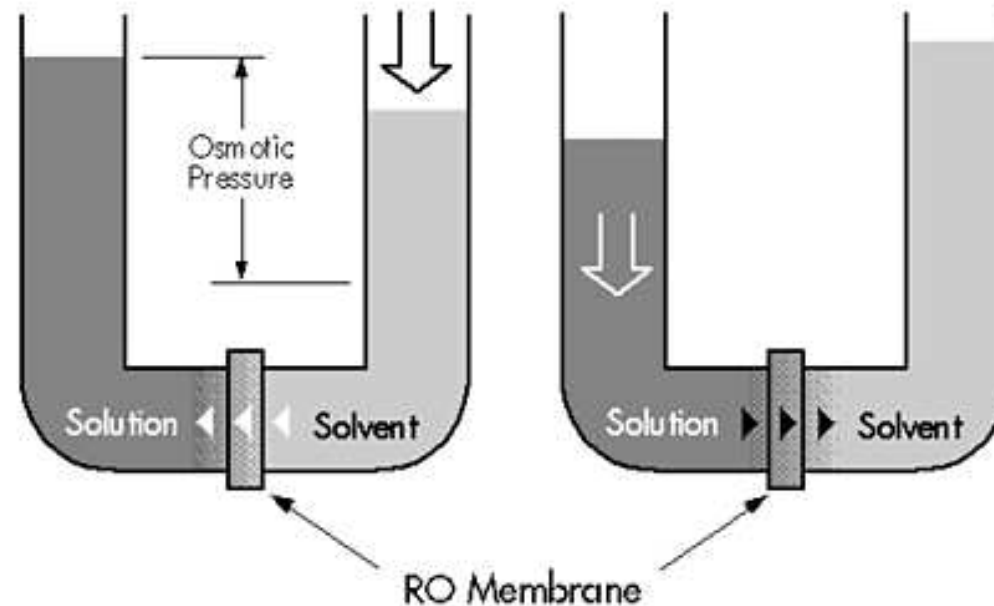


# Postupy čištění destilace

- Destilace – teoreticky odstraní všechny složky, prakticky jsou strhávány těžké kovy z elektrod (Cu, Zn, Fe)
- Redestilace – křemenné aparatury

Nevýhoda – náklady na vodu a elektrickou energii

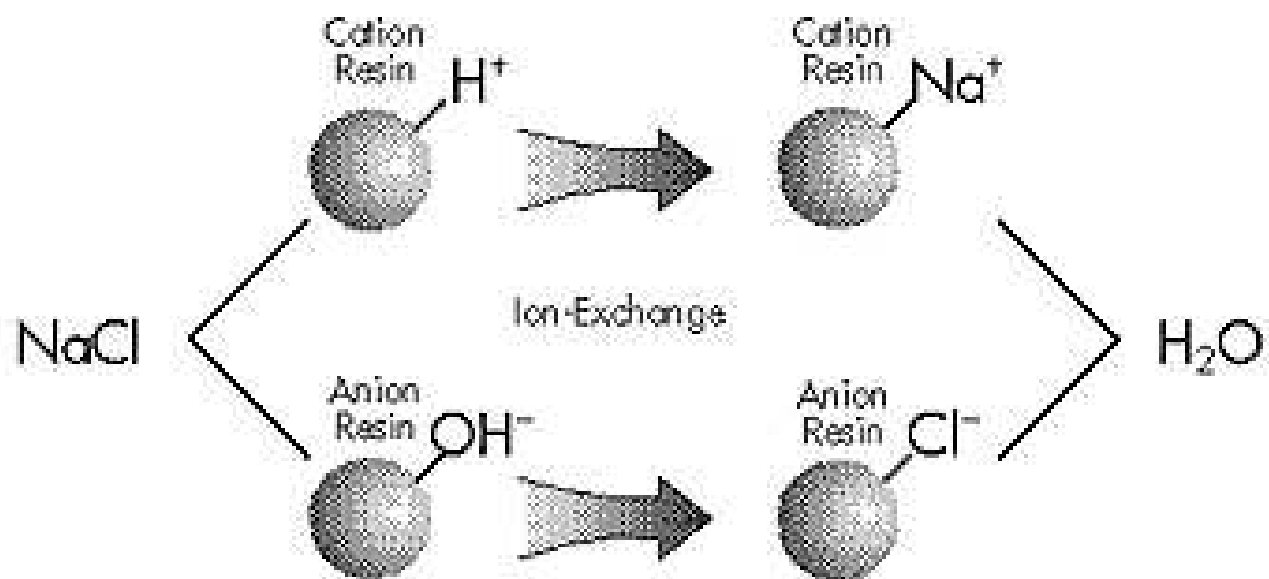
# Postupy čišťení reverzní osmoza



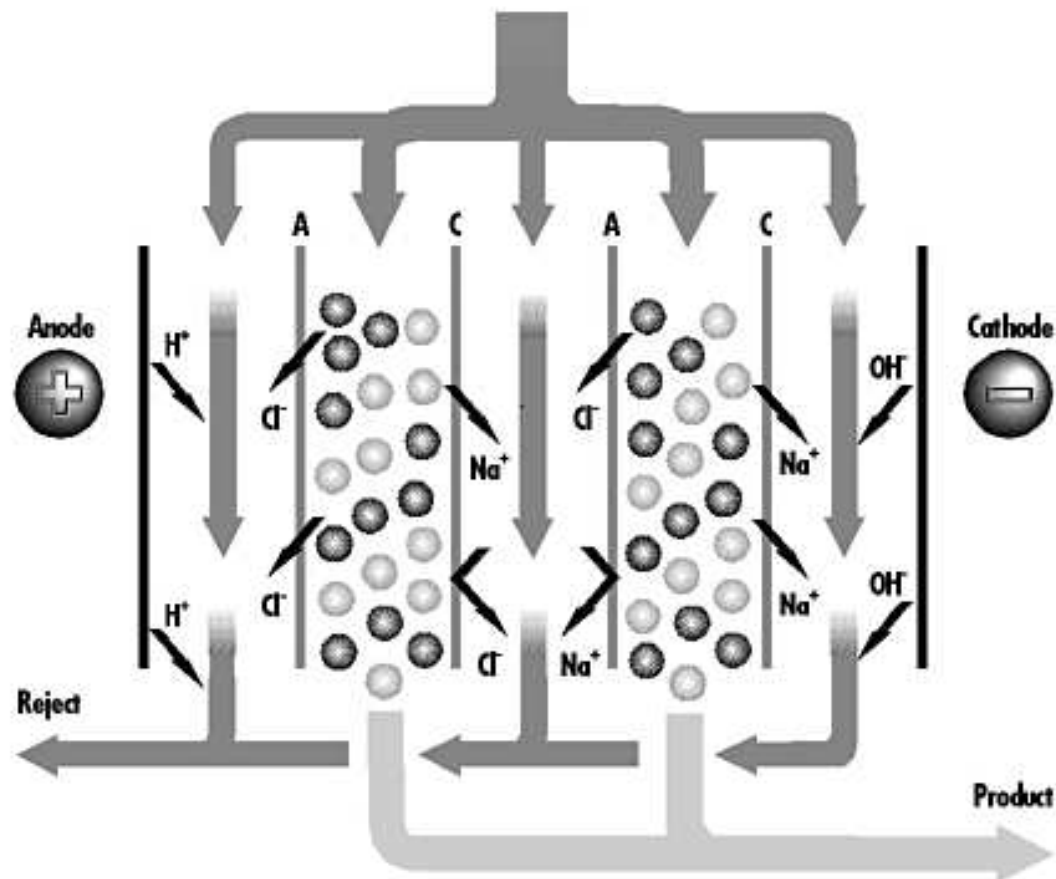
- Nevýhoda – malá kapacita, nevyčistí úplně

# Postupy čišťení deionizace

- Kolony se směsnými ionexy – katex + anex



# Postupy čišťení elektrodeionizace

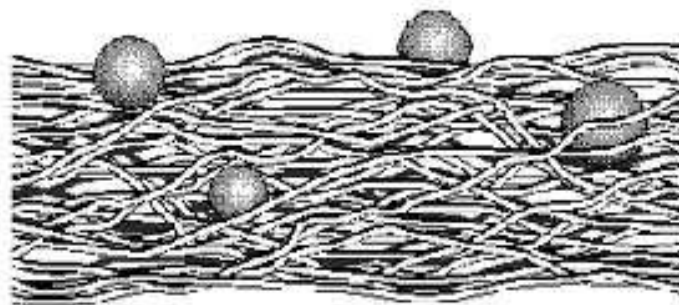


# Postupy čištění odstraňování org. látek

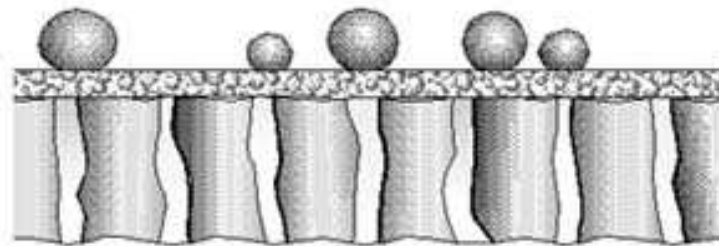
- Speciální patrony s aktivním uhlím a jinými sorbenty
- UV – 180 nm + 254 nm
  - oxidace org. látek,
  - likvidace bakterií

# Postupy čištění filtrace

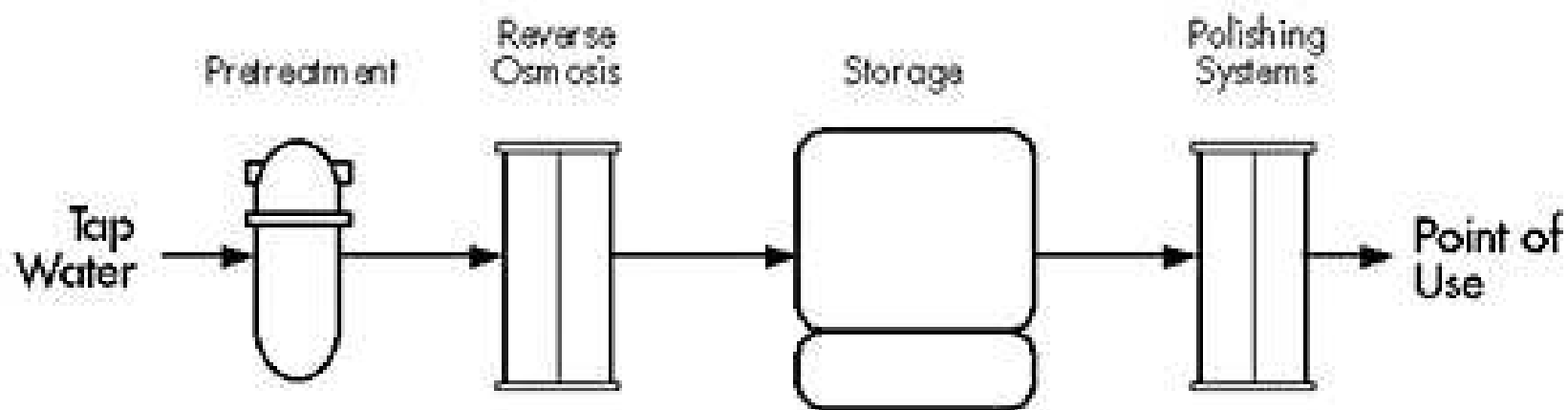
- Membránová – větší póry – bakterie



- Ultrafiltrace – malé póry - koloidní částice



# Kaskádový systém kombinace



# Kaskádový systém kombinace

## Millipore

### Direct-Q™ Ultrapure Water Systems

Purify tap water to Type I water  
in a single, compact system

#### Find it Quick!

- ▶ Direct-Q Applications
- ▶ System Specifications
- ▶ Ordering Information

