

Studium přítomnosti proteinů v buňkách (analýza proteomu)

Metody pro stanovení fyzické přítomnosti proteinů:

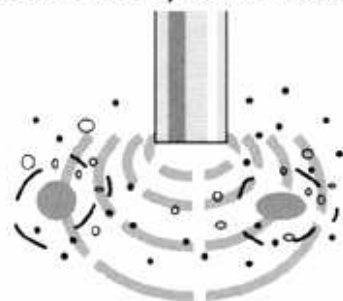
- polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)
- westernový přenos
- imunoprecipitace
- imunohistochemie
- izoelektrická fokusace
- dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
- chromatografie
- fluorescenční a elektronová mikroskopie
- průtoková cytometrie

ROZBÍJENÍ BUNĚK A TKÁNÍ

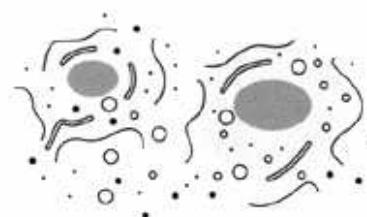
Prvním krokem purifikace většiny proteinů je rozbití buněk nebo tkáně

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.

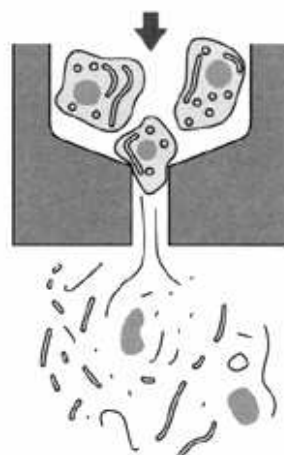
Vznikající hustý homogenát nebo extrakt obsahuje větší i menší molekuly z cytosolu, jako jsou enzymy, ribosomy a různé metabolity, ale také membránou uzavřené organely.



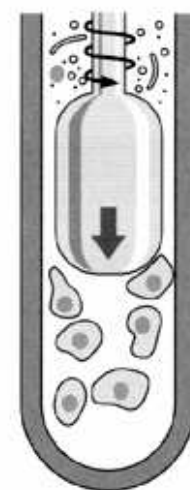
- ① rozbití buněk ultrazvukem



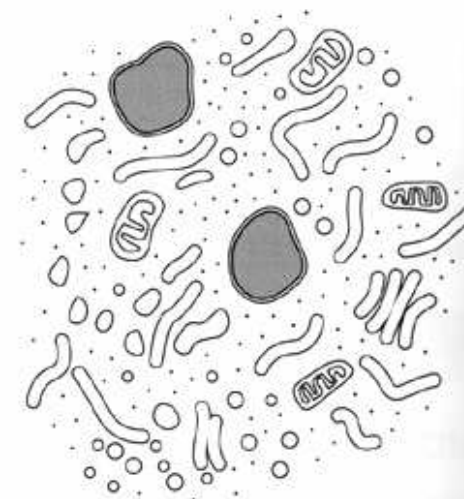
- ② použití mírného detergentu na perforaci plasmatické membrány



- ③ protlačení buněk malým otvorem



- ④ rozbití buněk dobře těsnícím rotačním pístem v tlustostěnné nádobce



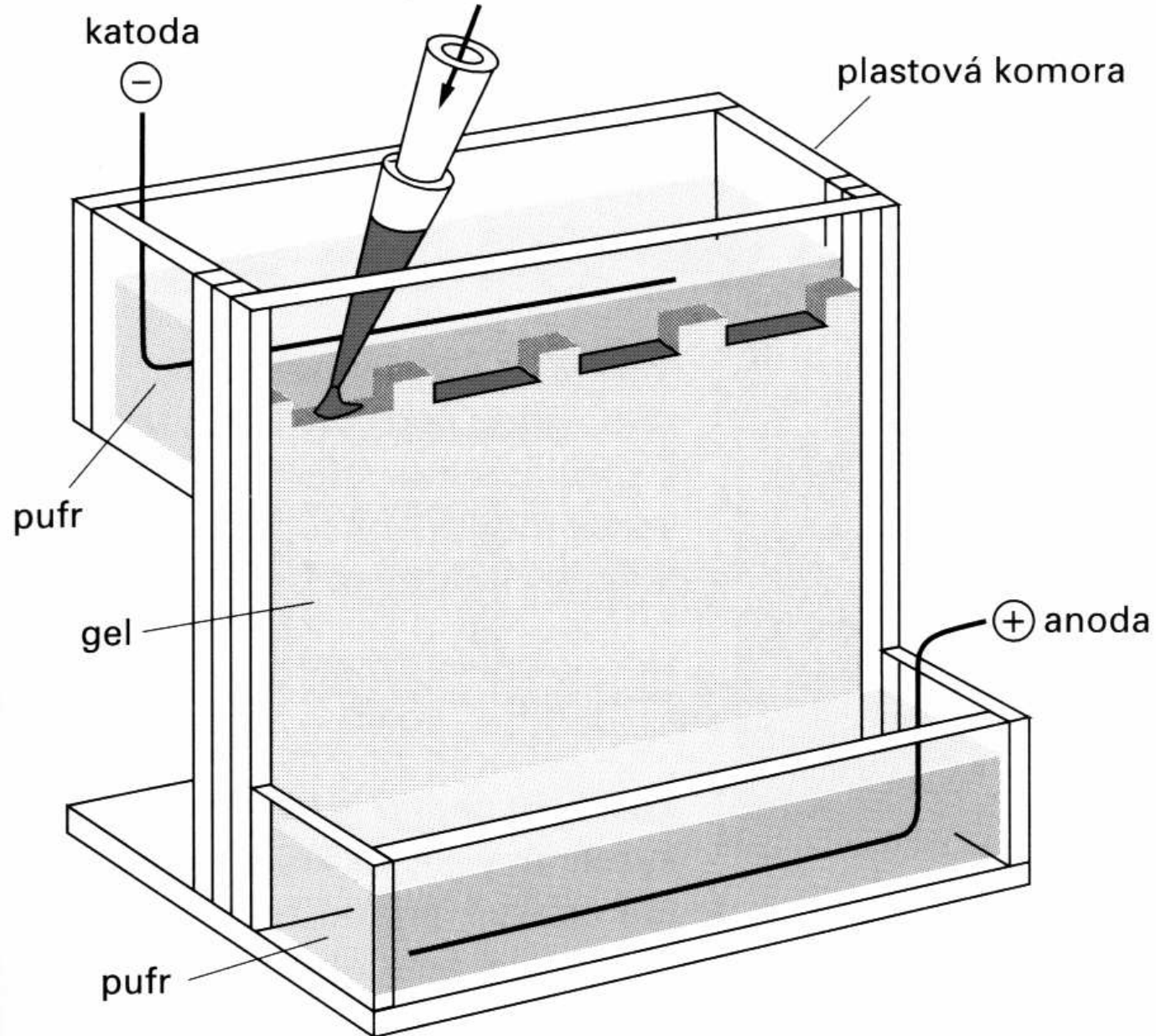
Při opatrné práci lze získat téměř všechny organely v neporušeném stavu.

Elektroforetické techniky

- založeny na schopnosti pohybu nabitých molekul v elektrickém poli
- proteiny se obvykle rozdělují polyakrylamidovou gelovou elektroforézou
- polymerovaný gel se vloží mezi dvě nádoby naplněné pufrem, do kterých se ponoří elektrody
- u deskové varianty se vzorky nanesou do jamek na horní straně gelu
- používají se alkalické pufry, které proteinům udělí **negativní náboj** - v elektrickém poli pohyb směrem k anodě

GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

vzorek se nanáší na gel
speciální pipetou



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

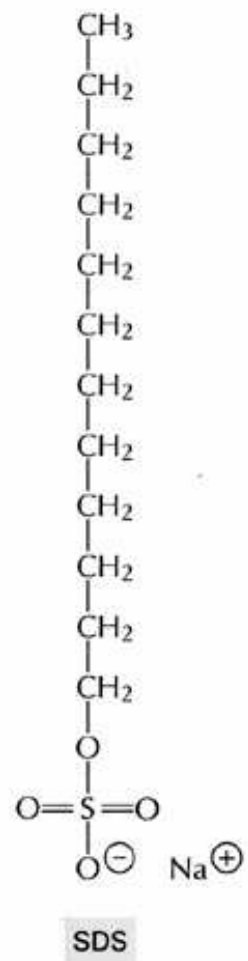
SDS -polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Důsledky vazby SDS na molekuly proteinu:

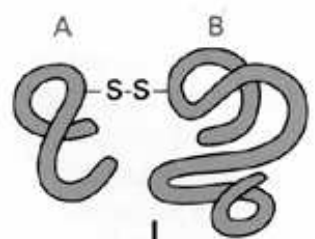
- elektrostatické odpuzování molekul SDS způsobí natažení proteinu (denaturaci) a eliminuje se tak vliv tvaru proteinu na pohyblivost
- počet molekul SDS navázaných na protein je zhruba úměrný jeho molekulové hmotnosti. Proto má každý protein, bez ohledu na svou velikost, ekvivalentní hustotu náboje.
- 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



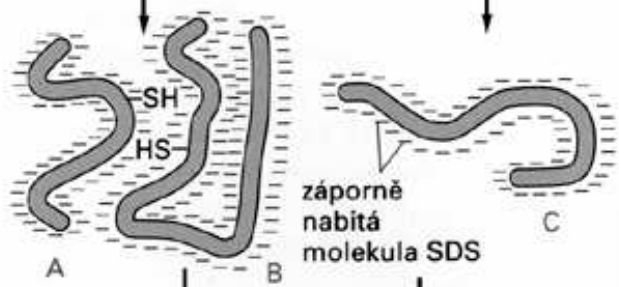
protein s dvěma
podjednotkami A a B
spojenými disulfidovou
vazbou



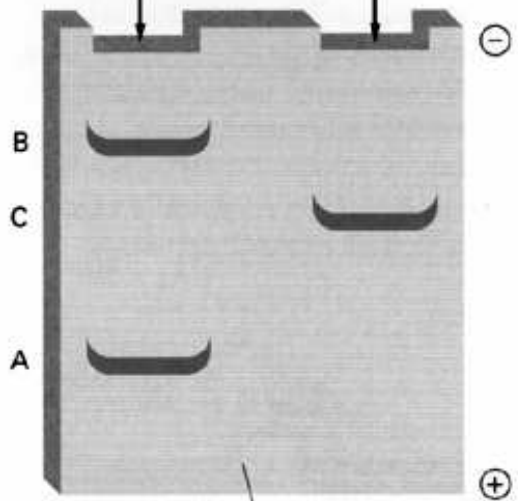
samostatná
podjednotka



zahřátí s SDS a merkaptoethanolem



polyakrylamidová gelová elektroforéza



destička polyakrylamidového gelu

Zviditelnění proteinů separovaných PAGE

- **nespecificky**: obarvení všech proteinů ve vzorku proteinovými barvivy
- **specificky**: westernový přenos (detekce specifických proteinů protilátkami)

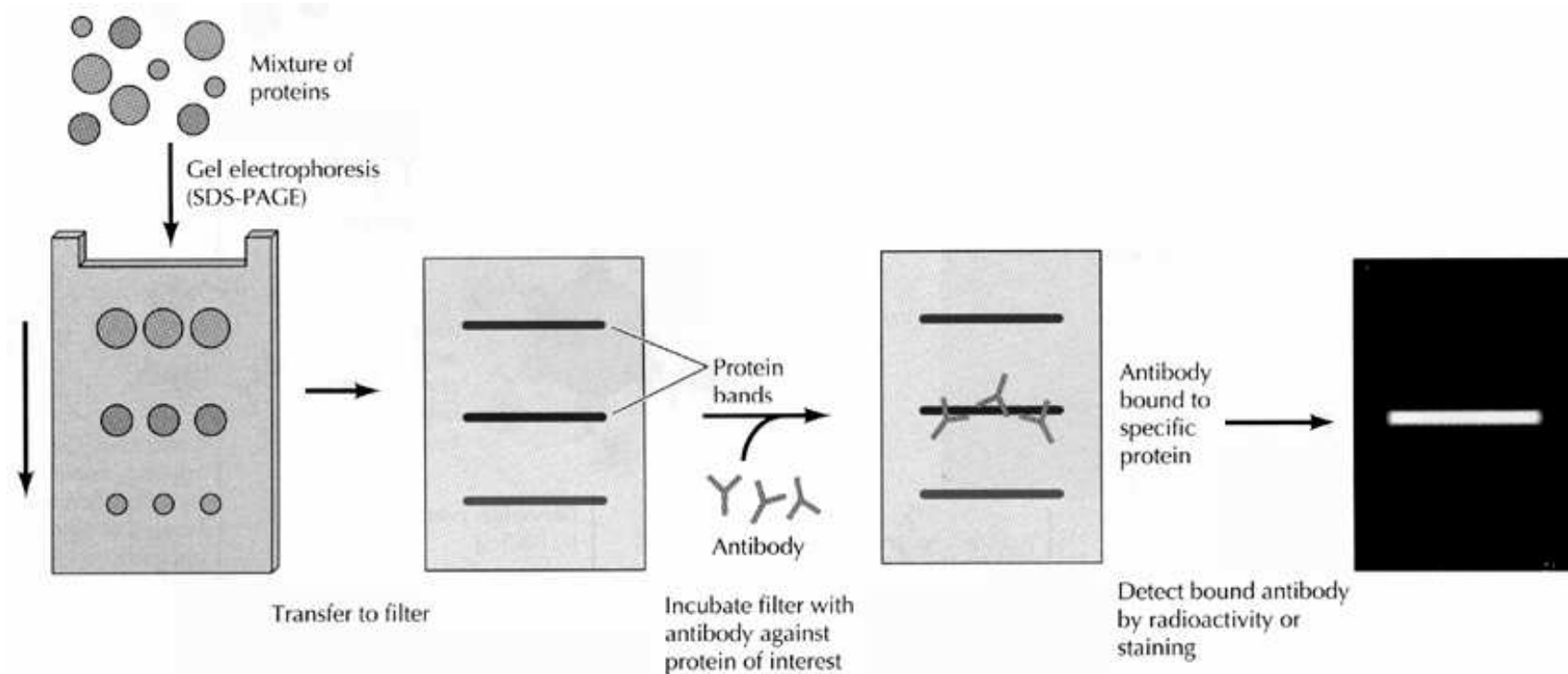
Nespecifické barvení proteinů v gelech:

- stříbro, „coomassie brilliant blue“

Specifické barvení proteinů při westernovém přenosu:

- přenos rozdělených proteinů z gelu na pevný filtr (**elektroblotting**)
- navázání protilátky na příslušný antigen při promývání filtru v roztoku specifické primární protilátky (protilátka musí rozeznat lineární epitop - protein je denaturován)
- zviditelnění protilátky na filtru např. **radioaktivní sondou** nebo **sekundární protilátkou konjugovanou s určitým enzymem**

Zviditelnění proteinů westernovým přenosem

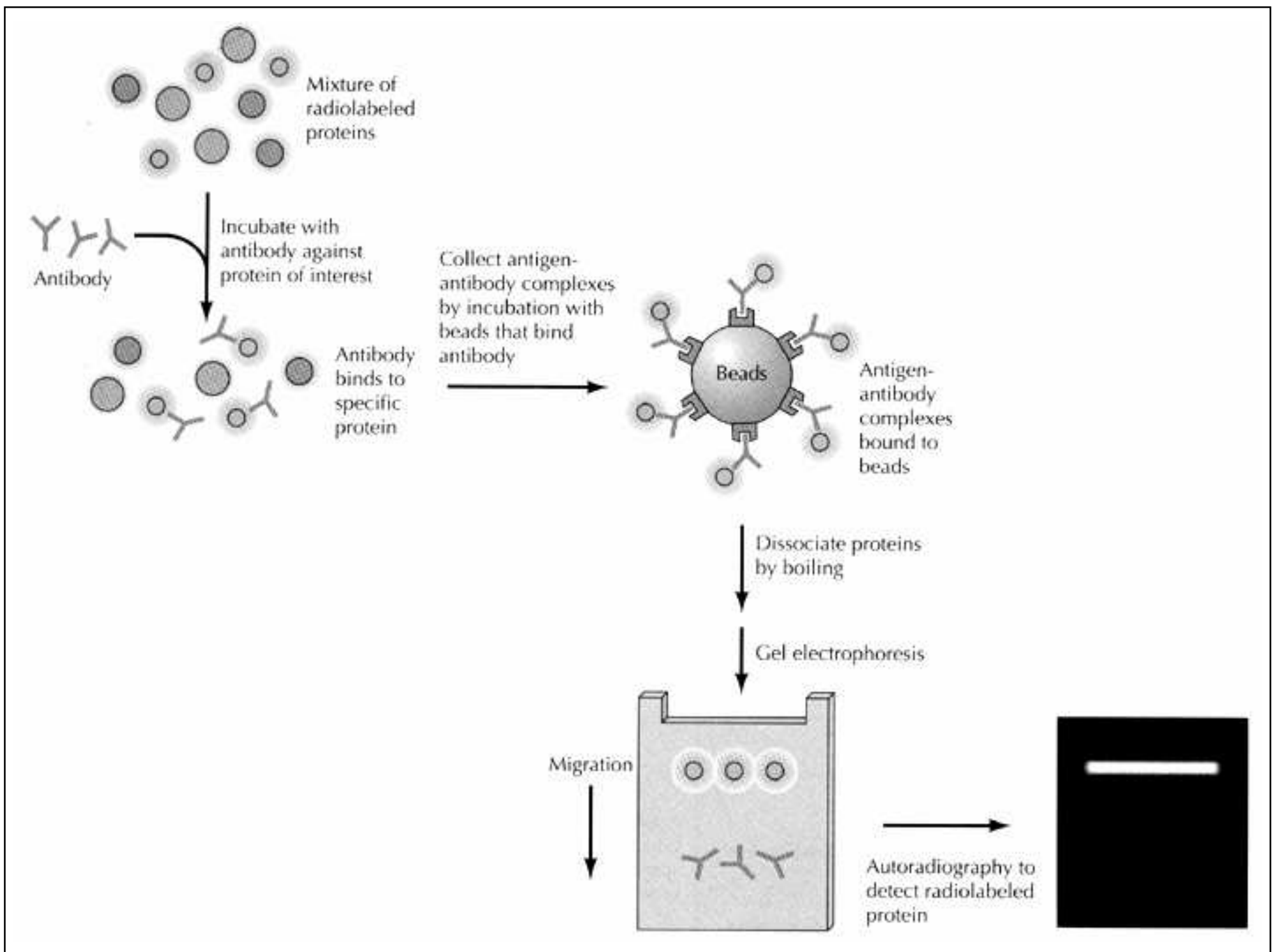


Imunoprecipitace

- technika izolace specifických proteinů z proteinových směsí prostřednictvím protilátek

Obvyklý postup:

- označení buněčných proteinů inkubací buněk za přítomnosti radioaktivně značených aminokyselin (není nutné, pokud jsou k dispozici jiné metody pro detekci vysrážených a od protilátek oddělených proteinů)
- lýze buněk
- inkubace buněčných extraktů, které obsahují značené proteiny s protilátkou specifickou pro cílový protein
- vytvořené komplexy se oddělí od zbytku extraktů prostřednictvím kuliček vážoucích imunoglobuliny
- varem se cílové proteiny oddělí od imunoglobulinů a kuliček
- elektroforéza, autoradiografie (westernový přenos)



Použití imunoprecipitace pro studium meziproteinových interakcí

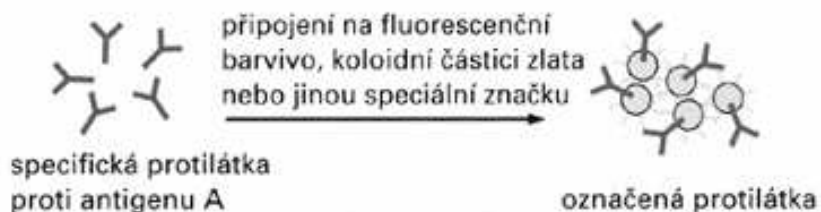
- technika kombinující imunoprecipitaci za nativních podmínek a westernový přenos

Obvyklý postup:

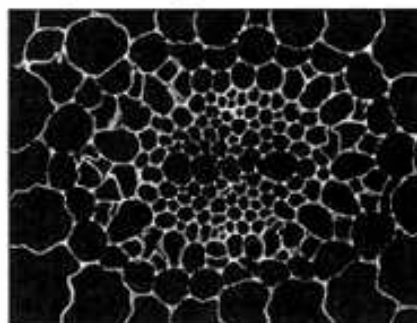
- precipitace cílového proteinu z buněčných extraktů protilátkou za takových podmínek, které neničí vazby mezi proteiny
- cílový protein bude precipitován v komplexu se svými přirozenými partnery
- purifikované komplexy se denaturují a podrobí SDS-PAGE
- přítomnost současně precipitovaných partnerských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

Imunohistochemie

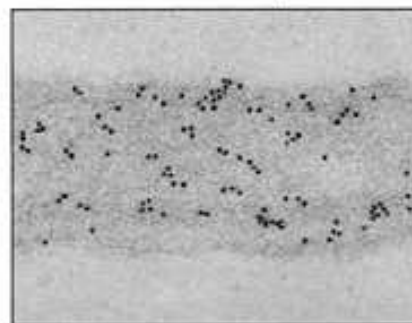
- určení, ve kterých buňkách je daný protein přítomen (obdoba hybridizace nukleových kyselin *in situ*)
- určení, v které části buňky je daný protein přítomen (membránový, cytoplazmatický, jaderný) - lokalizace naznačuje funkci



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 podpůrným médiem je 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:

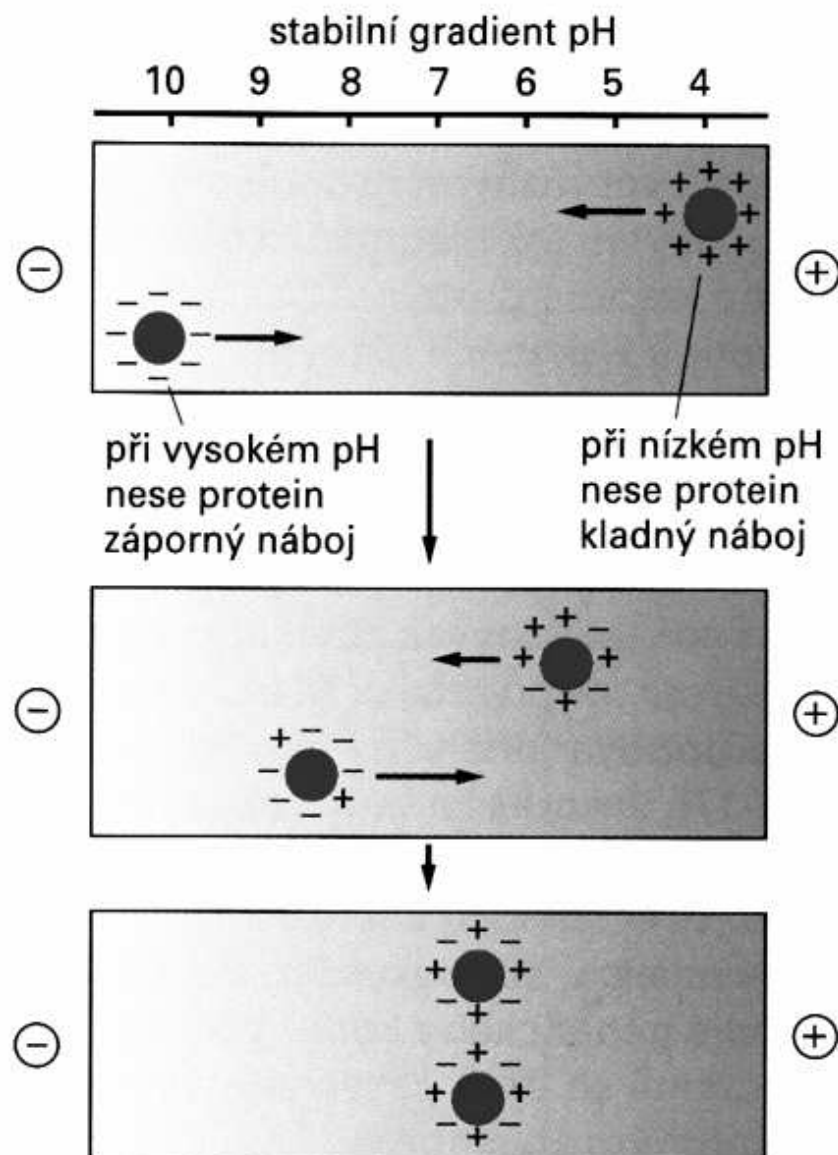
- proteiny se pohybují gelem a jsou vystaveny gradientu pH
- změnou pH se mění iontový náboj, který proteiny nesou
- protein se dostane do oblasti takového pH, při kterém nemá žádný náboj (**je v izoelektrickém bodu**) a jeho pohyb se zastaví

Výhoda:

- protein je soustředěn do velmi ostrého proužku

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

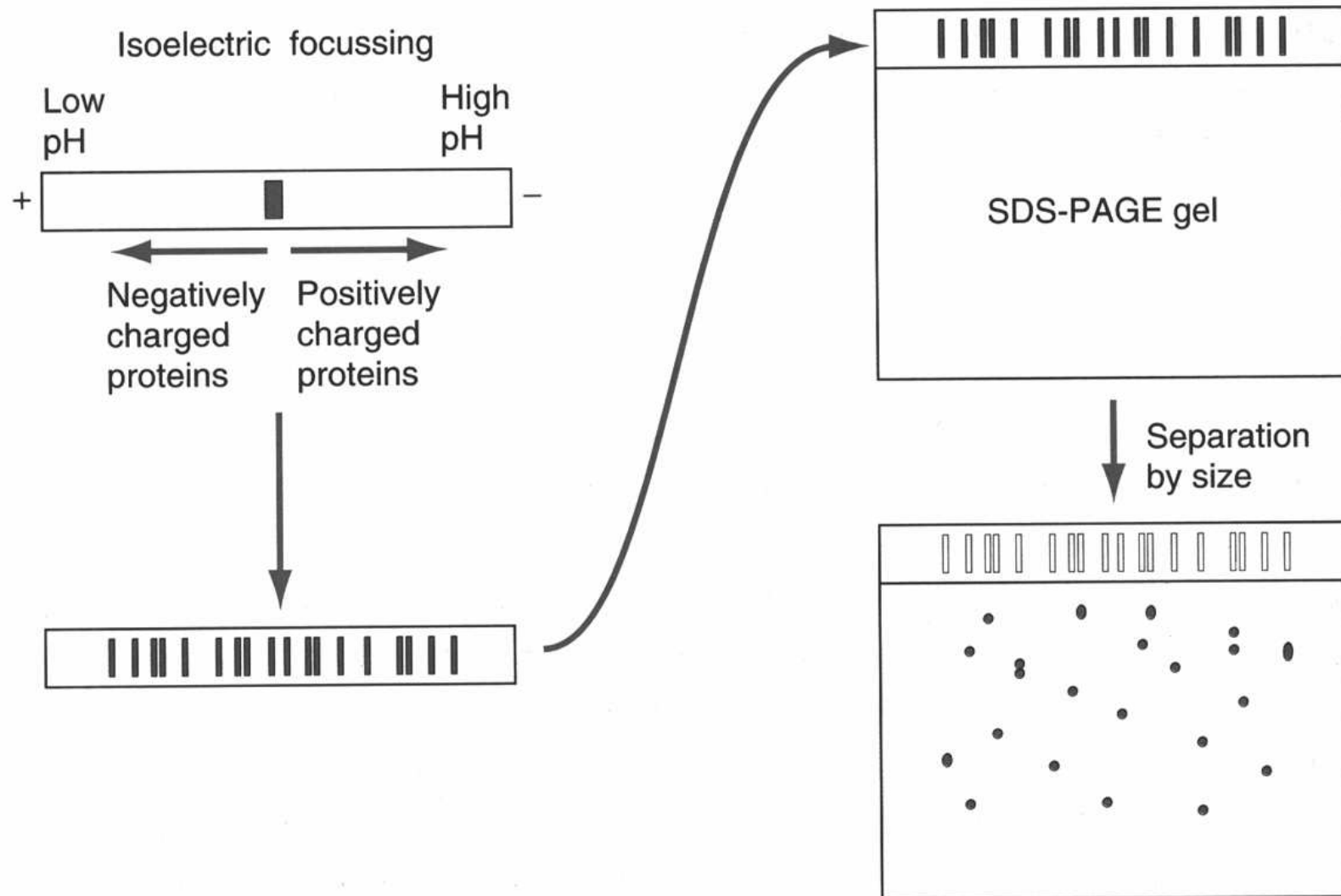
- pro dělení komplexních směsí proteinů, které nelze řádně rozdělit jednorozměrnou elektroforézou
- možno srovnat úplný proteom v buňkách vystavených různým podmínkám, v buňkách zdravých a nemocných, zjistit změny proteomu v průběhu diferenciaci, apod.

Obvyklý 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

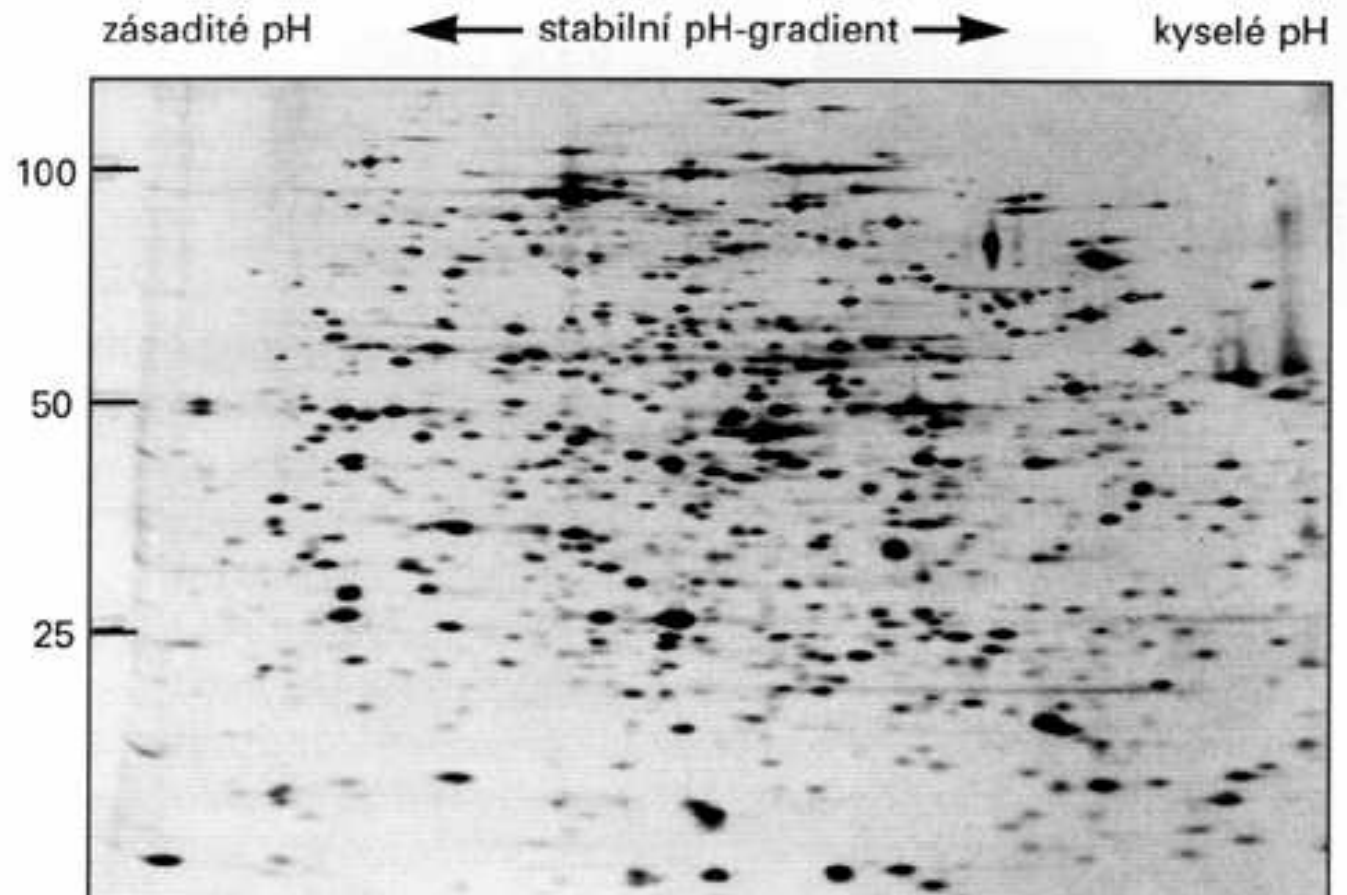
Dvourozměrná elektroforéza proteinů



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.

Migrace v SDS-gelu
(molární hmotnost $\times 10^{-3}$)
↓



Sloupcová chromatografie

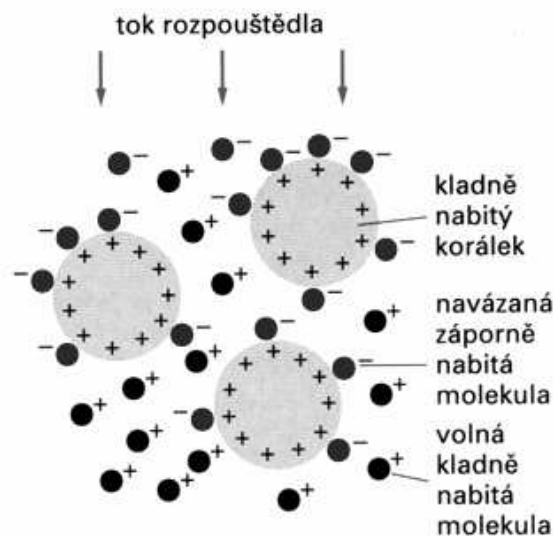
Obvyklý postup:

- směs proteinů v roztoku se pomalu nalévá na válcovou kolonu naplněnou propustnou pevnou matricí ponořenou do rozpouštědla
- kolona se promývá
- různé proteiny mají různou míru afinity s náplní kolony a proto je lze odděleně sbírat při výtoku z kolony
- podle typu náplně můžeme proteiny dělit např. podle velikosti nebo podle schopnosti vázat se na určité chemické skupiny náplně

Tři druhy sloupcové chromatografie

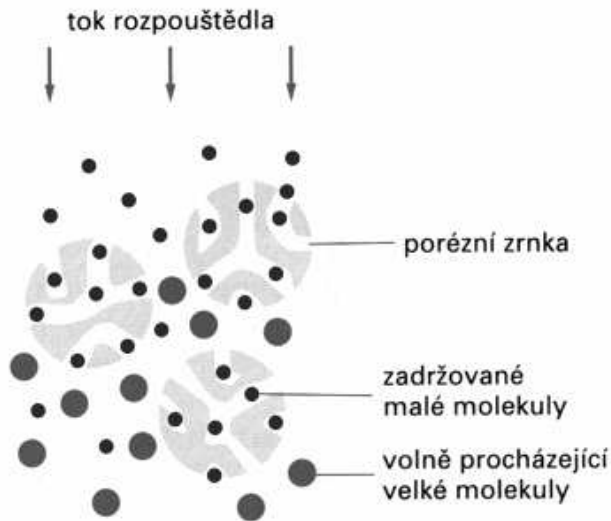
- **iontoměničová**: podle náboje, vazba mezi proteinem a náplní kolony závisí na pH a iontové síle roztoku
- **gelová**: podle velikosti
- **afinitní**: náplň je opatřena molekulami, které specificky interagují s cílovým proteinem (např. protilátka/antigen, enzym/substrát)

Tři druhy sloupcové chromatografie



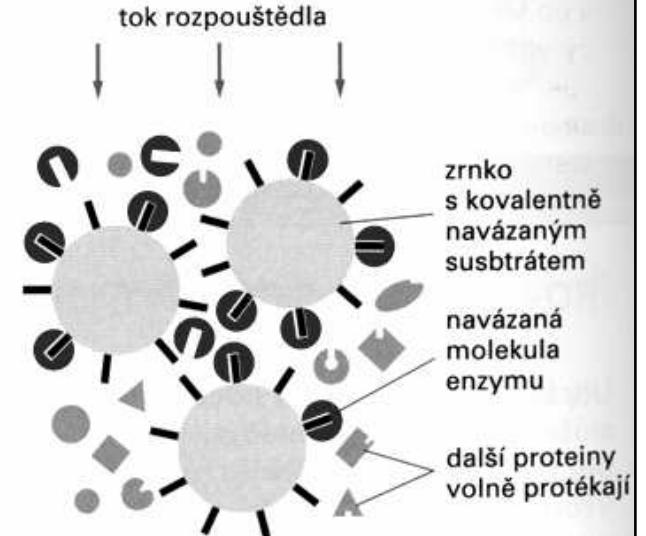
(A) IONTOMĚNIČOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Kolony jsou naplněny iontoměničem s navázanými kladnými nebo zápornými náboji tak, aby zadržovaly proteiny s opačnou polaritou. Vazba mezi proteinem a náplní kolony závisí na pH a iontové síle roztoku, který kolonou protéká. Ty lze regulovat tak, aby se dosáhlo účinné separace.



(B) GELOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Při gelové filtraci se dělí proteiny podle velikosti. Náplň se tady skládá z porézních zrněk, kdy malé molekuly proteinů mohou vstupovat do pórů, a jsou tak zadržovány v postupu kolonou. Proteiny, které jsou větší a nemohou pronikat do porézních zrněk, procházejí kolonou rychleji.



(C) AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

Kolony pro afinitní chromatografii obsahují náplň, která je kovalentně vázána k molekulám, jež specificky reagují se studovaným proteinem (např. protilátkou nebo substrátem enzymu). Proteiny specificky navázané v koloně lze pak uvolnit změnou pH nebo koncentrace solného roztoku, kterým se kolona promývá. Proteiny pak získáme zcela čisté.

Proteomika

- určuje úplný profil všech proteinů, které daný organismus (buňka) vytváří za definovaných podmínek
- na rozdíl od genomu, který se neliší v buňkách téhož organismu, je proteom proměnlivý podle vnějších a vnitřních faktorů

Proteomické přístupy

- dvourozměrná elektroforéza
 - definování proteinů rozdělených na gelu (určení sekvence aminokyselin, westernový přenos)
- nebo
- štěpení eluovaných proteinů proteolytickým enzymem a stanovení molekulové hmotnosti vzniklých peptidů hmotnostní spektrometrií, srovnání hmotnostních spekter s databázemi - identifikace proteinu

Průtoková cytometrie

Co dokáže?

- spočítat buňky v suspenzi
- rozlišit živé buňky od mrtvých
- vyhodnotit více než 100 buněk za 1 minutu
- zhodnotit míru emitované fluorescence
- frakcionovat buňky podle určitých vlastností, které korelují s mírou fluorescence

Průtoková cytometrie

Účel: Studium vlastností individuálních buněk v buněčné populaci

- míra přítomnosti určitých antigenů (diferenciace)
- míra přítomnosti DNA (buněčný cyklus, apoptóza)
- velikost buněk, přítomnost granulí v cytoplazmě (determinace buněčných typů ve směsích buněk)
- možno využít k frakcionaci buněk dle určitých vlastností (FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorter)

Průtoková cytometrie

Princip: Počítačové zpracování míry fluorescence jednotlivých buněk

Předpoklad: Míra fluorescence odpovídá sledovanému parametru (antigen, DNA...)

Pojmy:

„Flow cytometry“ - měření určité vlastnosti buněk v průběhu jejich toku přístrojem

„Flow sorting“ (Fluorescence-activated cell sorting FACS) oddělování buněk podle jejich vlastností zjištěných v průběhu průtokové cytometrie

FACS není totéž jako průtoková cytometrie (termín označuje jen separaci buněk, ne analýzu)

Průtoková cytometrie

Postup:

- koncentrovaná suspenze buněk je opatřena fluorescenční značkou specifickou pro cílovou molekulu (pro DNA - propidium jodid, pro protein - fluoreskující protilátka)
- buněčná suspenze je rozdělena na malé kapičky (každá z nich obsahuje jednu buňku) ultrazvukem
- jednotlivé kapičky jsou ozářeny laserovým paprskem - dojde k excitaci fluorescenční značky a emisi fluorescence
- měření míry fluorescence pro každou buňku (určuje míru přítomnosti cílové molekuly)
- měření míry rozptylu světla pro každou buňku (určuje míru granulace cytoplazmy, velikost a tvar buňky)

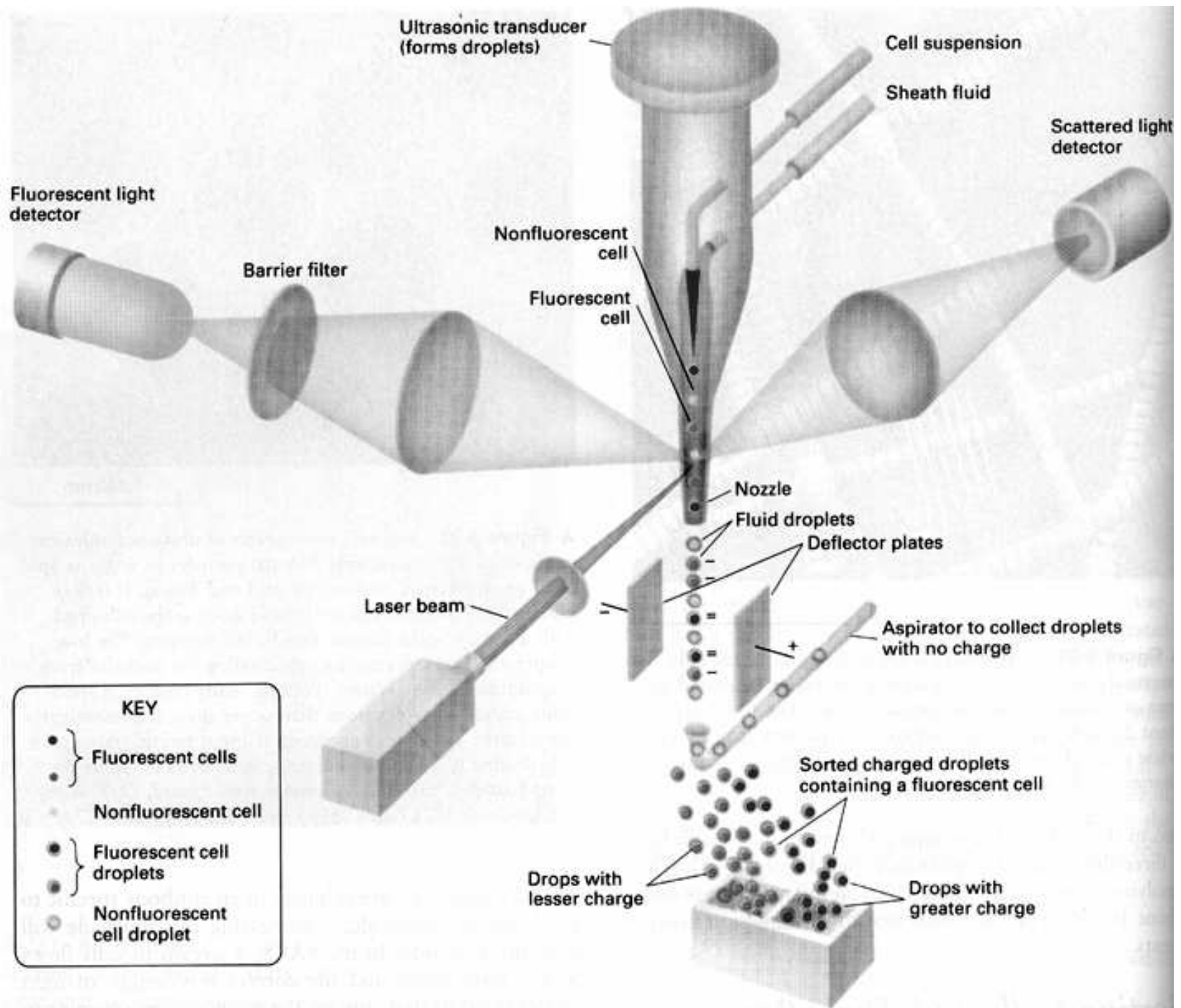
Frakcionace buněk - FACS

Princip:

- podle míry fluorescence je každé kapičce s jednotlivou buňkou udělen proporcionální elektrický náboj
- kapičky procházejí prostorem mezi dvěma elektrodami a dochází k jejich frakcionaci podle náboje

Výhoda:

- buňky nejsou průtokovou cytometrií poškozeny - udržují si životaschopnost
- buňky nejsou kontaminovány - lze je dále kultivovat



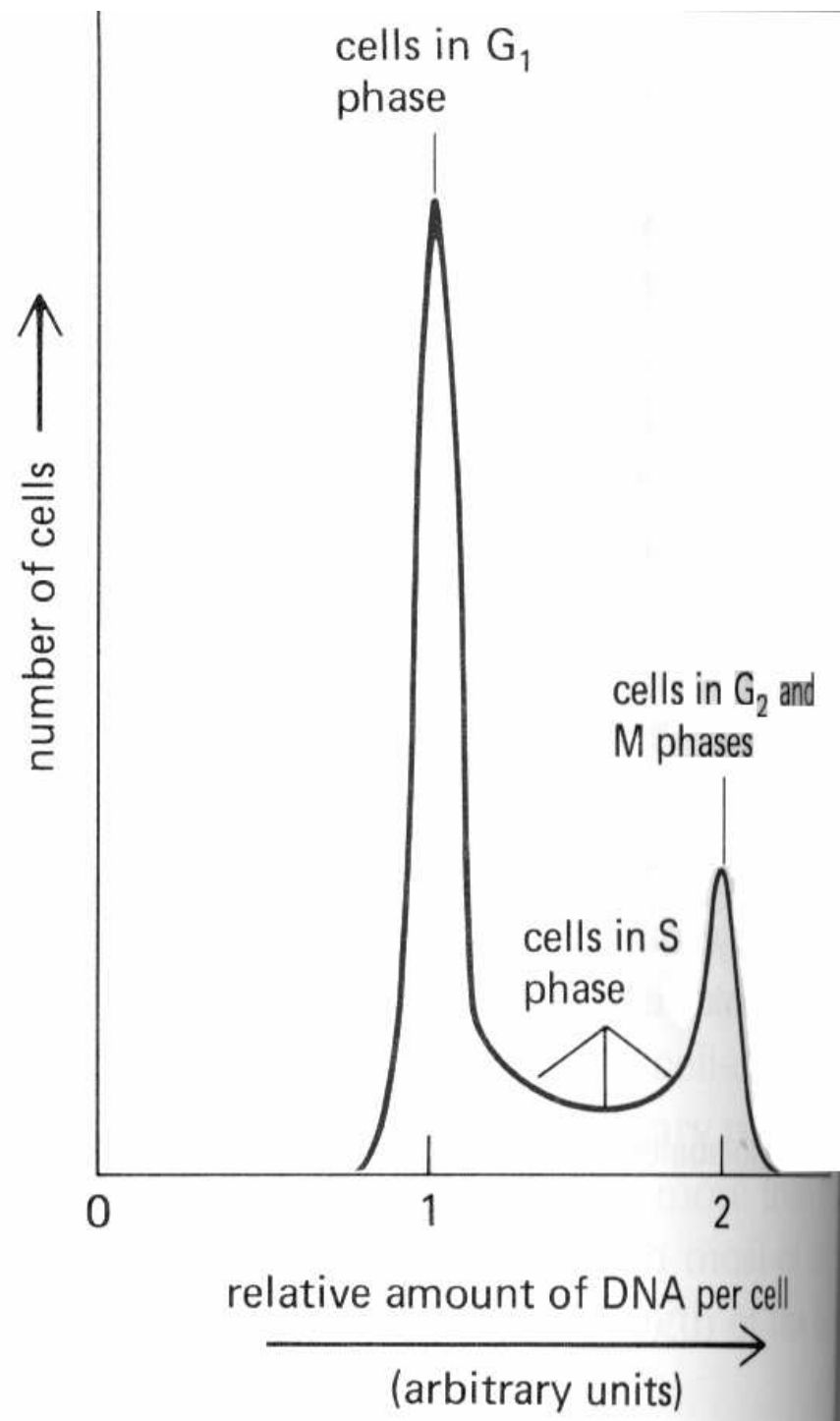
Využití průtokové cytometrie pro analýzu buněčného cyklu

Princip:

- měření obsahu DNA jednotlivých buněk, který se v průběhu cyklu periodicky mění

Postup:

- obarvení DNA fluorescenčním barvivem - propidium jodidem
- měření míry fluorescence emitované jednotlivými buňkami
- počítačové zpracování dat a grafické vyhodnocení

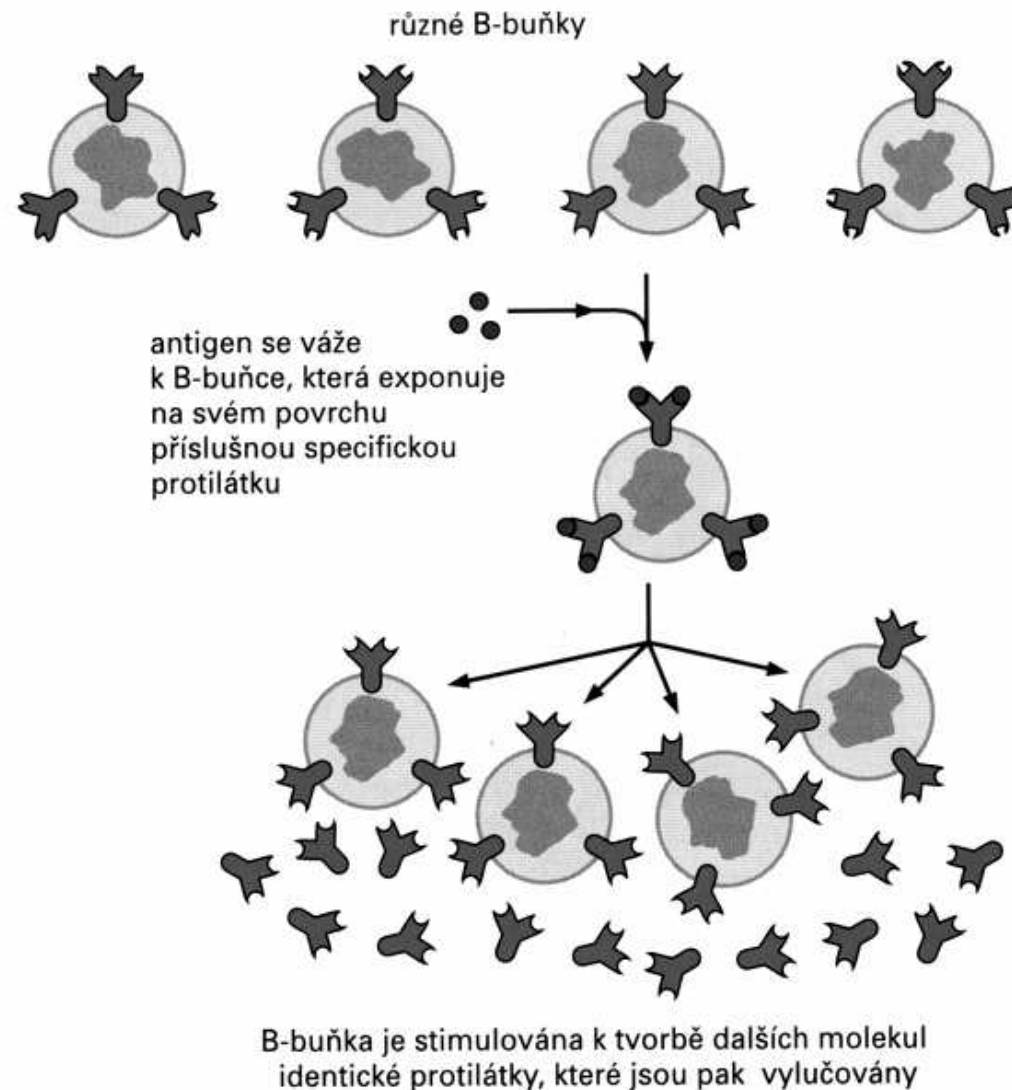


Protilátky

- proteiny tvořené lymfoidní tkání jako reakce na přítomnost cizorodého materiálu - antigenů
- vysoká specificita
- jedna protilátka může rozlišit polypeptidy lišící se jedinou aminokyselinou nebo dokonce jedinou modifikací dané aminokyseliny (např. fosforylaci)

B-BUŇKY

Protilátky jsou v těle vyráběny zvláštní třídou bílých krvinek, tzv. B-lymfocyty. Každý klidový B-lymfocyt má na povrchu určitý typ v membráně vázané protilátky, která slouží jako receptor pro rozeznání specifického antigenu. Jakmile se antigen naváže na tento receptor, B-buňka je stimulována k dělení a tvorbě a sekreci téže protilátky, která zachytila na povrchu antigen.



Příprava polyklonálních protilátek

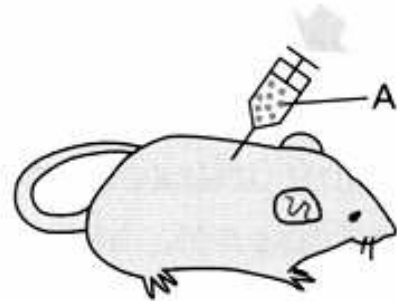
- opakovaná injekce antigenu lab. zvířeti (králík, koza)
- po několika týdnech se zvíře utratí a odebere se mu krev
- z krve se odstraní buňky a srážlivé faktory - *antisérum*
- test titru a čistoty imunoglobulinů

Nevýhody:

- tvorba různých Ig proti danému antigenu (polyvalence)
- Ig se chemicky navzájem podobají, nelze získat čistou frakci daného Ig
- množství získané protilátky je omezené (celý postup nutno opakovat)

PRODUKCE PROTILÁTEK V LABORATORNÍCH ZVÍŘATECH

Protilátky lze vyrábět v laboratoři tak, že se zvířeti vstříkne antigen A (používá se myši, králíků, ovcí a koz).

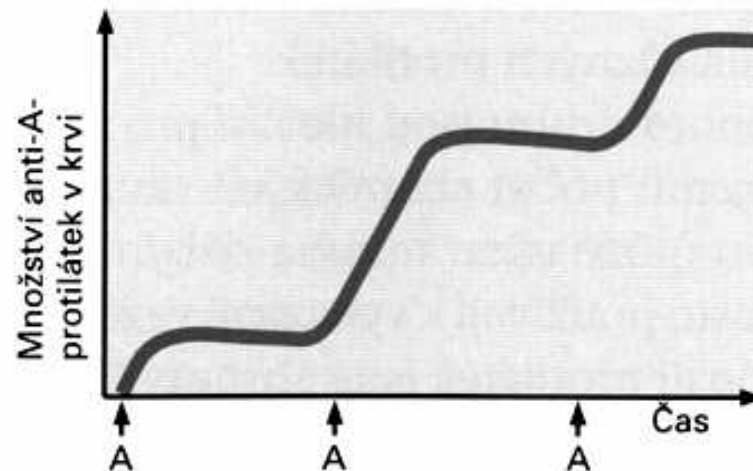


vstříknutí antigenu A



pozdější odebrání krve

Opakované injekce téhož antigenu v intervalech několika týdnů stimulují specifické B-buňky k tvorbě a sekreci velkého množství anti-A-protilátek do krevního oběhu.



Protože se injekcí antigenu A stimuluje mnoho různých B-buněk, bude v krvi přítomna řada protilátek proti A, každá z nichž bude vázat antigen A poněkud odlišně.

Monoklonální protilátky

- produkt jednoho klonu B lymfocytů, který je chemicky a funkčně homogenní
- B lymfocyty izolované z laboratorních živočichů nelze kultivovat *in vitro*

Myelomové buňky:

- maligní buňky
- možnost kultivace *in vitro*
- vysoká schopnost tvorby protilátek
- protilátky nejsou specifické pro určitý antigen
- vznikají maligní transformací normálního lymfocytu

Příprava monoklonálních protilátek

Milstein a Köhler 1975:

- provedli fúzi normálních lymfocytů produkujících protilátky s maligní myelomovou buňkou
- získali hybridní buňky (**hybridomy**):
 - možnost kultivace *in vitro*
 - vysoká schopnost tvorby jediné (monoklonální) protilátky
 - protilátka svou specifitou odpovídá produktu normálního lymfocytu použitého k fúzi

Příprava monoklonálních protilátek

Postup:

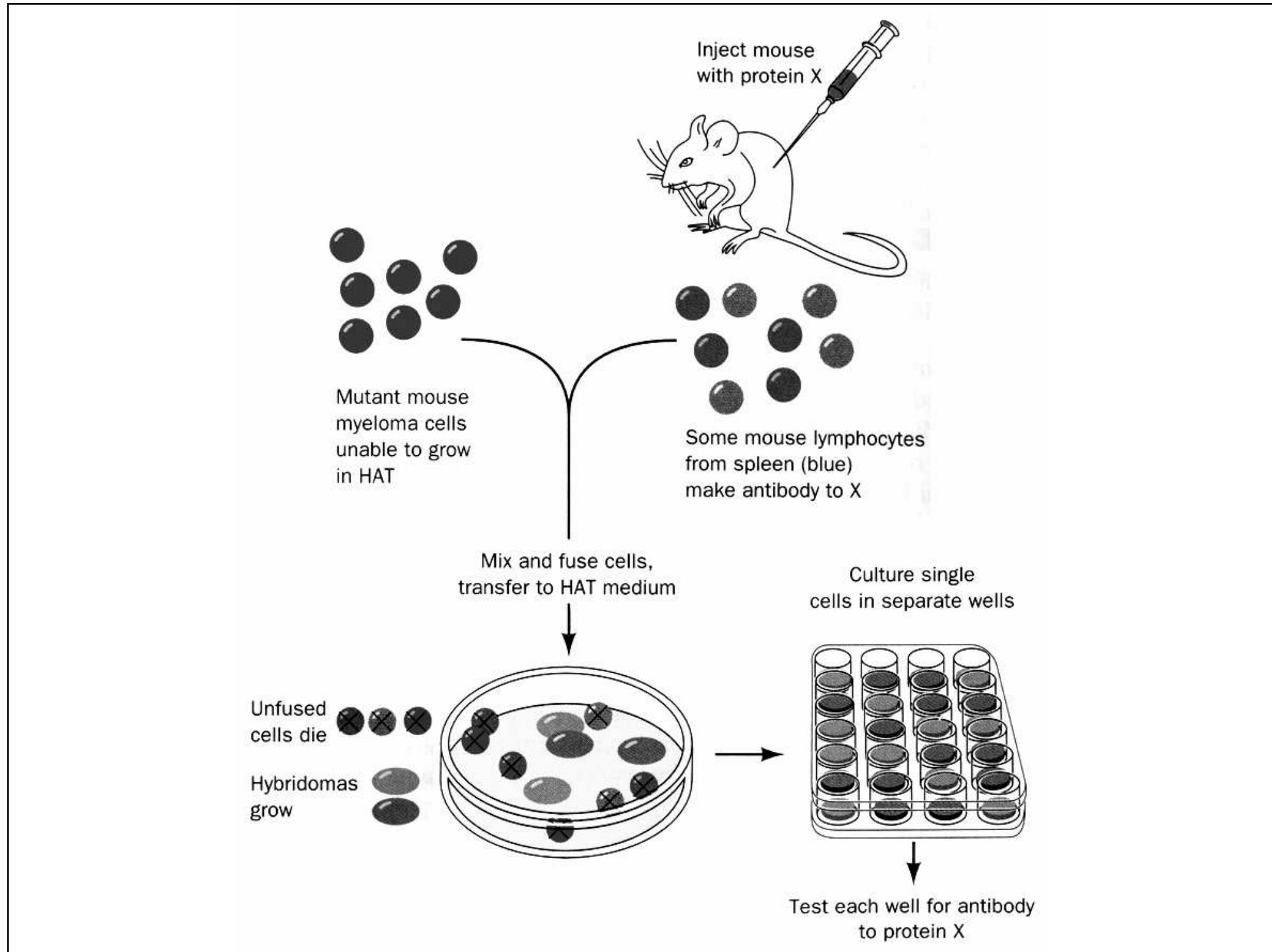
- antigen je injekcí přenesen do laboratorní myši a vyvolá proliferaci specifických protilátkotvorných buněk
- z utraceného zvířete je vyjmuta slezina
- získané lymfocyty se použijí k fúzi s maligními myelomovými buňkami
- hybridní buňky získávají nesmrtelnost z myelomové buňky a schopnost tvorby specifické protilátky z lymfocytu
- hybridní buňky se selektují od nefúzovaných buněk na základě schopnosti růst v selekčním médiu HAT
- skrínink hybridů podle schopnosti tvorby specifické protilátky
- kultivace žádaných hybridů v kultuře nebo jako nádor v lab. zvířeti
- získání neomezeného množství čisté protilátky

Příprava monoklonálních protilátek

Princip selekce hybridů:

Médium HAT

- obsahuje hypoxantin, aminopterin, tymidin
- umožňuje růst jen buňkám s funkční hypoxantin-guanin fosforibozyl transferázou (HGPRT)
- linie myelomových buněk používaných k fúzi je HGPRT-



Studium interakcí protein-protein

- Dvouhybridní systém
- Ko-imunoprecipitace
- Knihovna „Phage display“
- Proteinová „microarray“

Interaktom

- soubor všech meziproteinových interakcí v dané buňce nebo organismu
- celkový skrínink interaktomu umožňuje dvouhybridní systém nebo proteinová „microarray“

Dvouhybridní systém

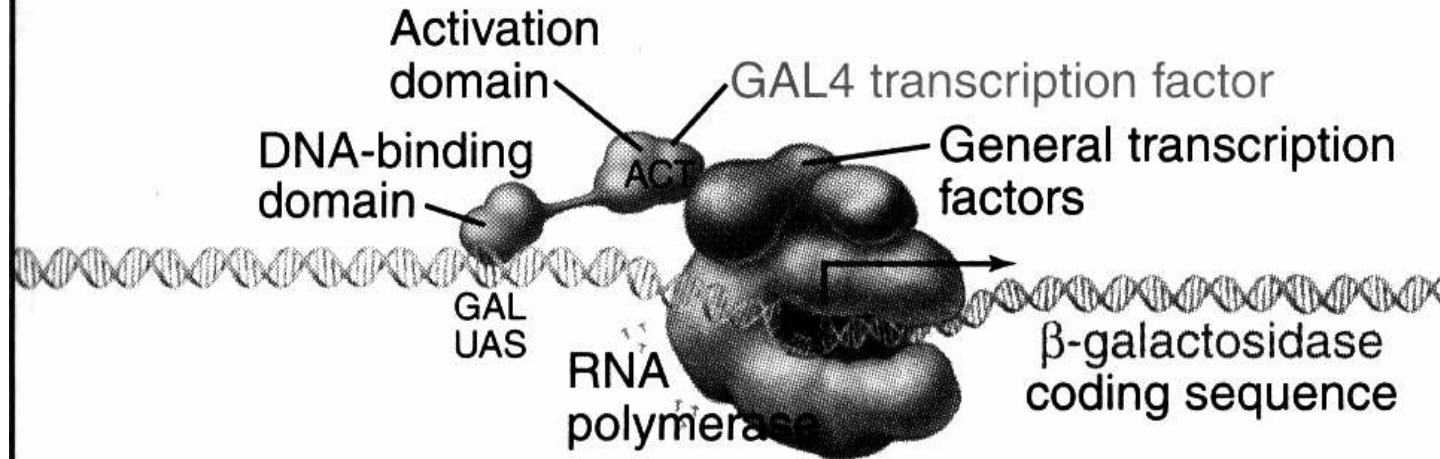
- využívá fúze testovaných proteinů s dvěma oddělenými doménami transkripčního aktivátoru
- transkripční faktory mají často modulární strukturu: doménu pro vazbu na DNA (DBD) a aktivační doménu (AD)
- interakce obou domén vede k aktivaci transkripce (kovalentní propojení domén není nutné)

Dvouhybridní systém - princip

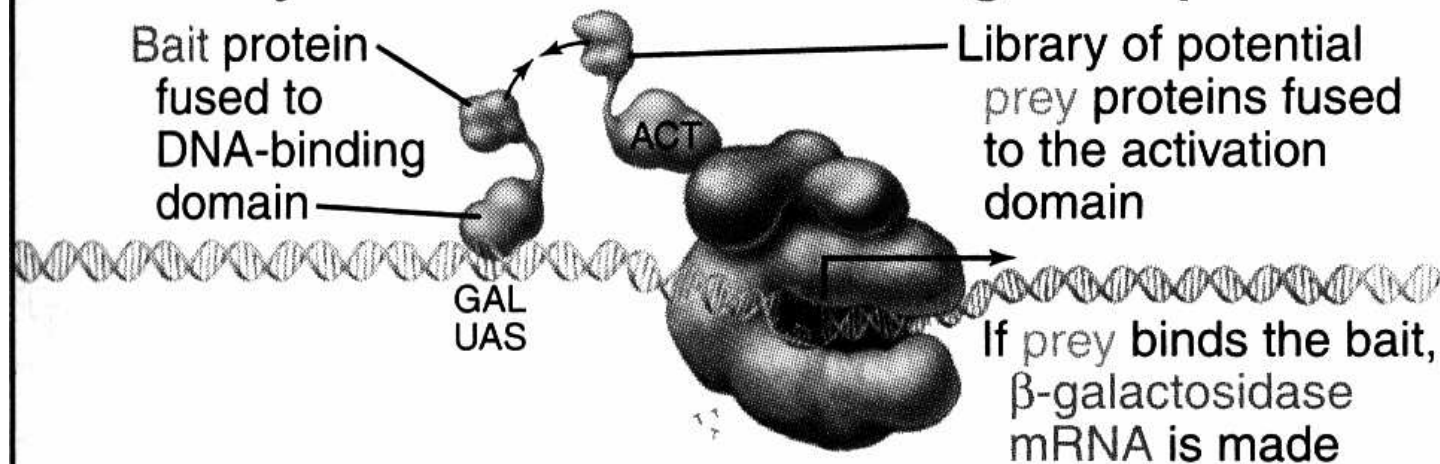
- DBD doména je spojena fúzí s proteinem X a AD doména s proteinem Y
- „návnada“ („*bait*“): proteinová chiméra obsahující doménu pro specifickou vazbu na DNA spojenou se studovaným proteinem (DBD-X)
- „dravec“ („*prey*“): proteinová chiméra spojující partnerský protein s aktivační doménou (AD-Y)
- v kvasinkových buňkách se interakce testovaných proteinů projeví aktivací reportérského genu, který je stabilně začleněn do genomu

Význam metody: stanovení interakcí mezi dvěma proteiny

A. Normal regulation of gene expression

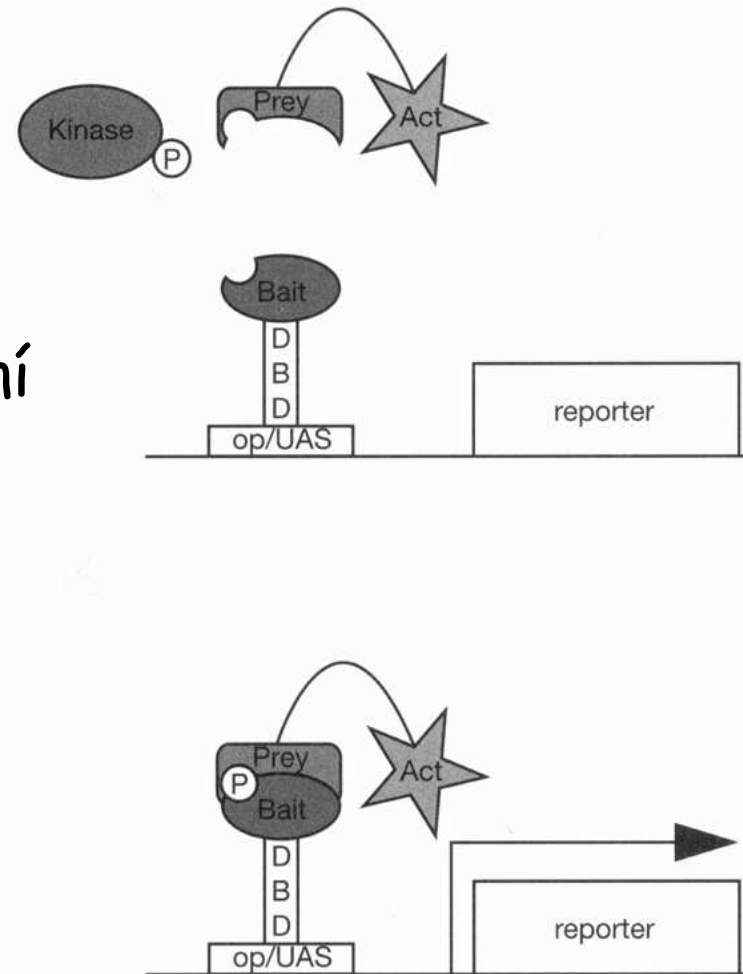


B. Two-hybrid interaction activates gene expression

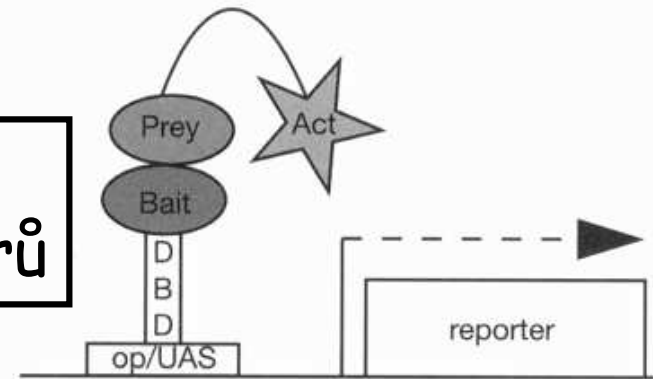


Interakce mezi proteiny někdy podstatně závisí na posttranslačních modifikacích, které v kvasinkových buňkách nenastávají

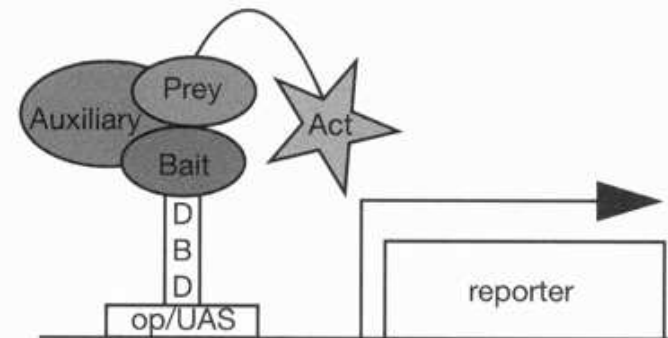
V roce 1995 připraven speciální kvasinkový kmen, který exprimuje savčí tyrosinovou kinázu Lck



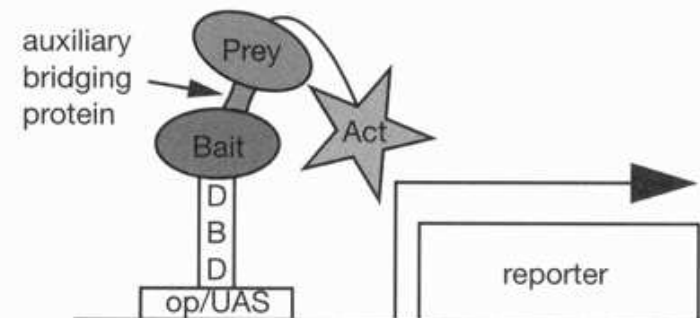
Meziproteinové interakce někdy závisí na přítomnosti dalších faktorů



weak interaction: minimal reporter activation

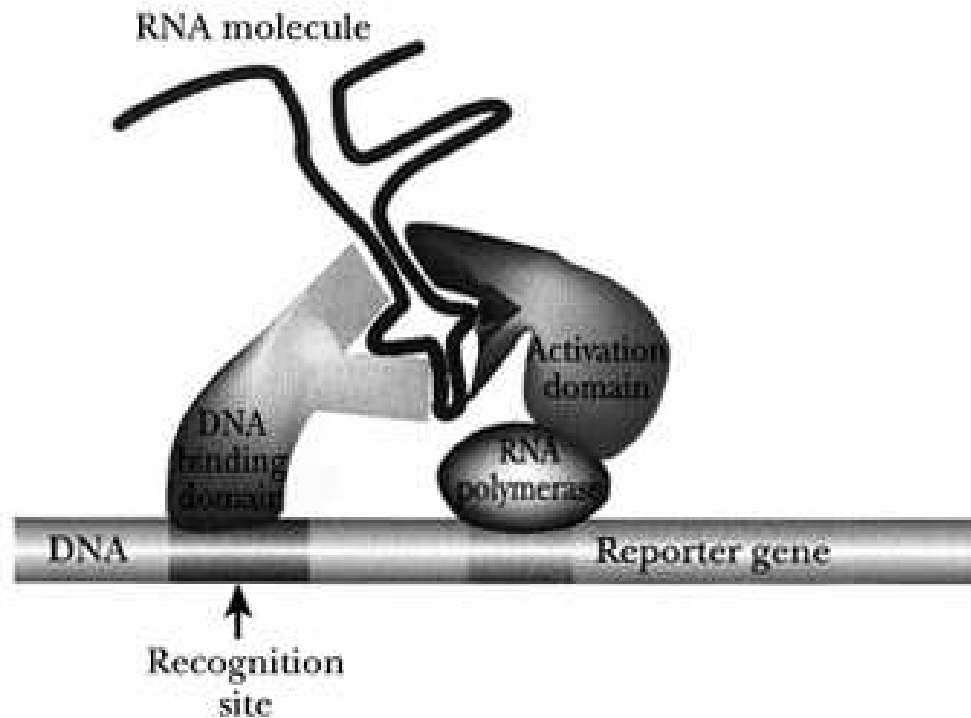


strong ternary interaction: strong reporter activation



Trojhybridní systém

Slouží k identifikaci proteinů, jejichž interakci zprostředkovává RNA

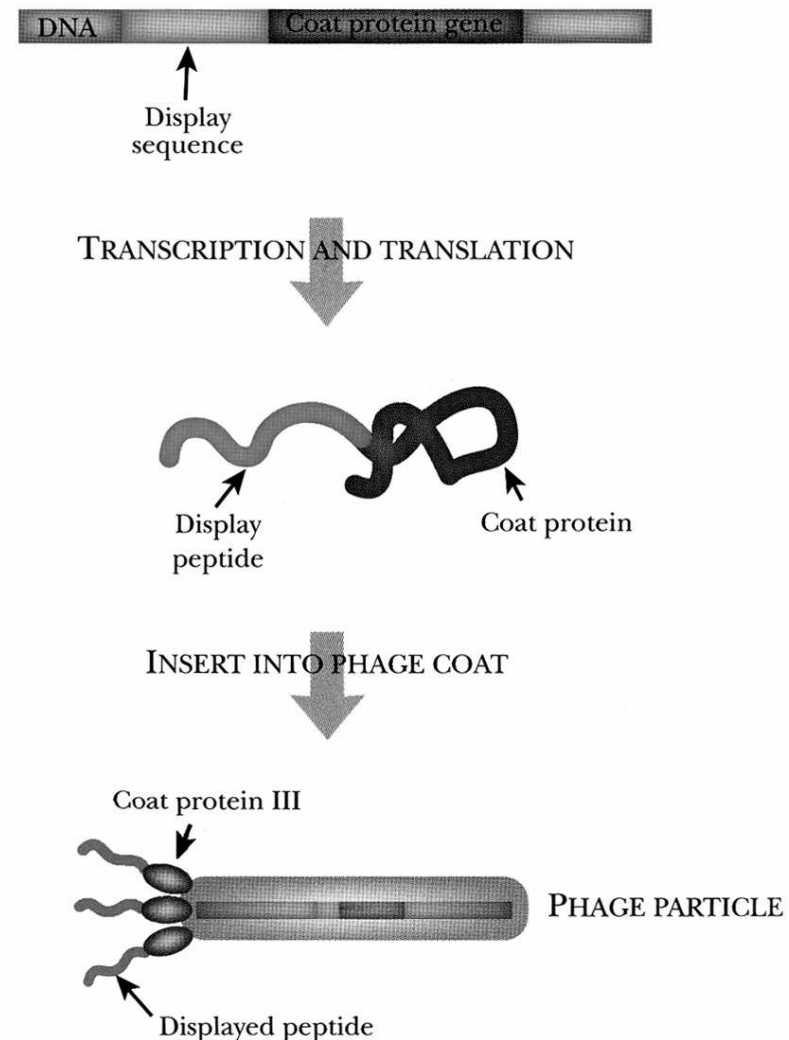


Knihovna „Phage display“

- fragmenty DNA se začlení do klonovacího místa uvnitř genu, který kóduje jeden z povrchových proteinů vláknitého fága M13
- fúzovaný gen kóduje proteinovou chiméru, která bude včleněna do fágové hlavy a to takovým způsobem, že cizí protein bude vystaven na povrchu fágové částice
- přenesení knihovny „phage display“ do zkumavky nebo mikrotitrační destičky potažené ligandem, protilátkou, receptorem nebo jiným testovaným proteinem
- odmytí nenavázaného fága
- lze testovat velmi vysoké počty fágových částic a hledat interagující klony

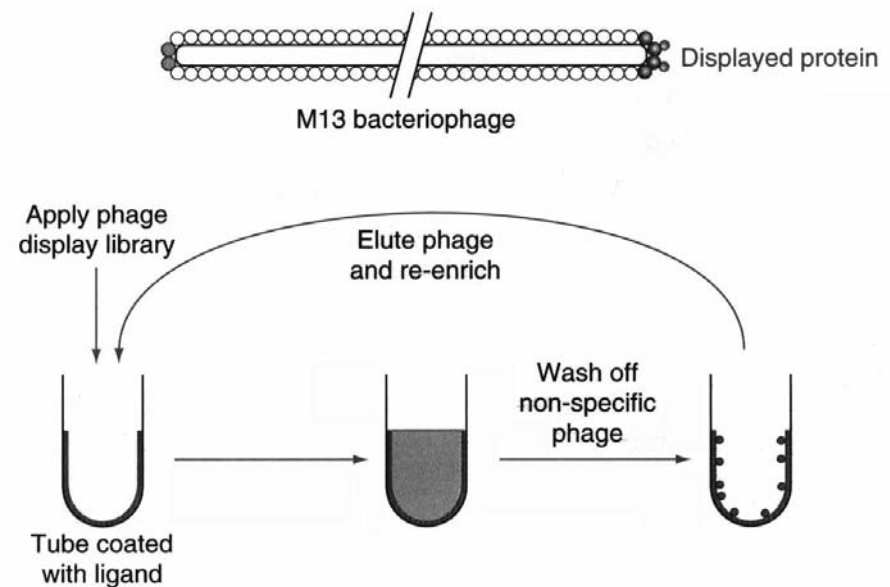
Knihovna „Phage display“

- fragmenty DNA se začlení do klonovacího místa uvnitř genu, který kóduje jeden z povrchových proteinů vláknitého fága M13
- fúzovaný gen kóduje proteinovou chiméru, která bude včleněna do fágové hlavy a to takovým způsobem, že cizí protein bude vystaven na povrchu fágové částice

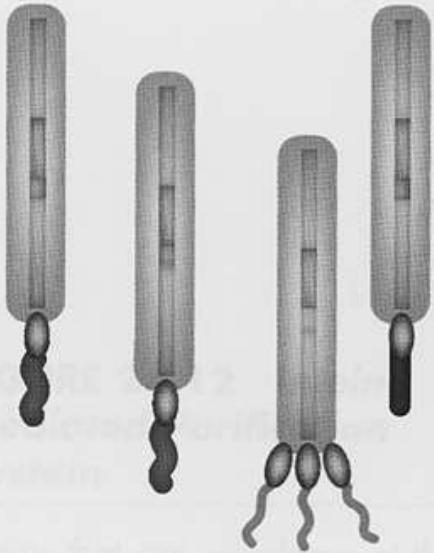


Knihovna „Phage display“

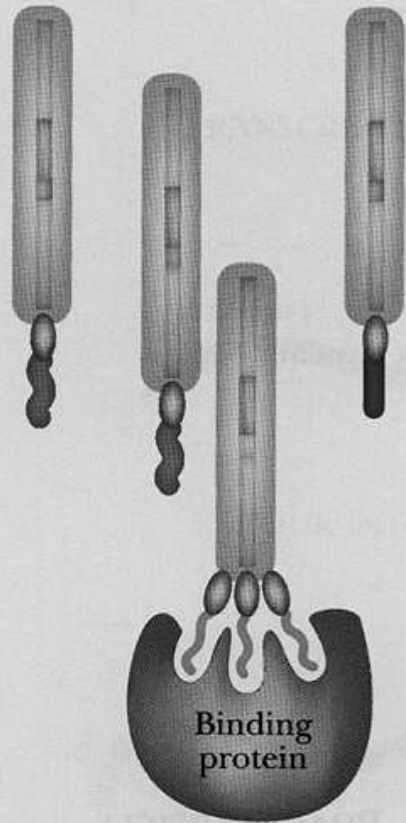
- přenesení knihovny „phage display“ do zkumavky nebo mikrotitrační destičky potažené ligandem, protilátkou, receptorem nebo jiným testovaným proteinem
- odmytí nenavázaného fága
- lze testovat velmi vysoké počty fágových částic a hledat interagující klony



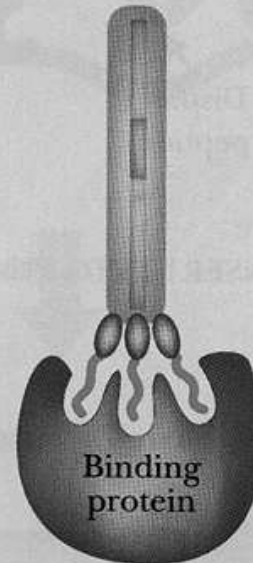
**A. LIBRARY OF
PHAGE WITH
DISPLAYED PEPTIDES**



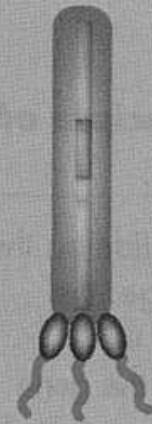
**B. BIND PHAGE
TO BINDING
PROTEIN**



**C. WASH AWAY
UNBOUND
PHAGE**



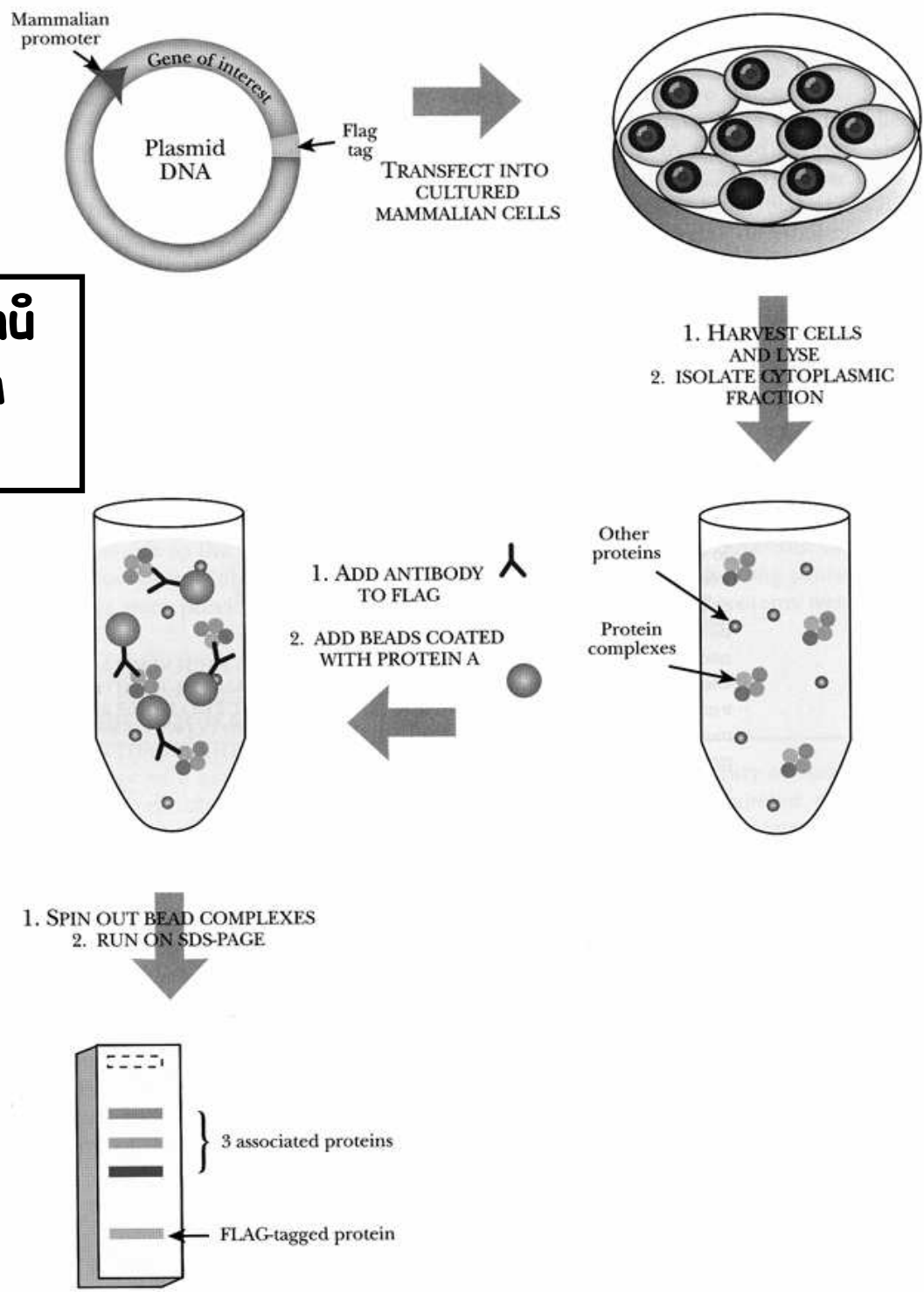
**D. RELEASE
SELECTED
PHAGE**



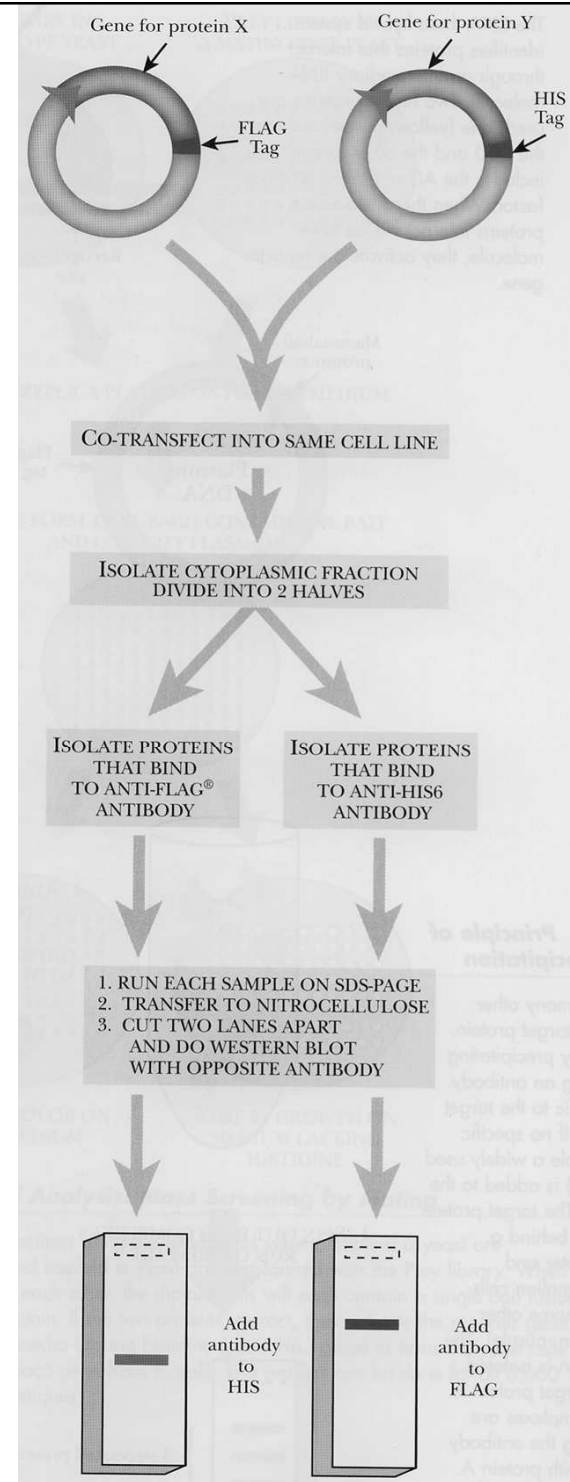
Ko-imunoprecipitace

- vhodná metoda pro ověření meziproteinových interakcí stanovených dvojhybridním systémem v kvasinkách
- savčí buňky se transfekují genem kódujícím testovaný protein
- vytvořený protein se z buněk izoluje prostřednictvím protilátek
- pokud není k dispozici vhodná protilátka může být protein označen pomocným peptidem FLAG, pak lze k precipitaci použít anti-FLAG protilátku
- protein se z buněk precipituje za takových podmínek, že není narušeno jeho případné spojení s jinými proteiny
- protein A izolovaný z buněk *S. aureus* pevně váže protilátky: imobilizovaný protein A je vhodným nástrojem pro izolaci protilátek s připojenými proteiny
- proteinové komplexy se rozdělí elektroforézou SDS-PAGE
- identifikace asociovaných proteinů je možná protilátkami, hmotnostní spektrometrií nebo sekvenováním proteinů

Hledání neznámých proteinů asociujících se studovaným proteinem



Ověření interakcí mezi dvěma proteiny ko-immunoprecipitací

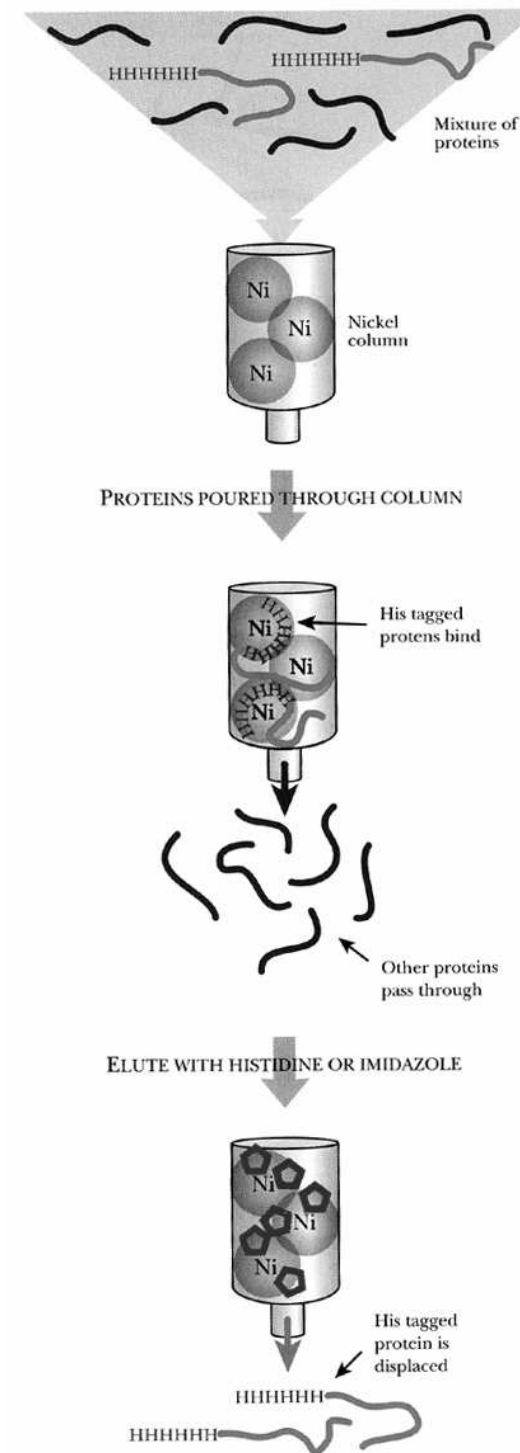


„Protein tagging“

- „tag“ = visačka
- „Protein tagging“ znamená označení proteinu připojením zřetelné značky
- obvykle se provádí geneticky - sekvence DNA je opatřena segmentem kódujícím „tag“
- sekvence musí být klonována ve vhodném vektoru a přenesena do vhodné hostitelské buňky, která bude syntetizovat označený protein
- značku lze využít např. pro účinnou purifikaci proteinu nebo imunoprecipitační experimenty

Typy peptidových značek

- „His tag“ = polyhistidinový tag
- složen ze šesti tandemově uspořádaných zbytků histidinu
- přidává se k cílovému proteinu na N- nebo C-konec
- „His tag“ se velmi účinně váže k iontům niklu
- proteiny označené „His tag“ lze snadno purifikovat chromatograficky na kolonách, kde je nosič opatřen niklovými ionty



„FLAG tag“

Krátký peptid (AspTyrLysAspAspAspAspLys), který je rozeznáván specifickou protilátkou, která je komerčně dostupná (Immunex Corp)

Tato protilátka může být imobilizována na koloně pro chromatografickou purifikaci příslušného proteinu.

„Strep tag“

Peptid o velikosti 10 aminokyselin, který napodobuje trojrozměrnou strukturu biotinu

Má afinitu k avidinu nebo streptavidinu

Funkci značky mohou mít nejen krátké peptidy, ale i celé proteiny

Protein A - afinita k protilátkám

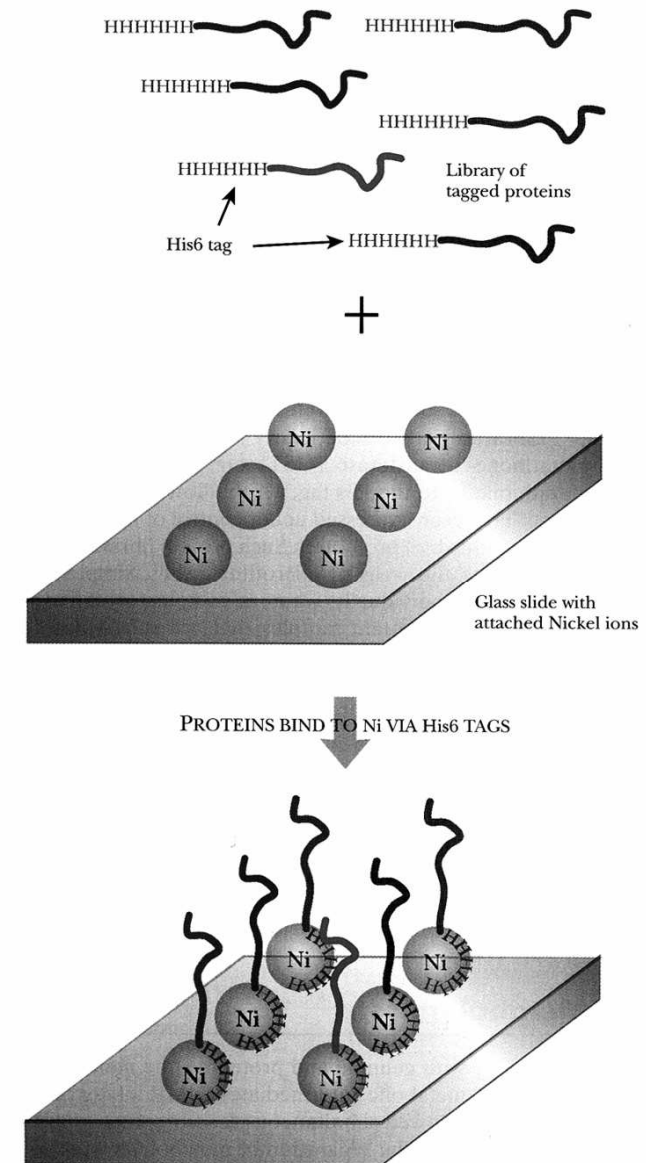
Glutathion S transferáza (GST) - afinita k tripeptidu glutathionu

Protein vážoucí maltózu (MBP) - afinita k maltóze a polymeru maltózy (amylóze)

Sekvence kódující značící protein se obvykle umísťuje 5' od studovaného genu

Protein arrays

- umožňují simultánní monitorování interakcí mnoha proteinů
- používají se pro biochemické a enzymatické analýzy proteinů a pro studium meziproteinových interakcí
- sestaveny z proteinů označených tagy, které umožňují jejich připojení k pevnému podkladu buď ELISA destiček nebo podložním sklíčkům



Skrínink interakcí proteinů obvykle využívá fluorescence, méně často radioaktivity

Příklad: hledání proteinů, které vážou fosfolipidy

- proteinová array se inkubuje s fosfolipidy konjugovanými s biotinem
- navázaný fosfolipid je zviditelněn přidáním avidinu konjugovaného s fluorescenční značkou
- fluoreskující „spot“ reprezentuje protein, který váže fosfolipidy

