

Metody separace proteinů

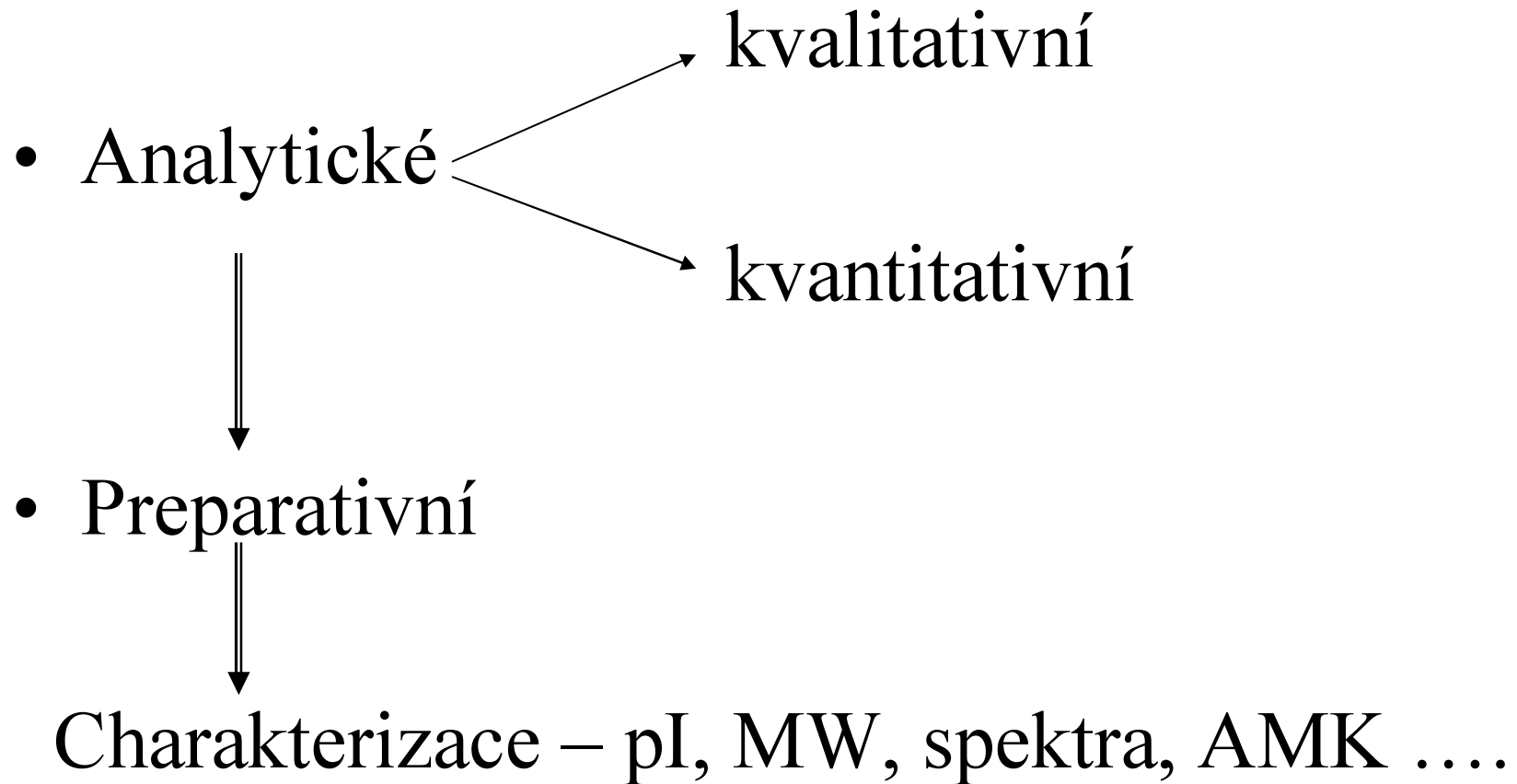
Literatura

- *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

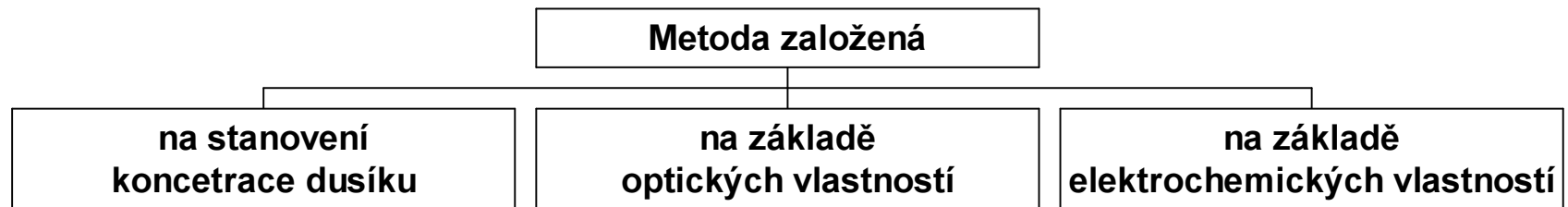
- Na začátek zařadit metody s vysokou kapacitou a malým výtěžkem a rozlišením
→ velké množství levného vstupního materiálu
- Později metody s vysokým rozlišením a výtěžkem, kapacita méně významná
→ ve vzorku již investovaná práce

- 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 NH_4^+
- Stanovení 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

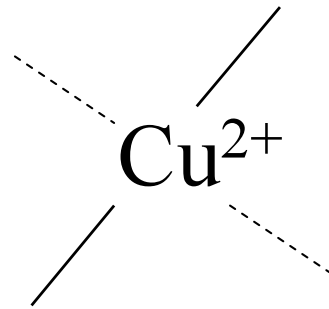
VIS spektrofotometrie

Přídavek činidla → barevný derivát

- Destruktivní metoda
- Nutná kalibrační závislost

Biuretová metoda

Princip : 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
 Co^{2+} katalytické reakce na Hg
elektrodě \rightarrow proud

Nejčastěji používané metody

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

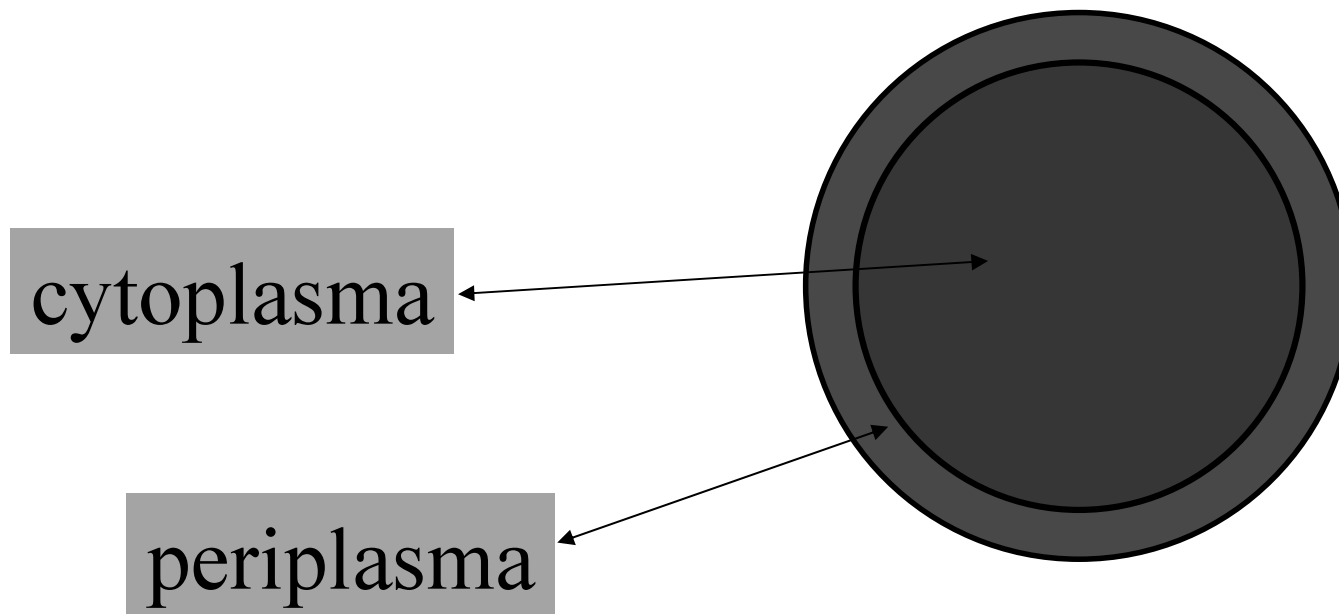
Manipulace s biologickým materiálem

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

Rozbití a extrakce

Bakterie

- Záleží na lokalizaci

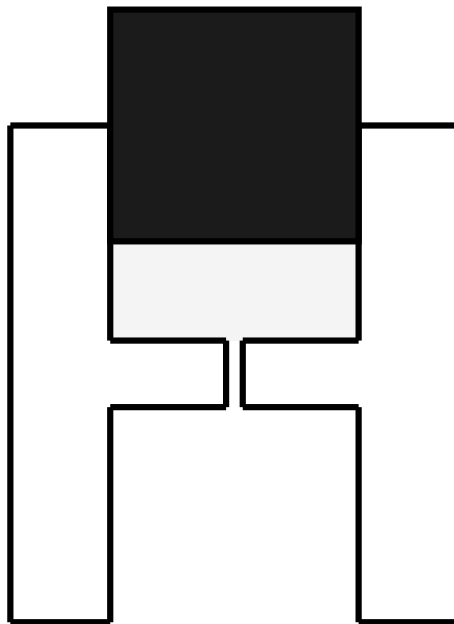


Balotina

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

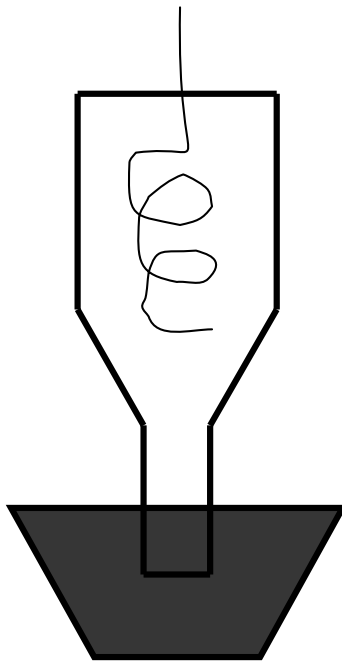
French (X) press

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



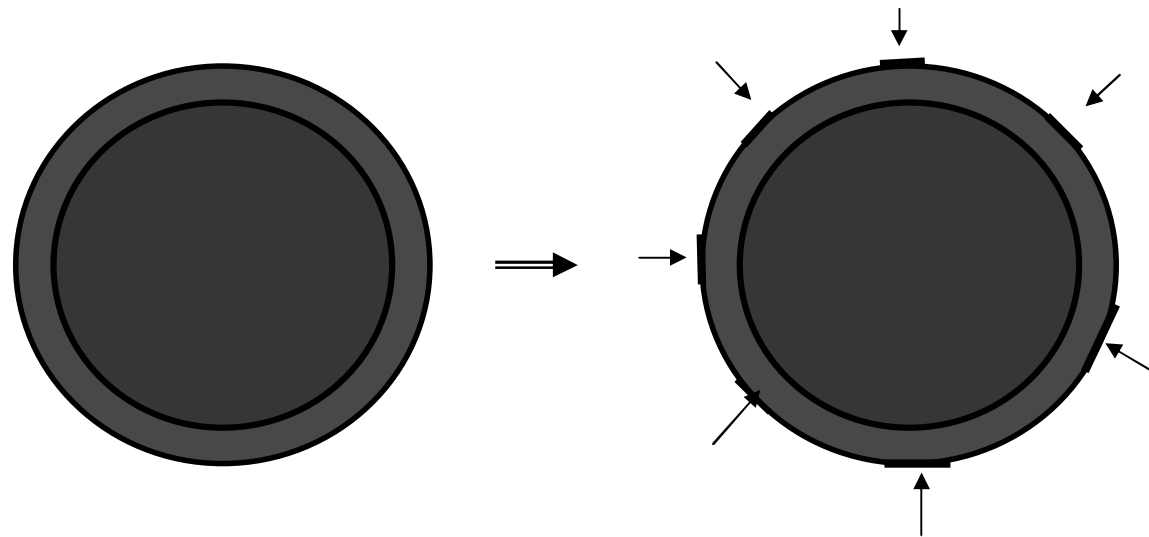
Ultrazvuk

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 H₂O – bakterie popraskají



Další

- Alumina Al_2O_3 – roztírání v třecí misce
- Opakované zmrazování a rozmrazování

Kvasinky

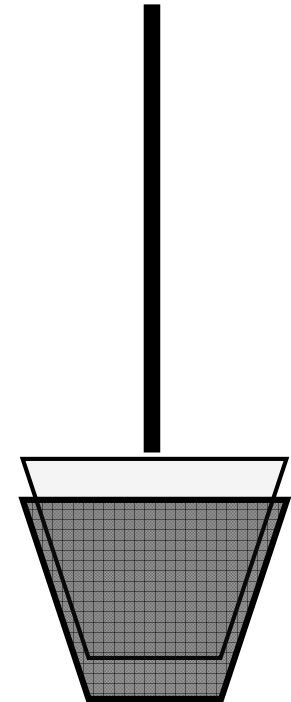
Toluenová autolýza

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, β -merkaptoethanol, kovové ionty, inhibitory proteáz

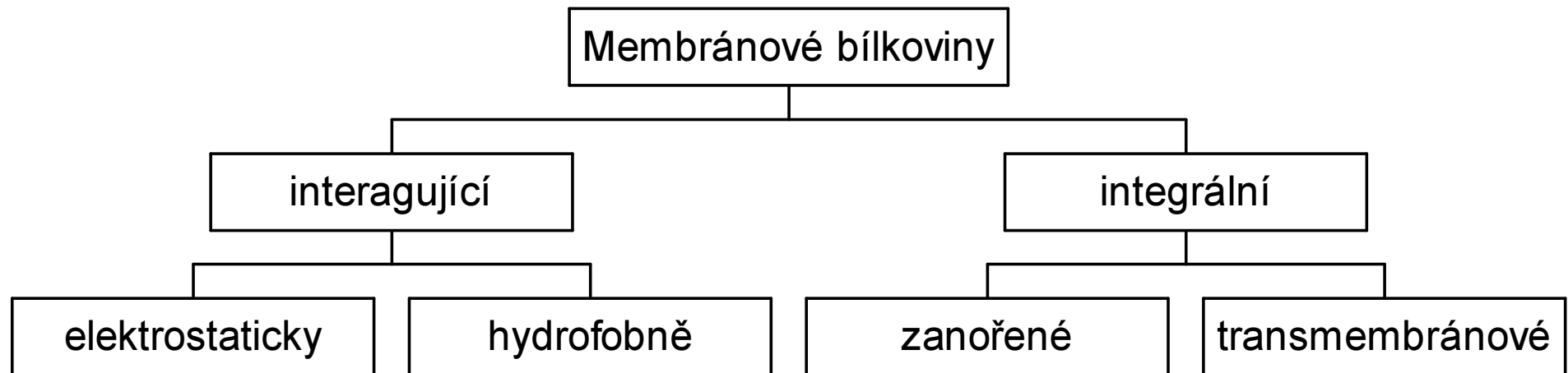
Separace subcelulárních organel

Organela	Tíhové zrychlení	Čas
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.systém	100 000 g	60'

Enzymy - markery

Organela	Enzym
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

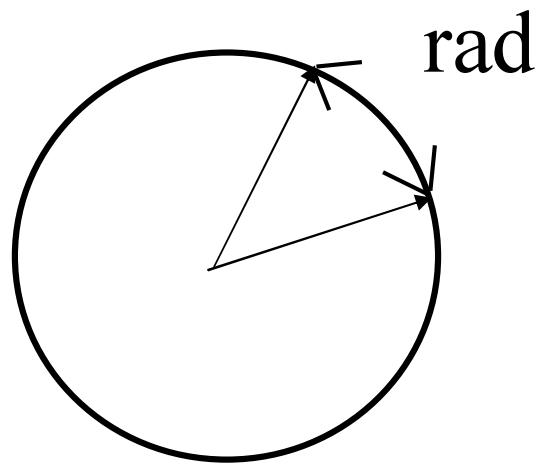
```
graph TD; A[Centrifugace] --> B[Preparativní]; A --> C[Analytická]
```

Preparativní

Analytická

Otáčky \rightarrow g

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

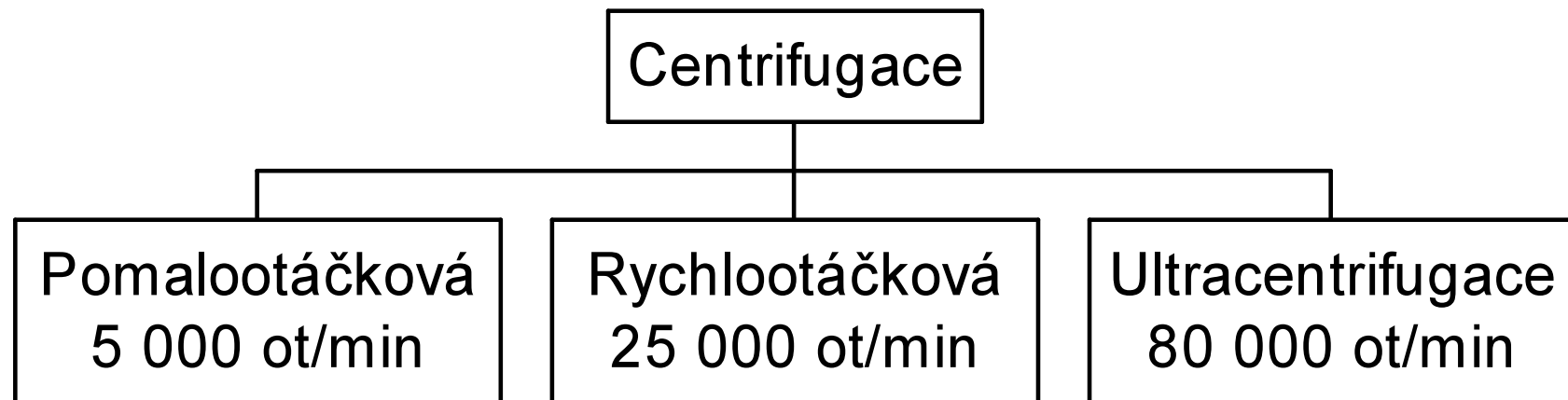


ω - uhlová rychlost
(rad/s)

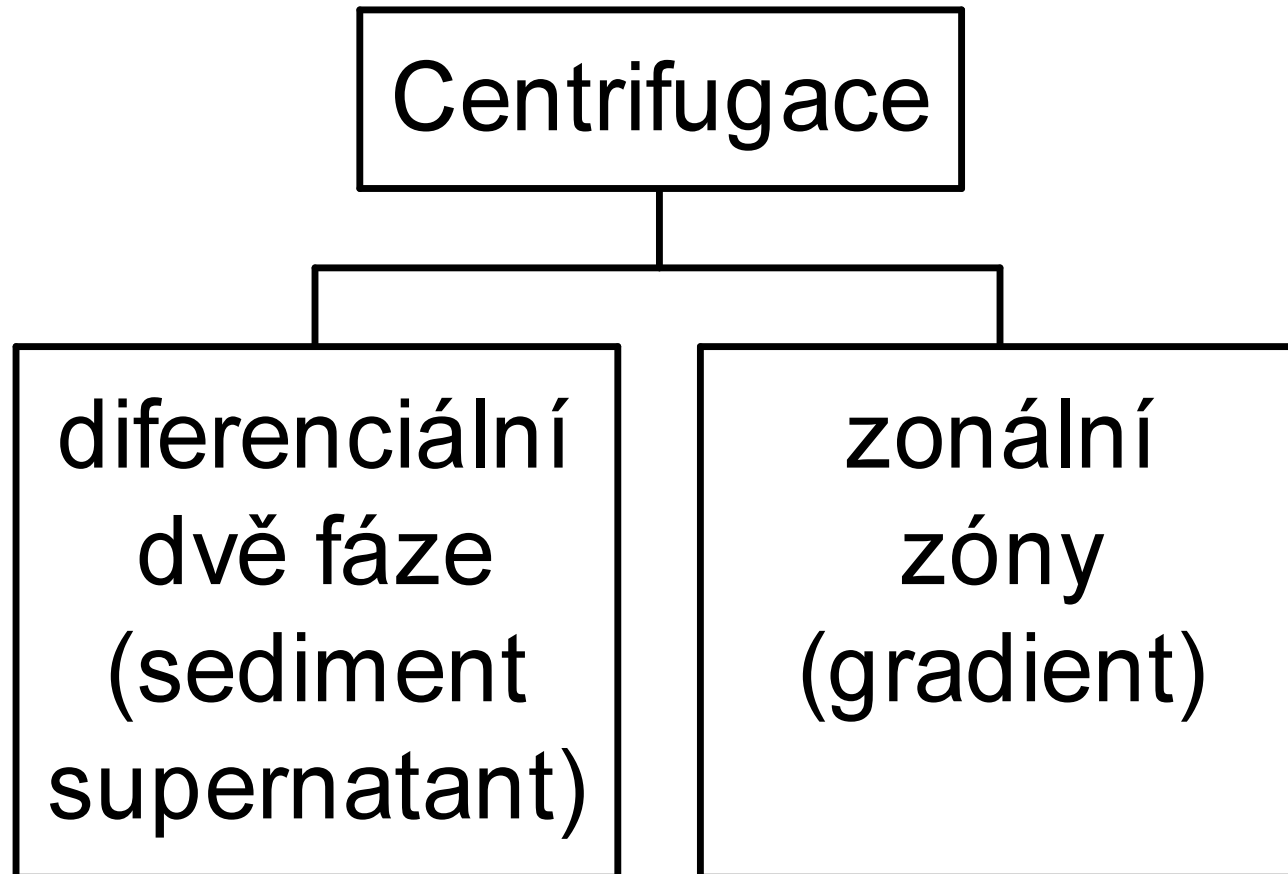
$$\omega = 2\pi \cdot f$$

f – otáčky/min

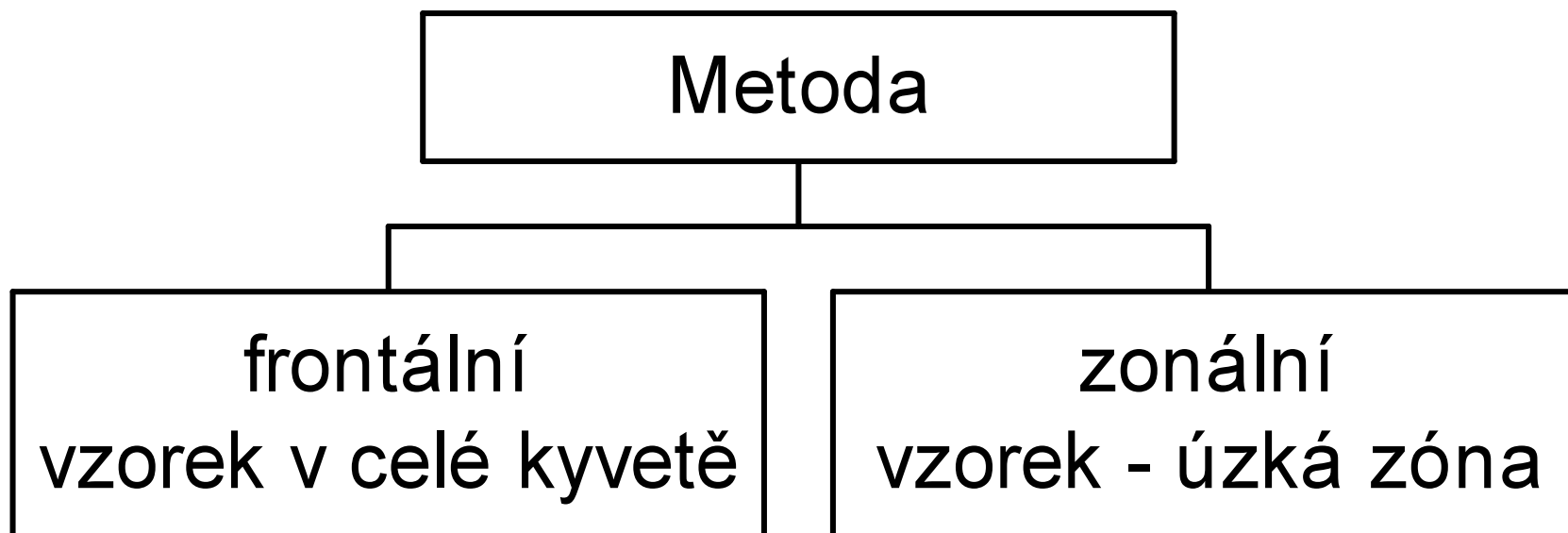
Rozdělení centrifug



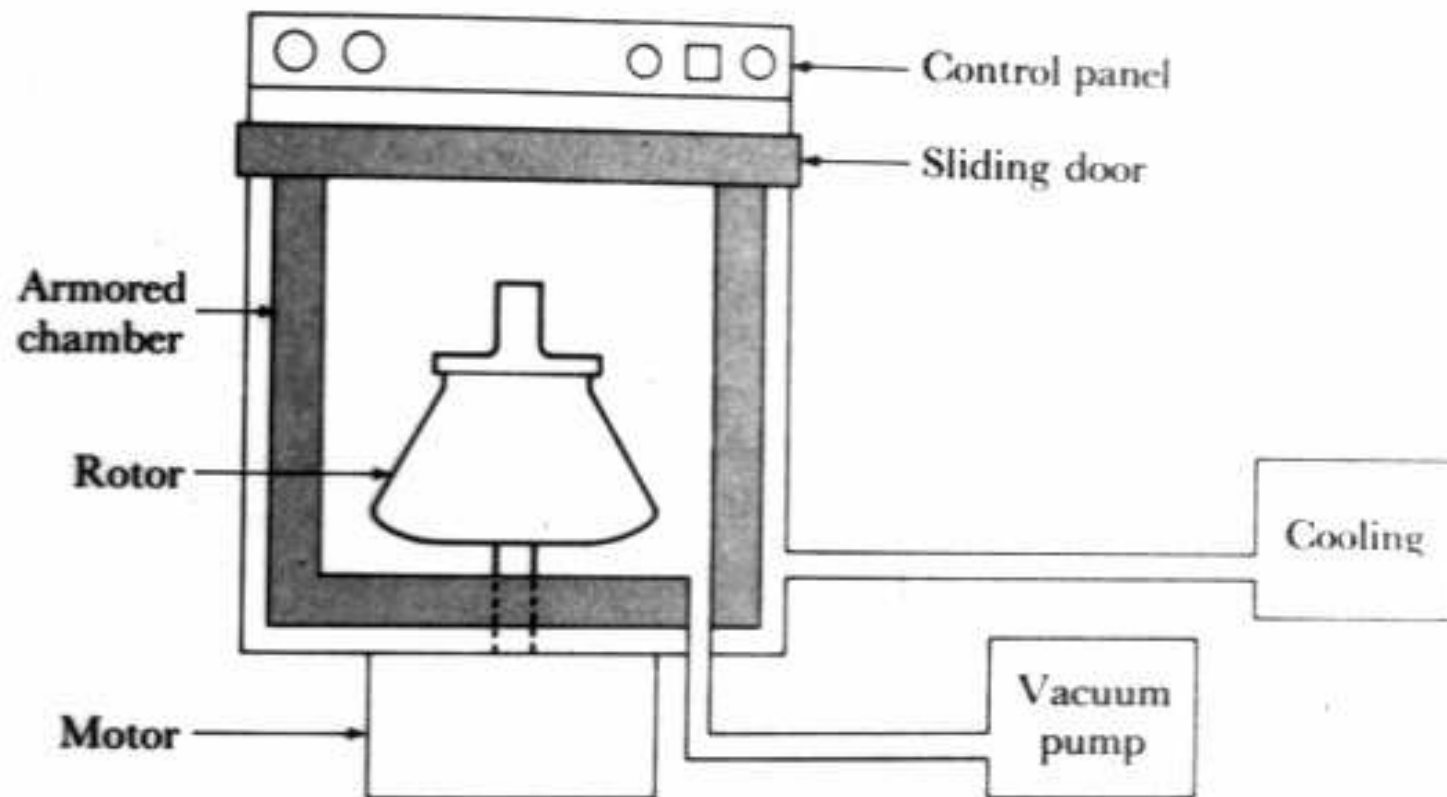
Preparativní centrifugace



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

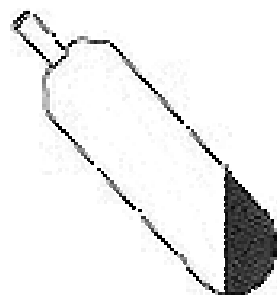
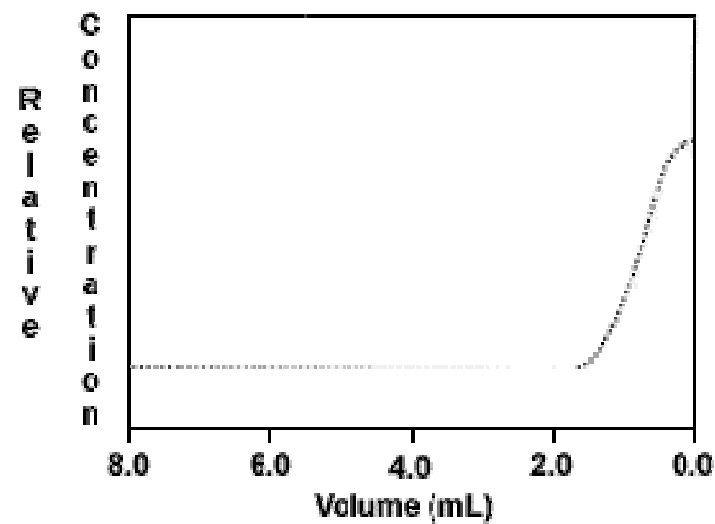


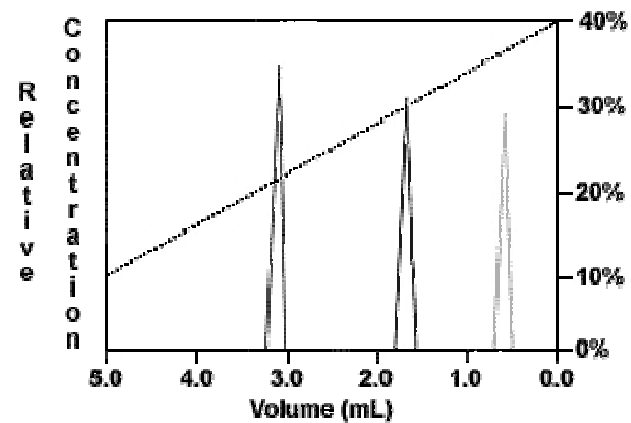
Figure 4



Výkyvný rotor



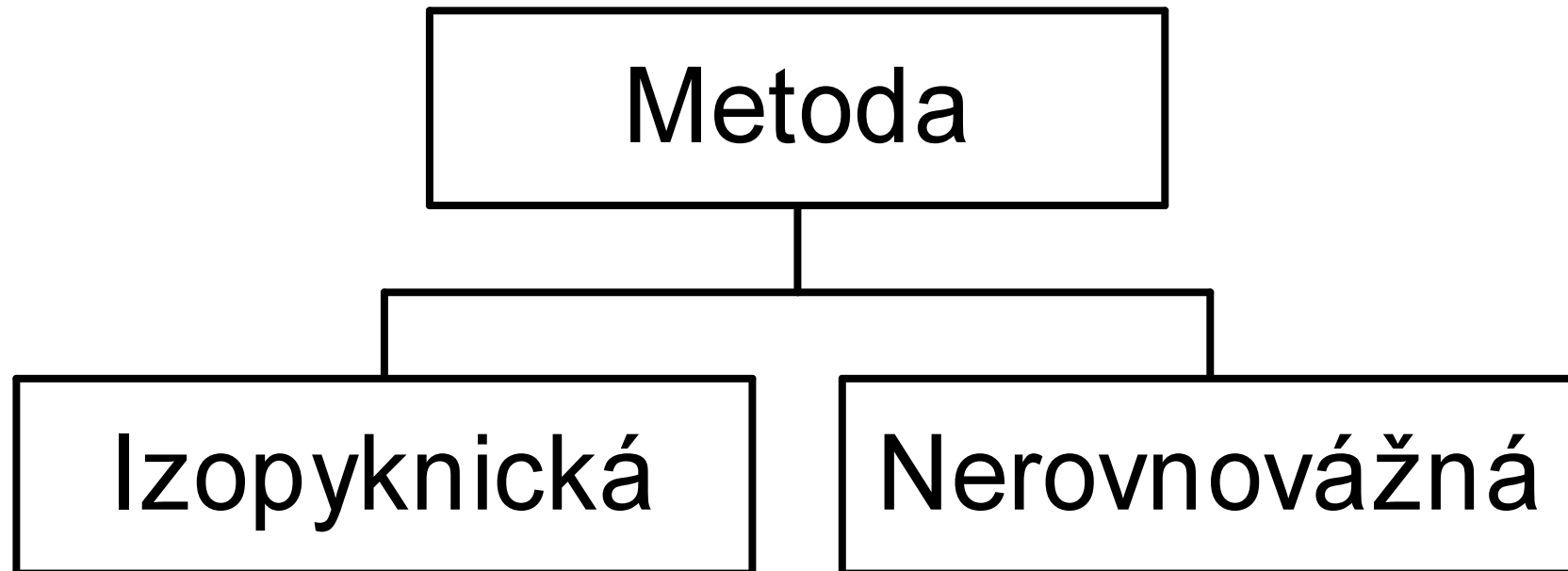
figure 2



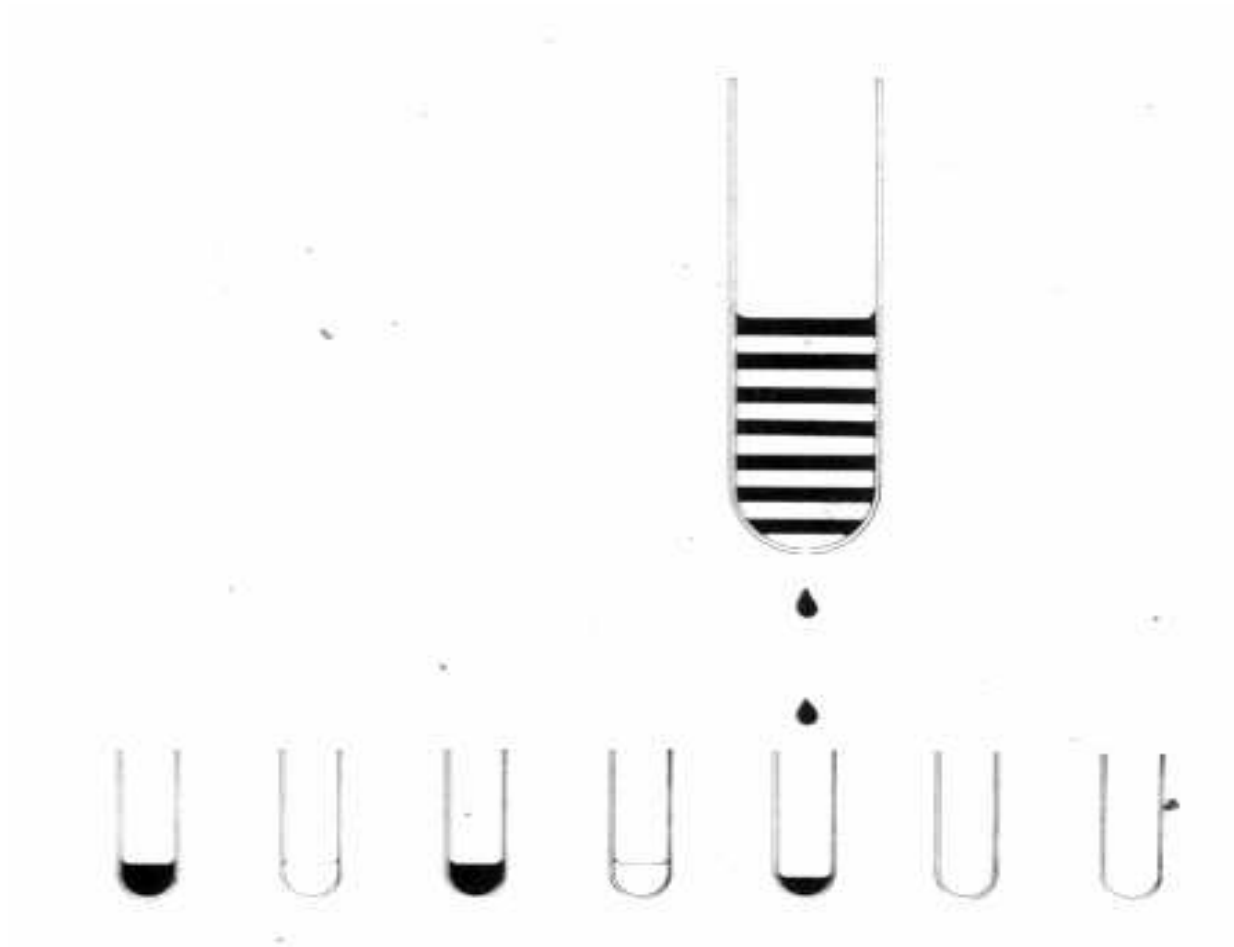
Gradientová centrifugace média

- Sacharosa
 - Glycerol
 - Ficoll - dextran
 - Percoll – SiO₂
 - CsCl – gradient vzniká během centrifugace
- Hypertonické prostředí
- Nutno připravit gradient

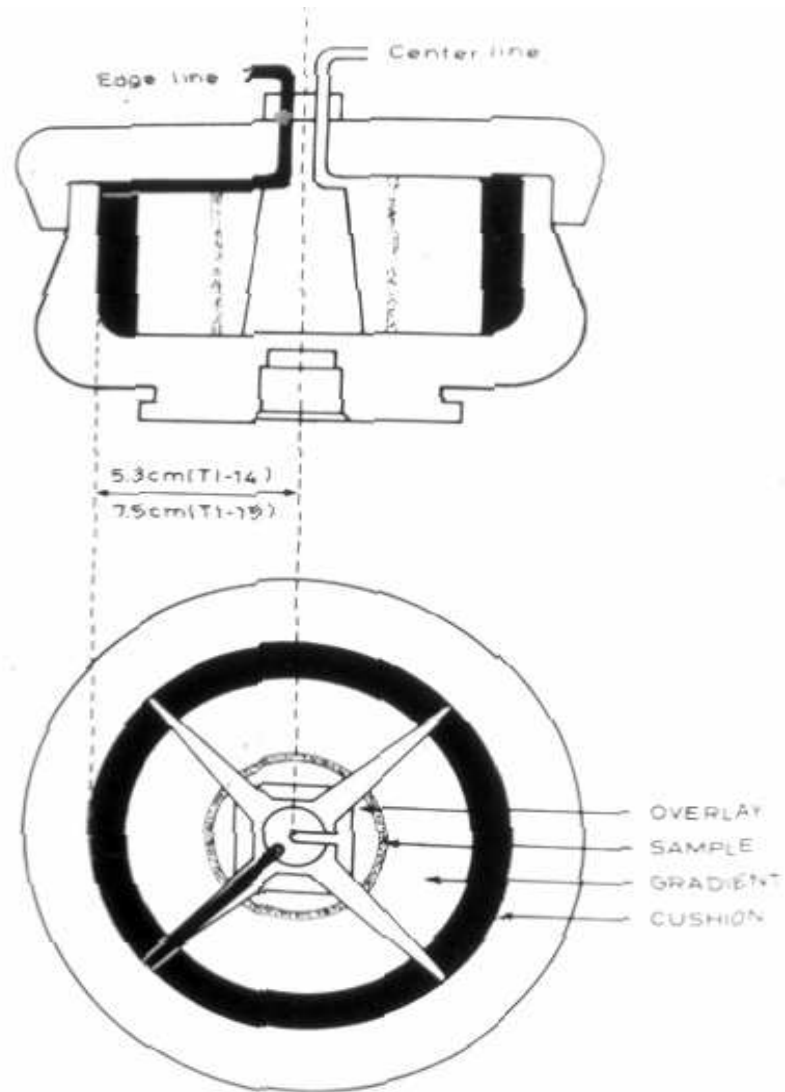
Gradientová centrifugace



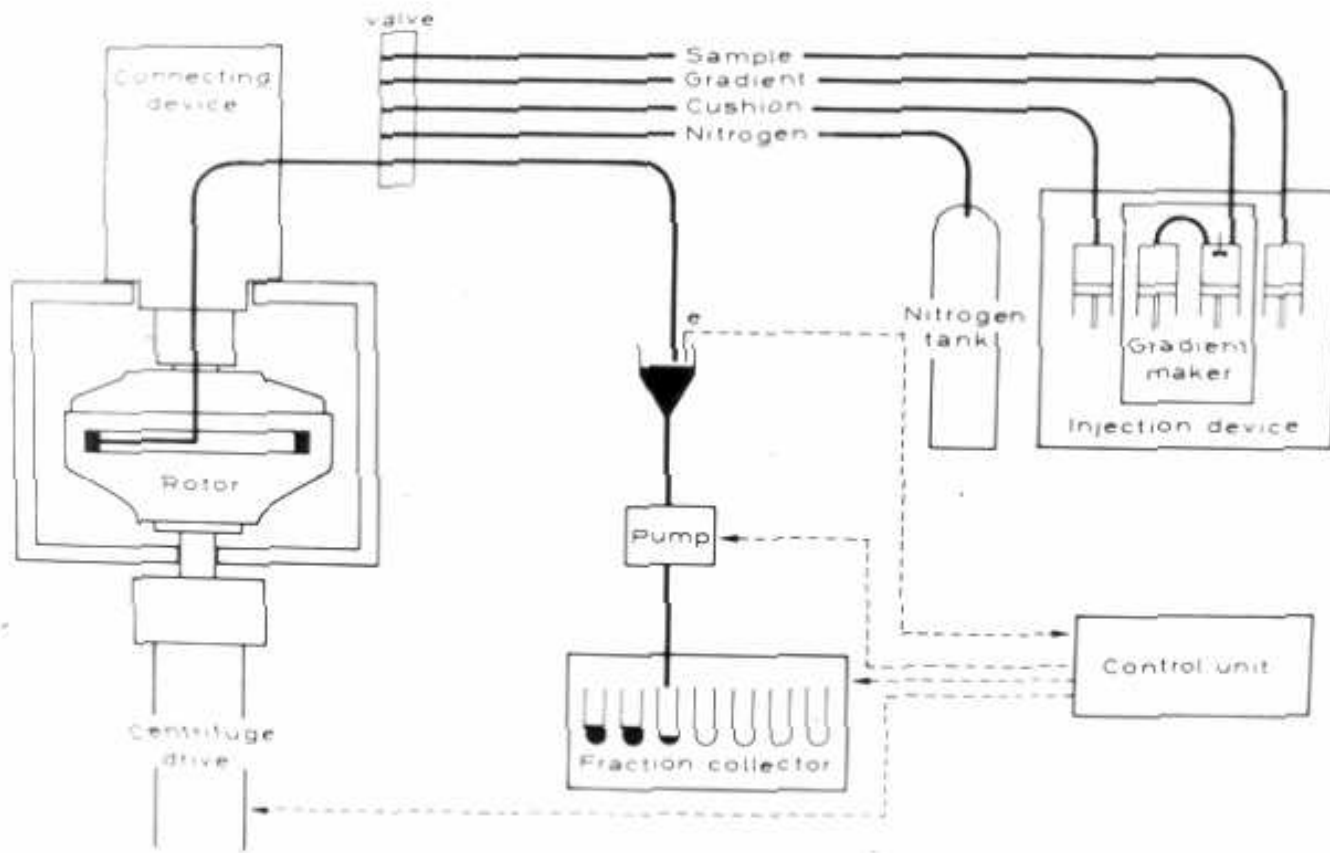
Gradientová centrifugace



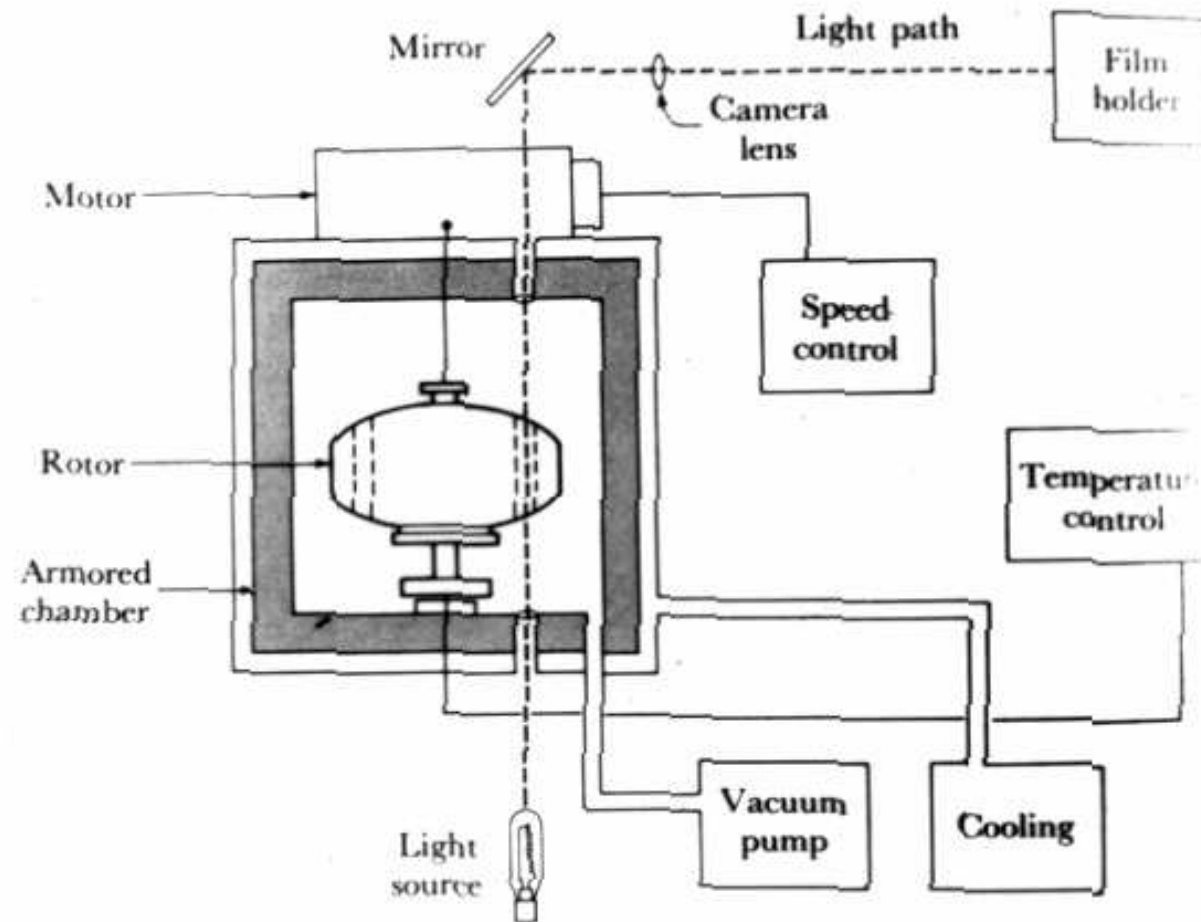
Zonální rotor



Centrifugace se zonálním rotorem



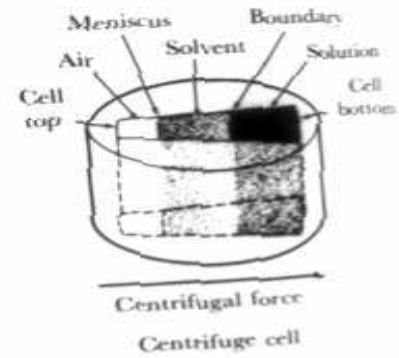
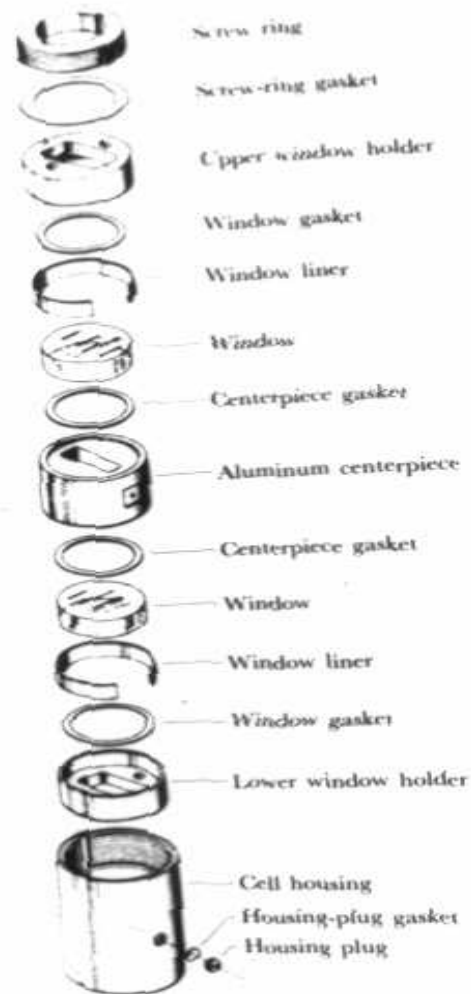
Analytická ultracentrifuga



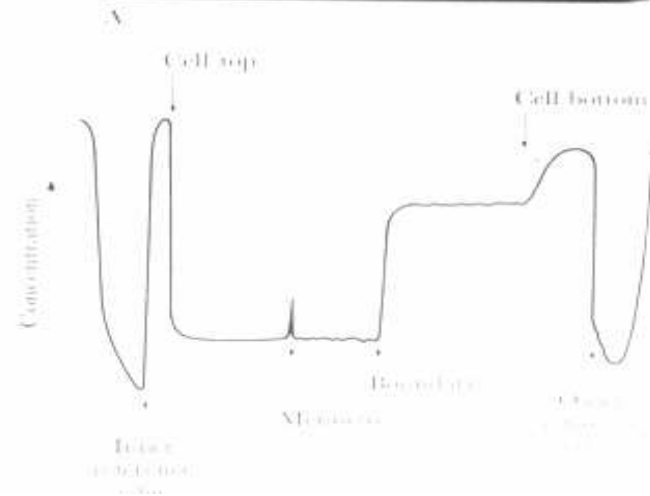
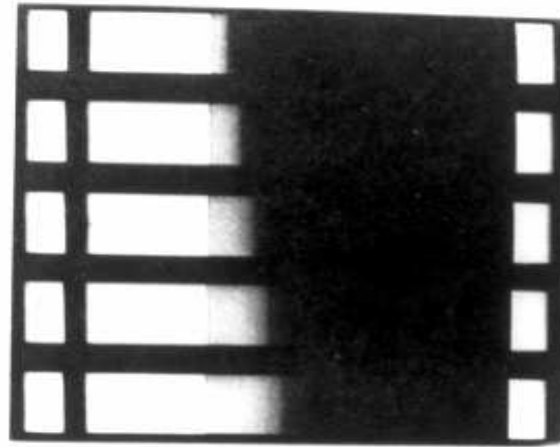
Analytická ultracentrifuga



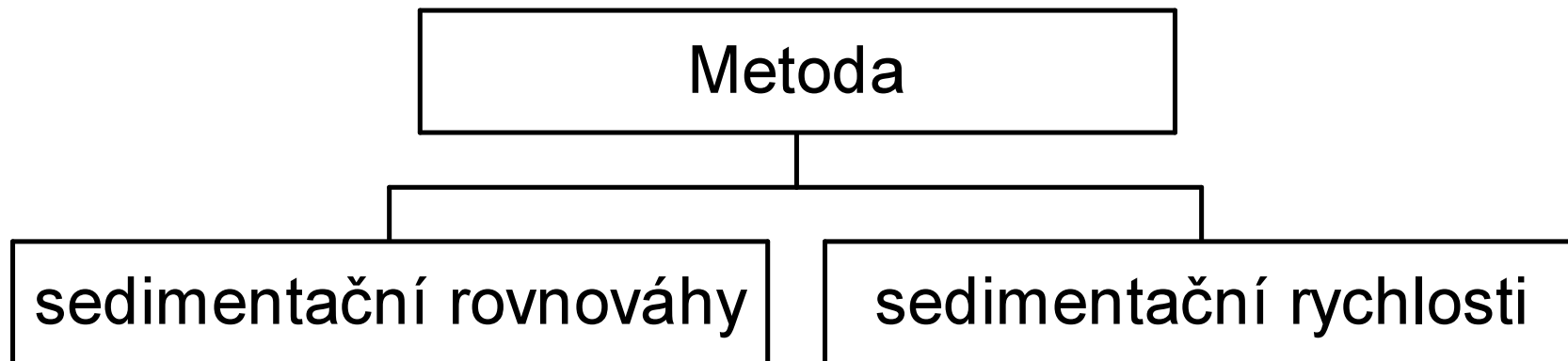
Kyveta



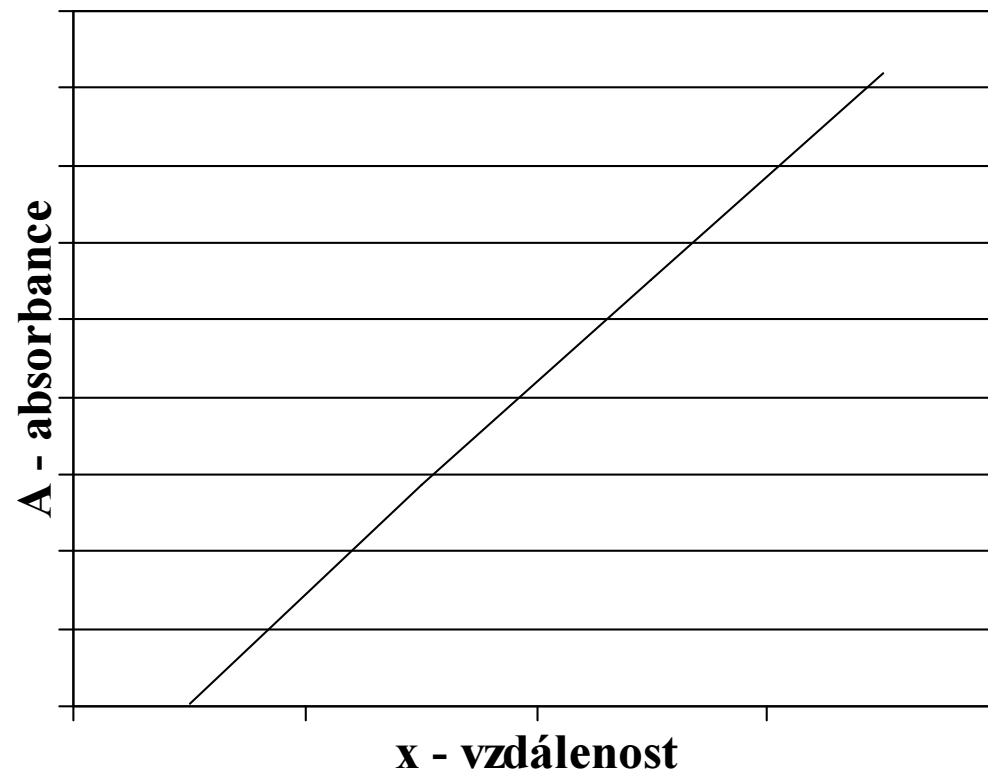
Analytická centrifugace



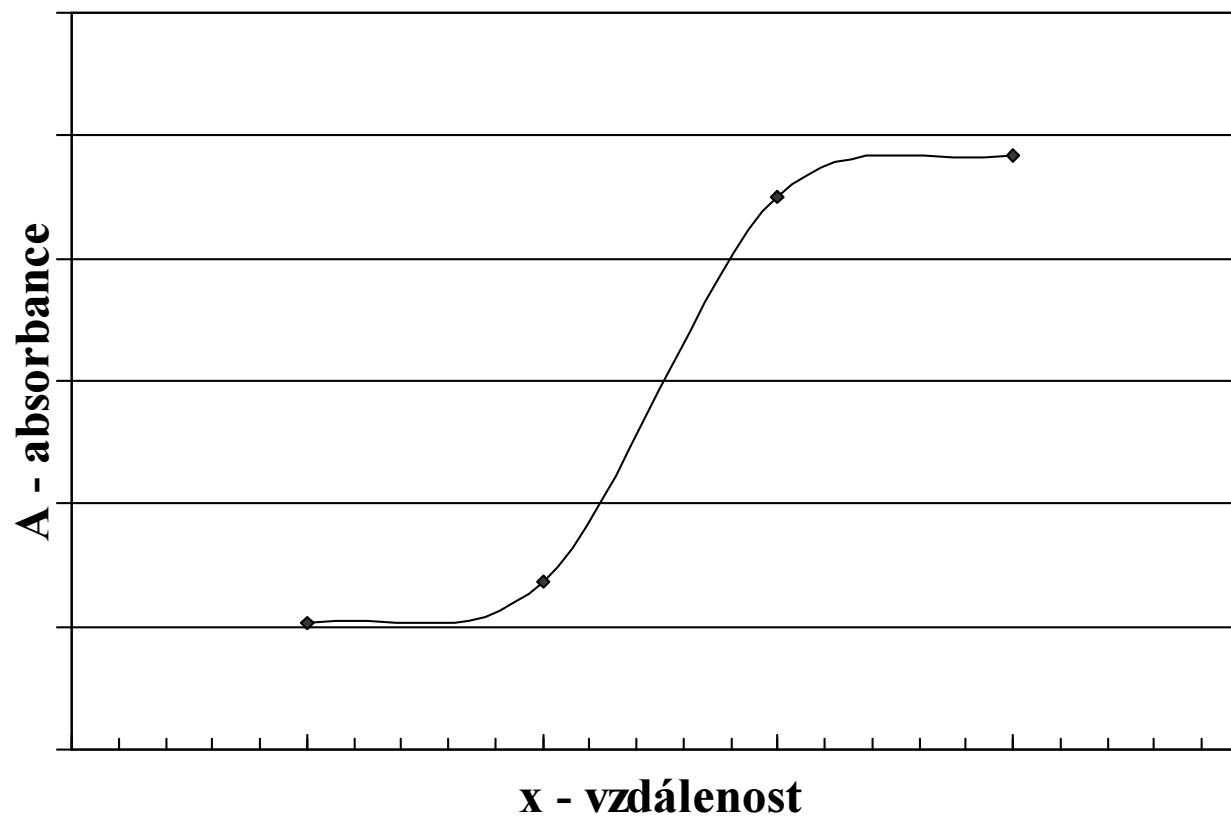
Analytická ultracentrifugace



Metoda sedimentační rovnováhy



Metoda sedimentační rychlosti



Fázové separace

Odstranění H₂O rotační vakuová odparka



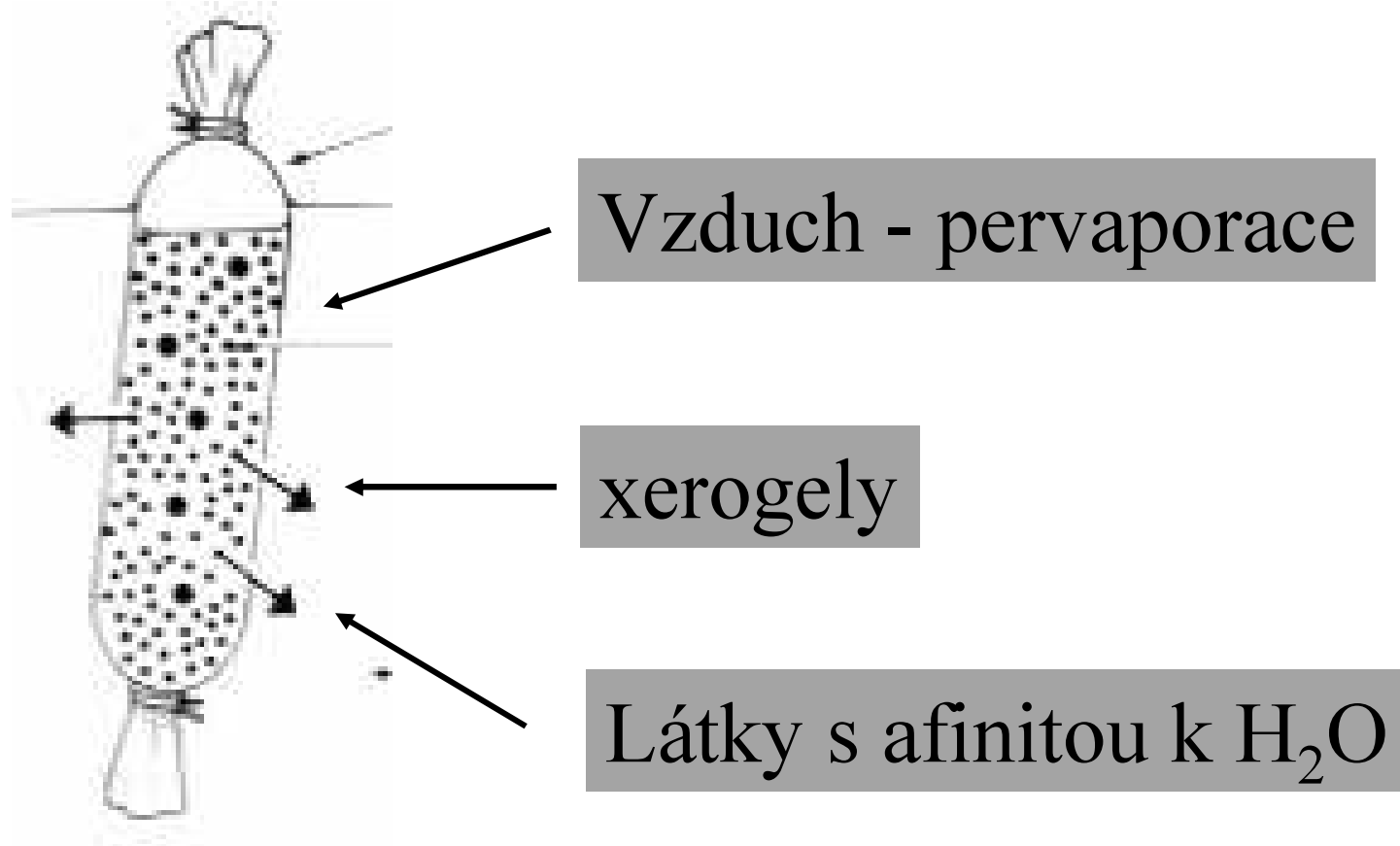
Odstranění H₂O lyofilizace

- Namražení
- Mrazová sublimace



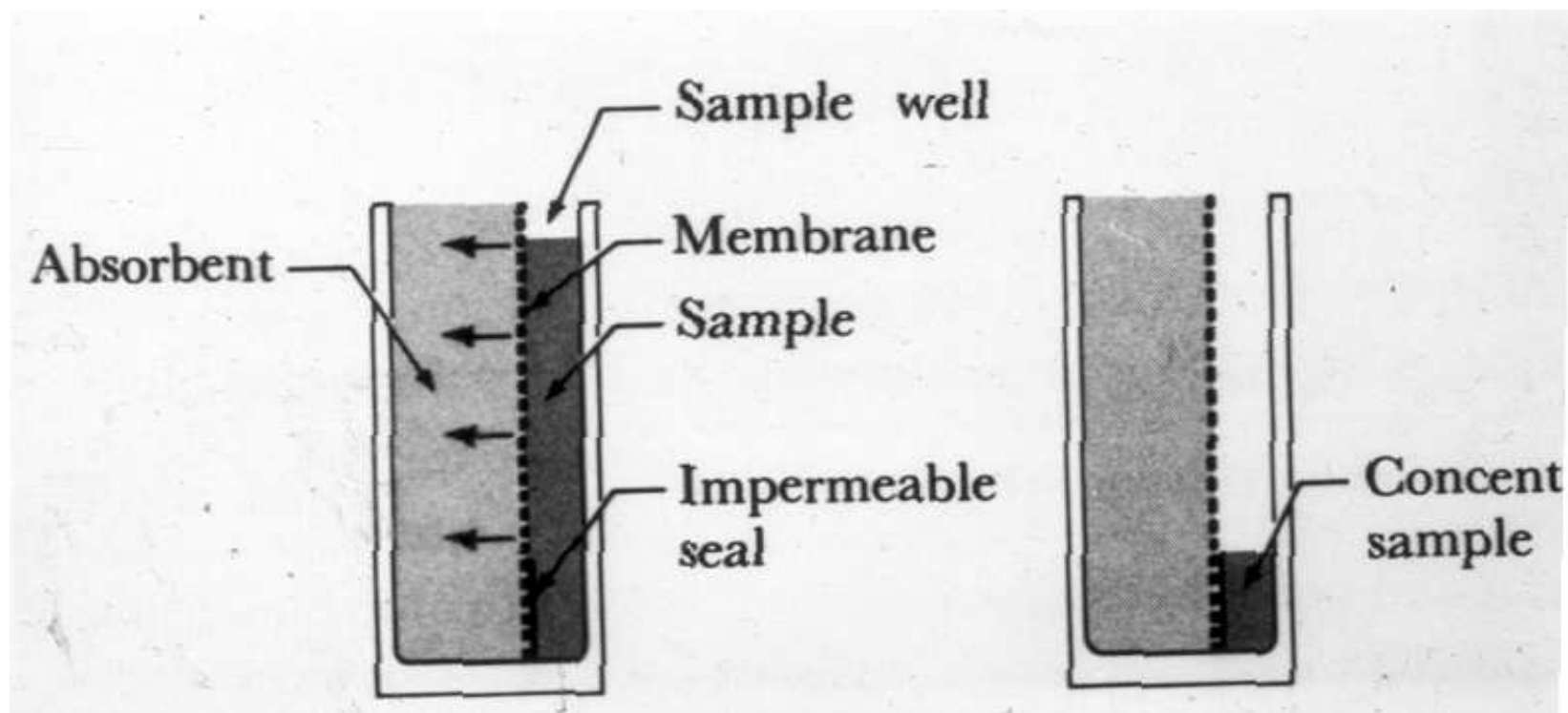
Odstranění H₂O zahuštění

Použití semipermeabilní membrány



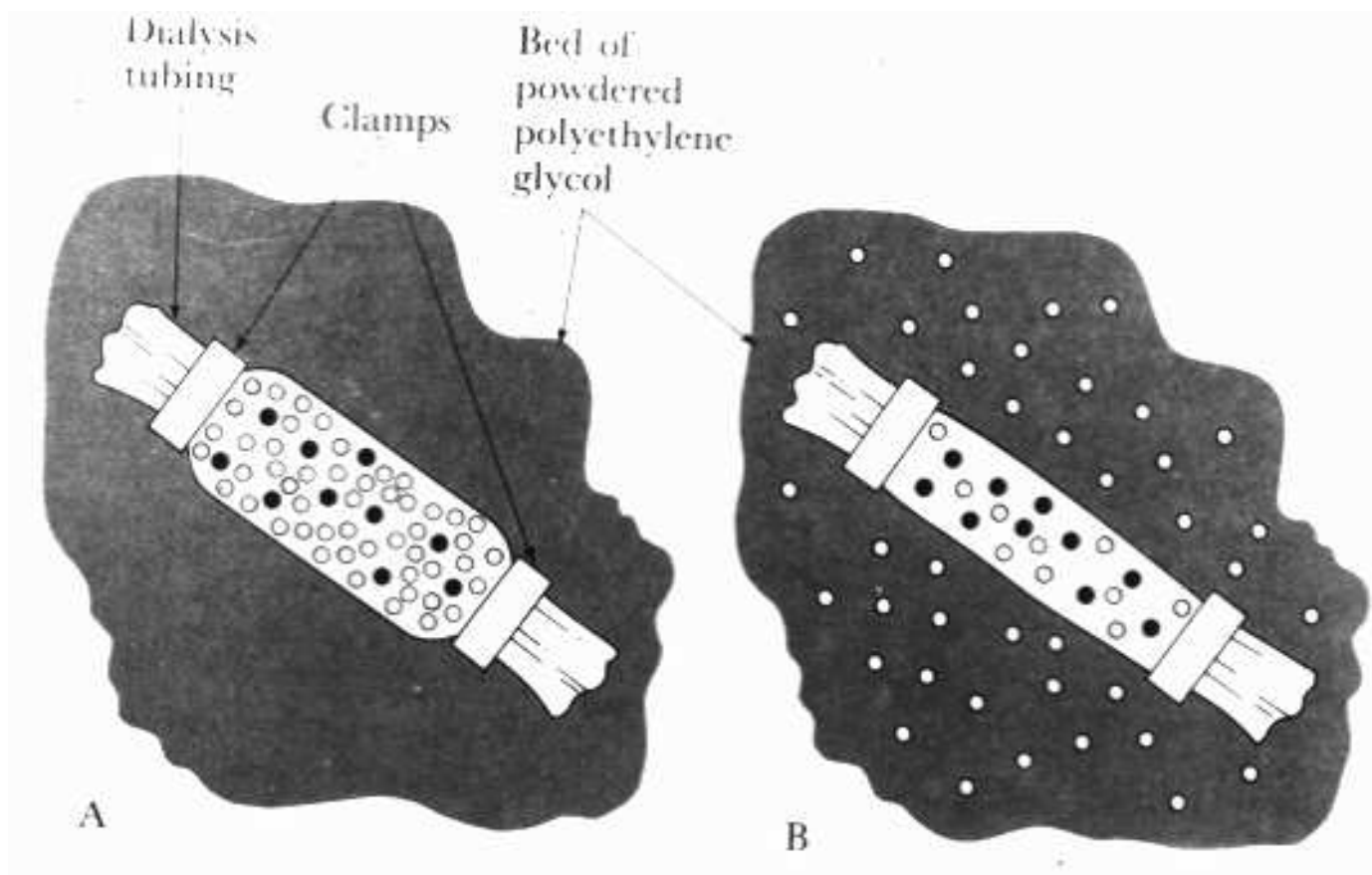
Odstranění H₂O zahuštění

Použití semipermeabilní membrány



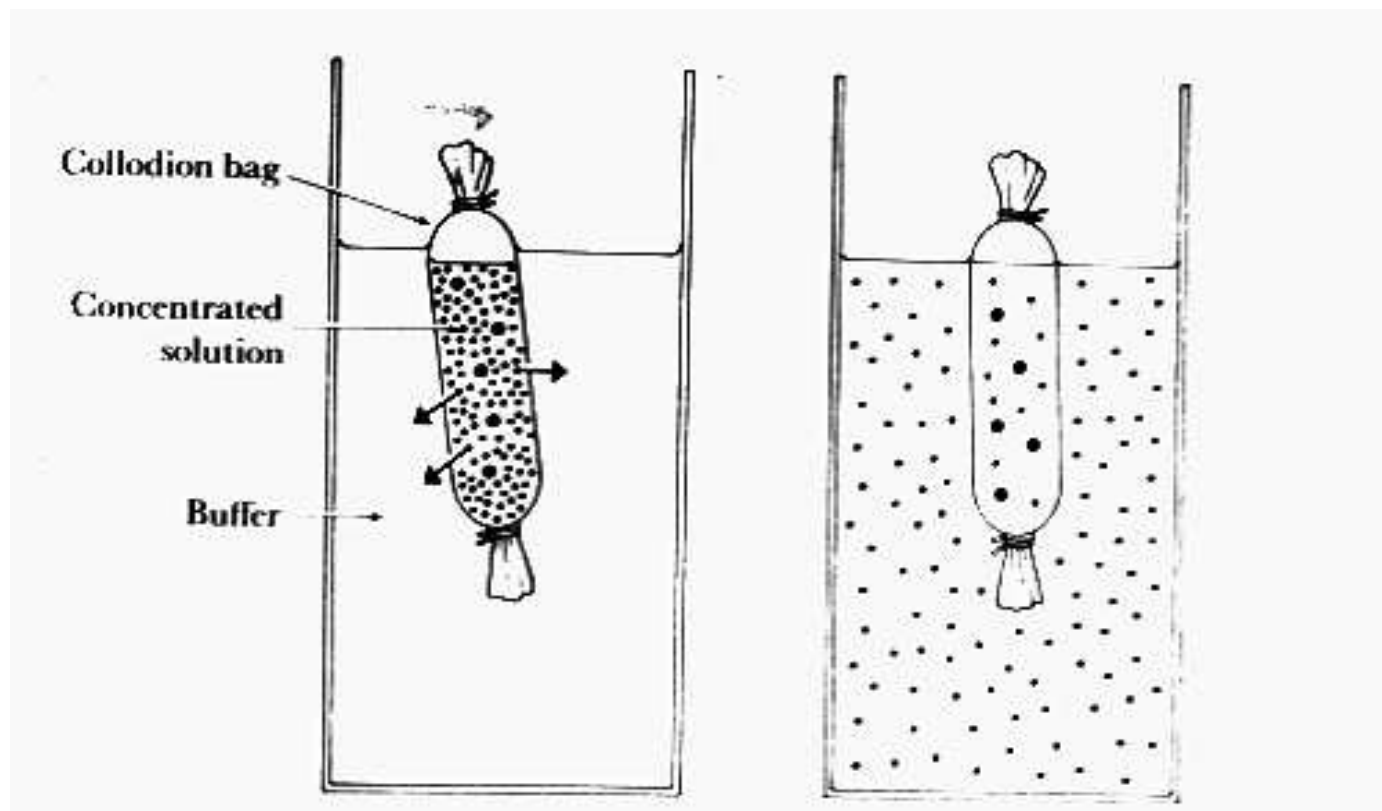
Odstranění H₂O zahuštění

Použití semipermeabilní membrány



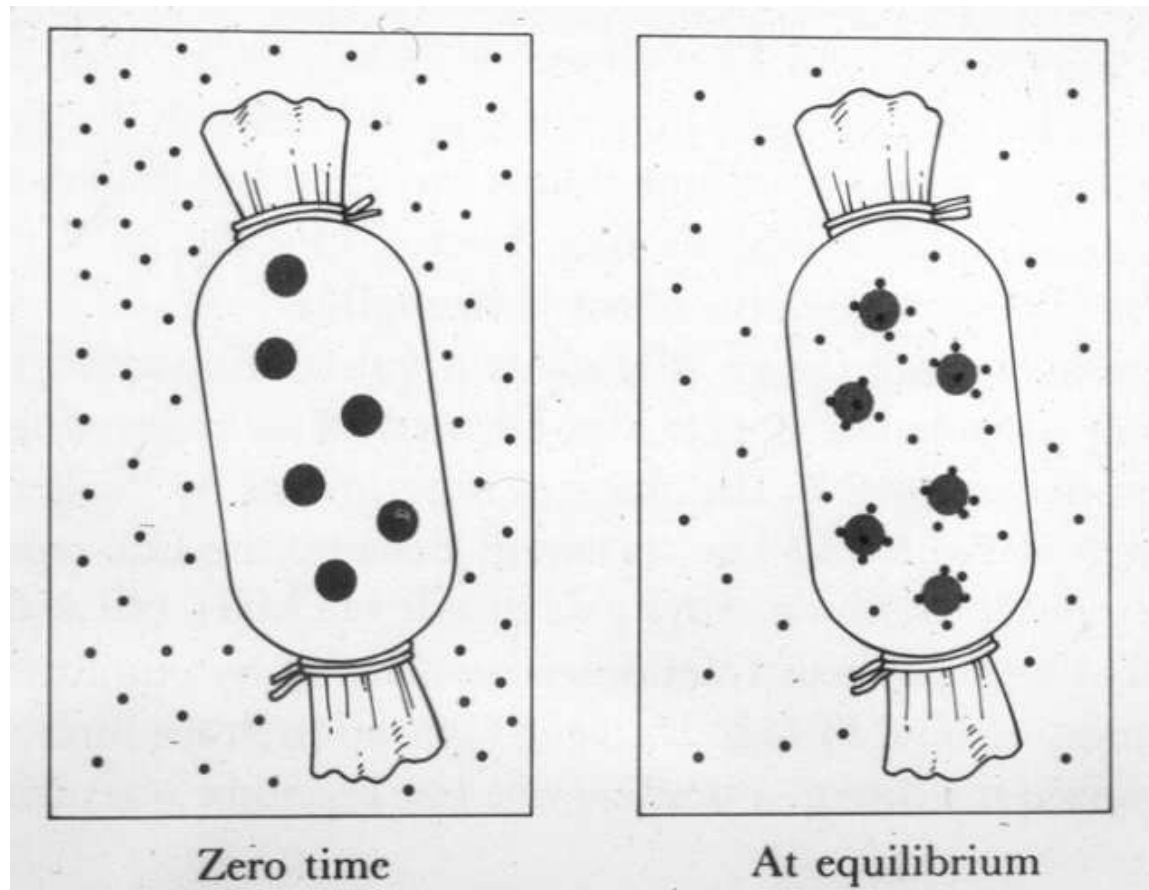
Odstranění nízkomolekulárních složek

Dialýza



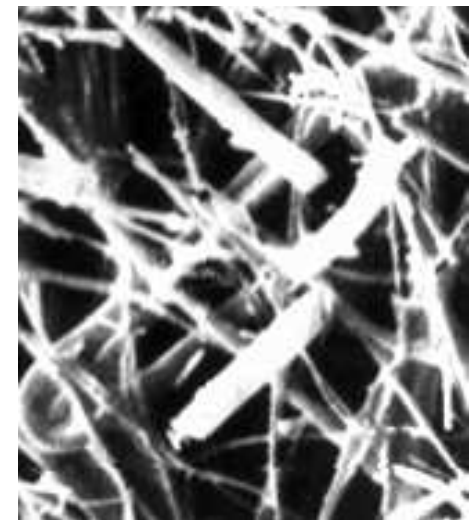
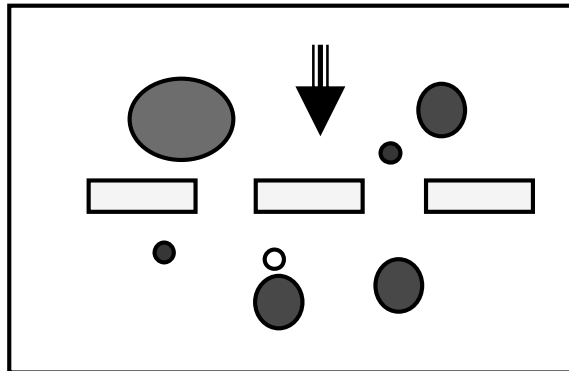
Stanovení interakční konstant

Rovnovážná dialýza

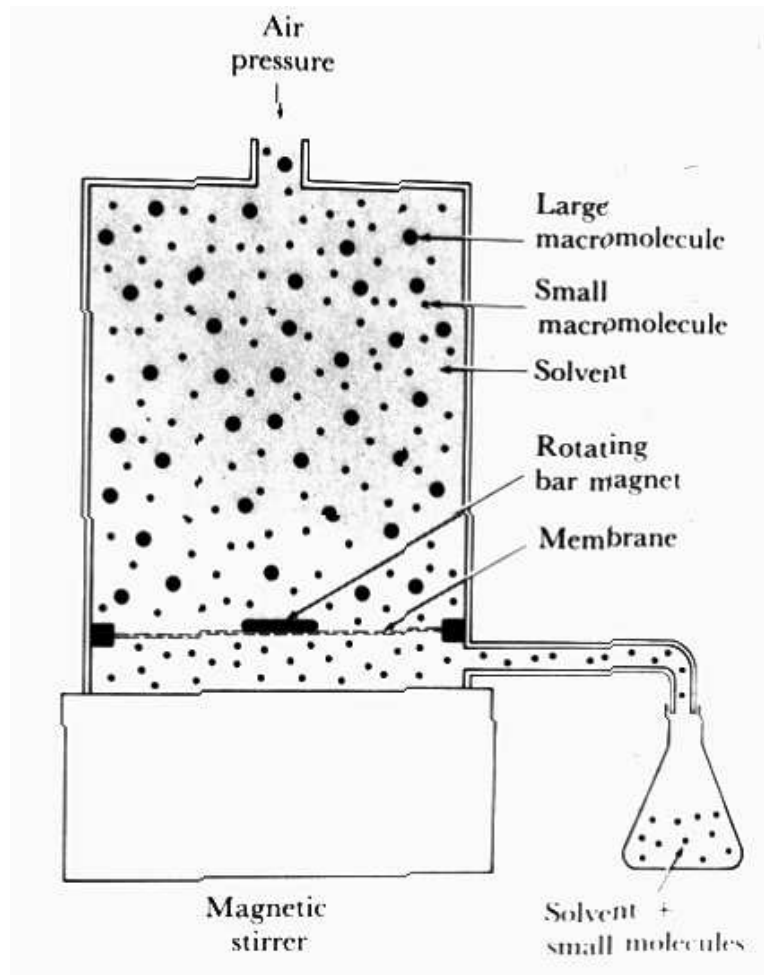


Ultrafiltrace

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



Ultrafiltrace míchané cely

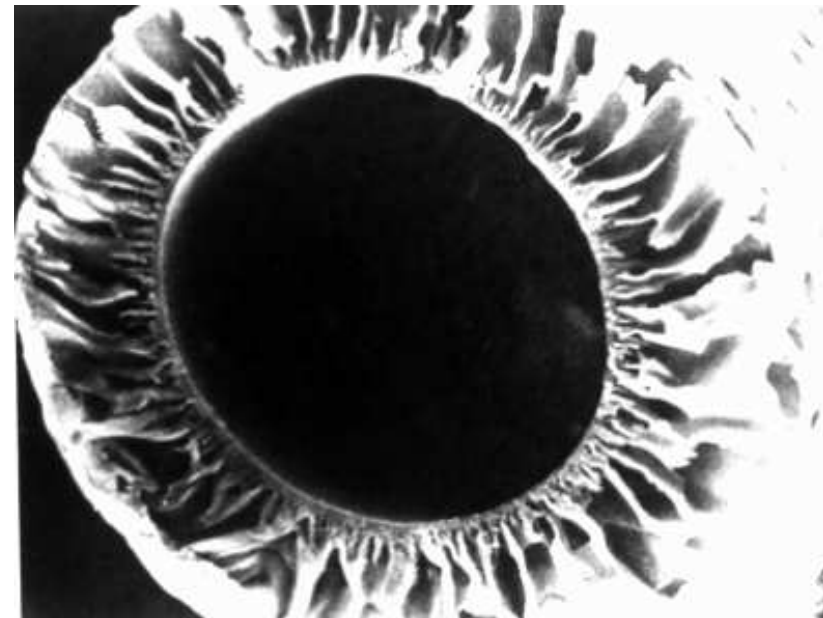
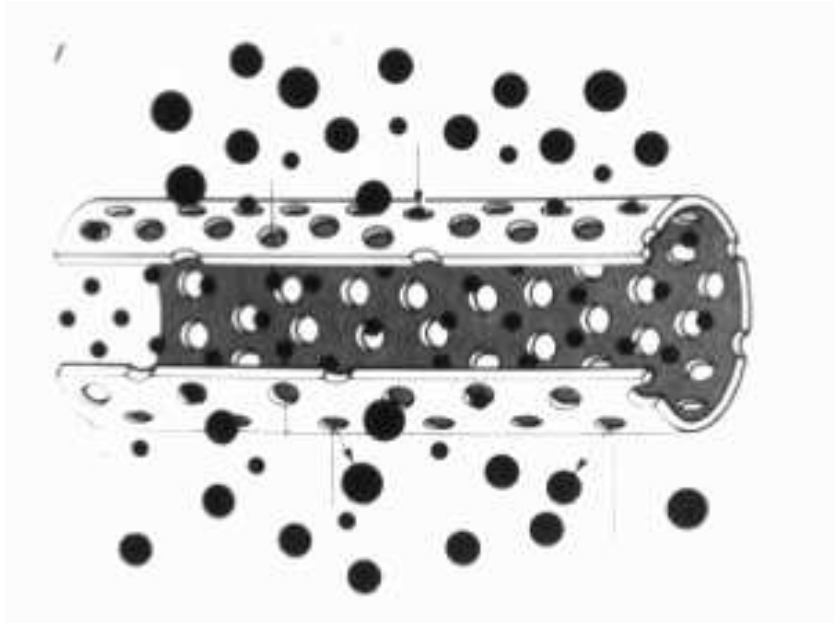


Ultrafiltrace centrifugační přípravky



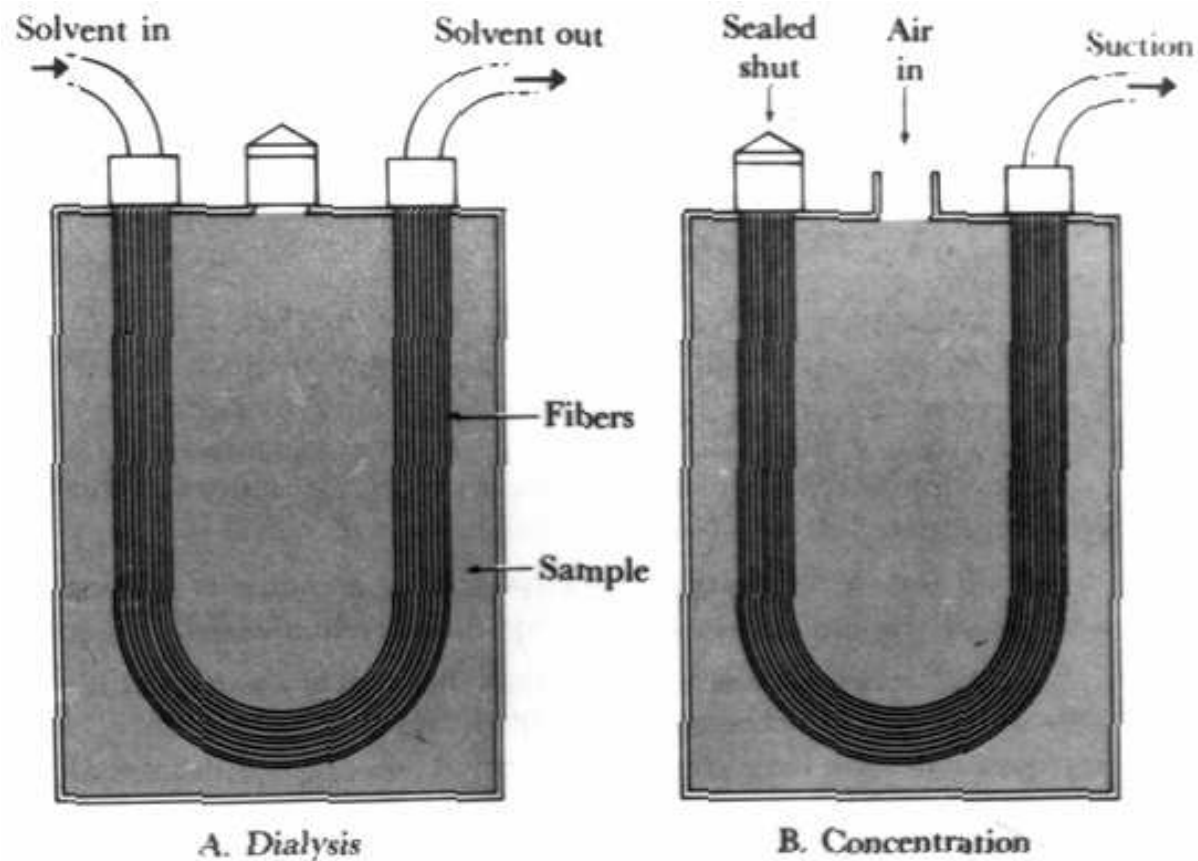
Ultrafiltrace

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

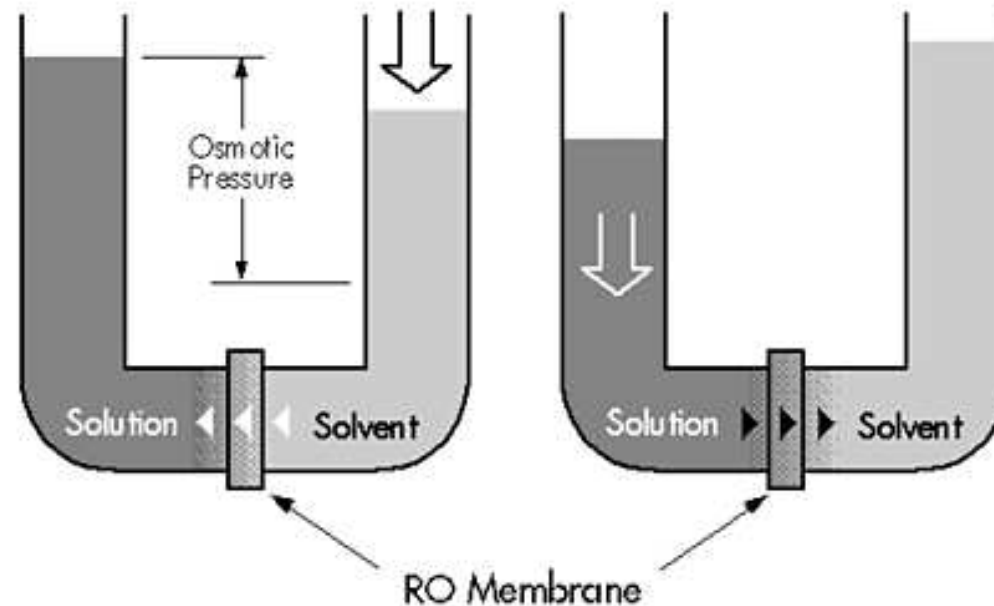
- Vodivost – 18 MΩ/cm
- Těžké kovy – AAS
- Pyrogenita

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

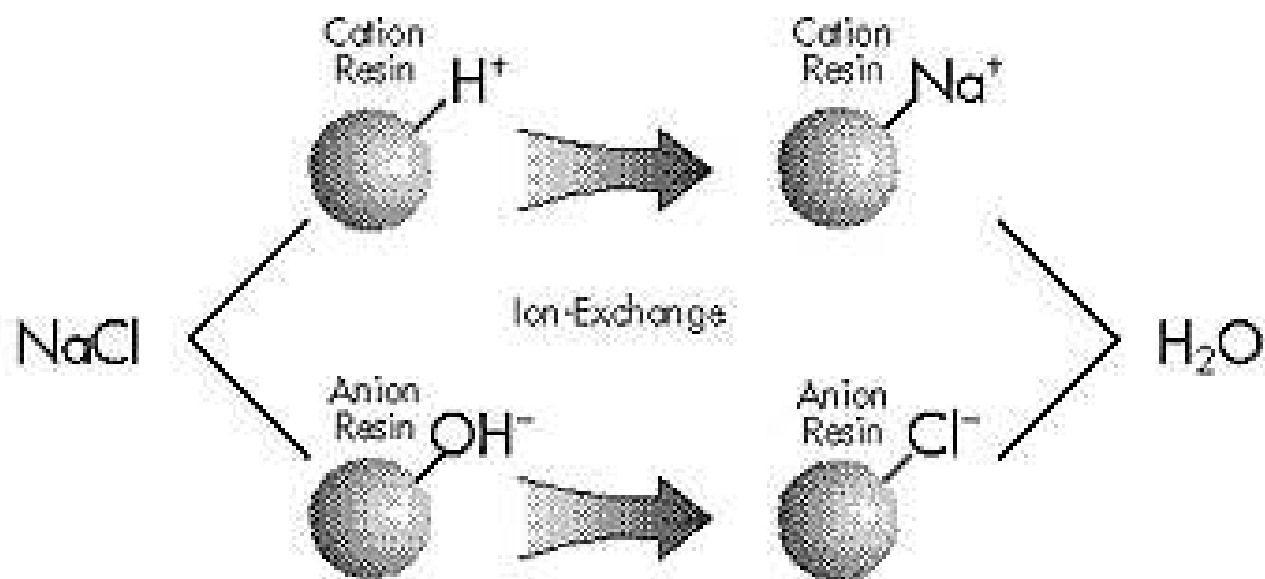
Postupy čišťení reverzní osmoza



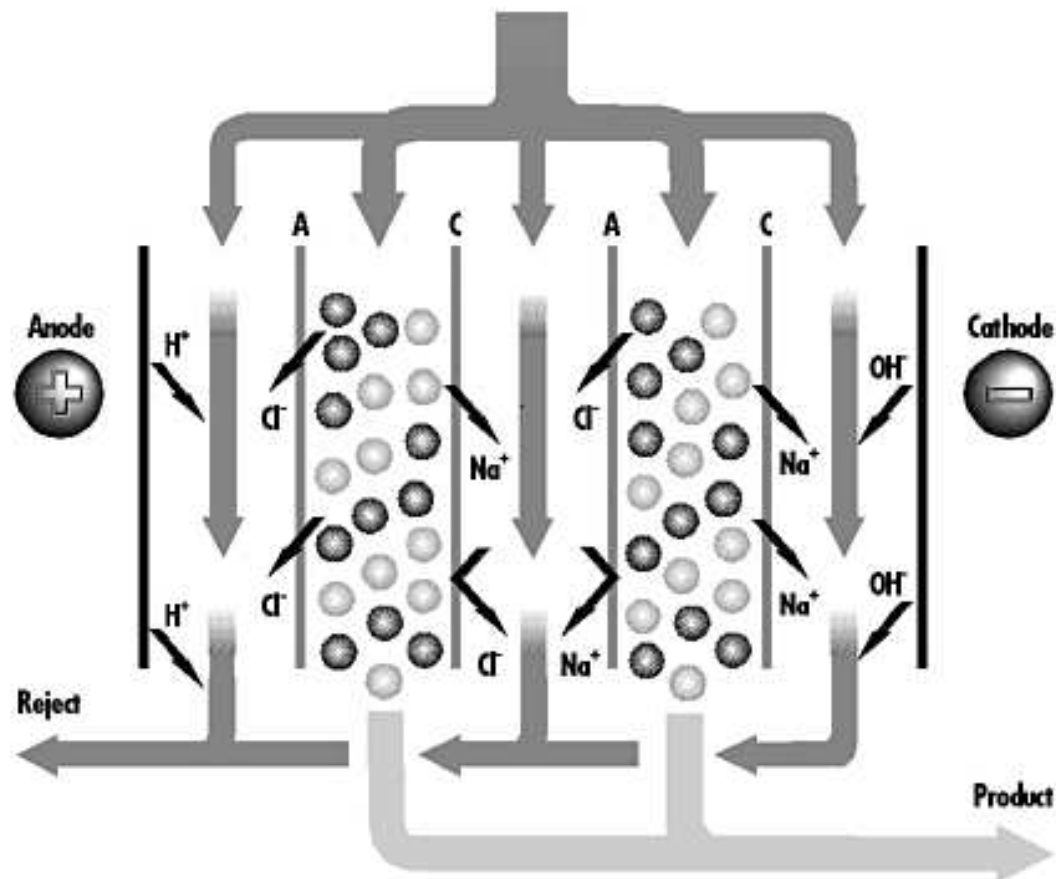
- Nevýhoda – malá kapacita, nevyčistí úplně

Postupy čišťení deionizace

- Kolony se směsnými ionexy – katex + anex



Postupy čišťení elektrodeionizace

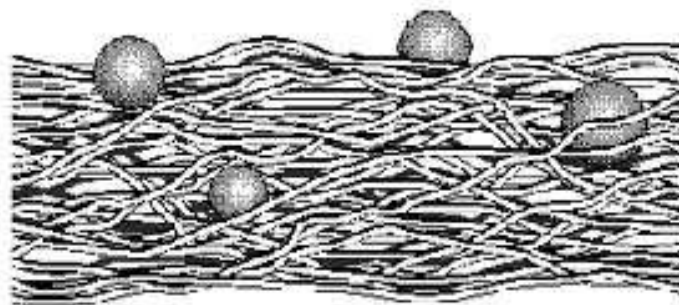


Postupy čištění odstraňování org. látek

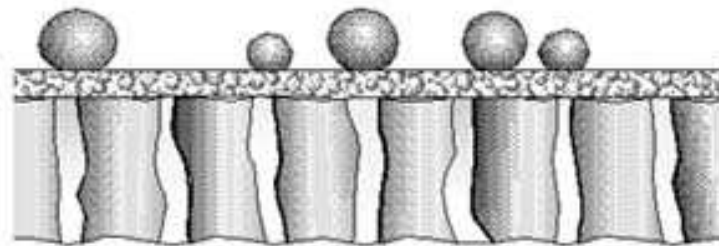
- Speciální patrony s aktivním uhlím a jinými sorbenty
- UV – 180 nm + 254 nm
 - oxidace org. látek,
 - likvidace bakterií

Postupy čištění filtrace

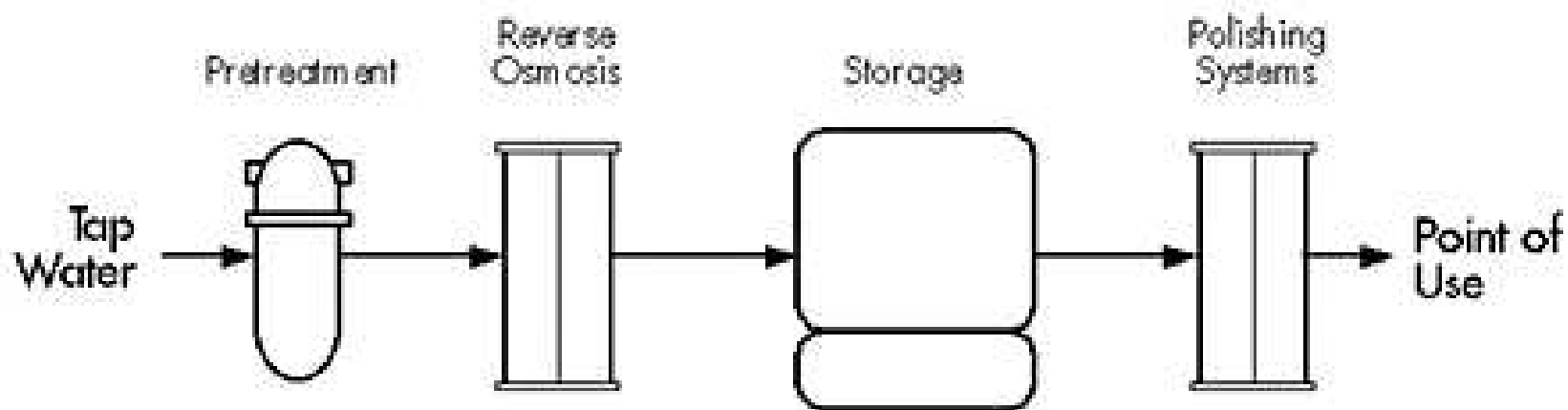
- Membránová – větší póry – bakterie



- 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

