

snímek 1

Metody separace proteinů

snímek 2

Literatura

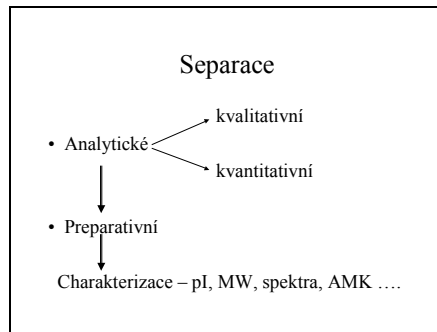
- *Anzenbacher, Kovář* : Metody chemického výzkumu pro biochemiky
- *Ferenčík* : Biochemická laboratorní technika
- *Scopes* : Protein Purification
- *Harris* : Protein Purification Methods – Practical Approach
- *Deutcher* : Guide to Protein Purification
- *Janson* : Protein Purification
- *Kastner*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

snímek 3

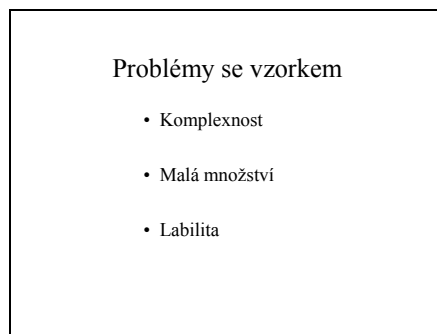
Metody separace proteinů

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

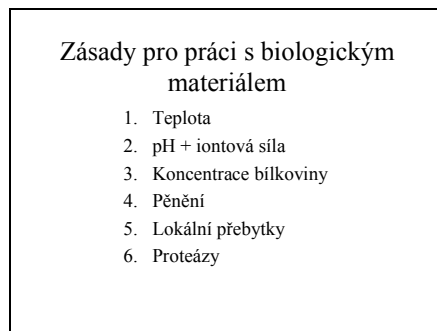
snímek 4



snímek 5



snímek 6



snímek 7

Plánování separace bílkovin

snímek 8

Cíl izolace

- Získání homogenní bílkoviny
- Zachování biologické aktivity
- Čistota

↓

Závěr: získat vzorek o patřičné čistotě s vynaložením patřičného úsilí

snímek 9

Volba vstupního materiálu

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

snímek 10

Volba a kombinace separačních metod

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

snímek 11

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

snímek 12

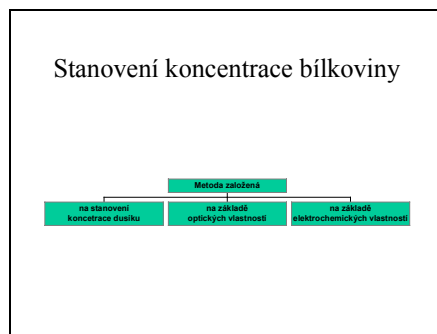
- Pořadí volit tak, aby metody na sebe vhodně navazovaly
- Metody zředovací kombinovat s metodami koncentrujícími
- Metody nepoužívat opakovaně

snímek 13

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 %

snímek 14



snímek 15

Kjeldahlova metoda – stanovení N_2

- Mineralizace vzorku – převedení organického dusíku na NH_4^+
- Stanovení NH_4^+ - titrace, fotometrie, selektivní elektrody

snímek 16

UV spektrofotometrie

- 280 nm – aromatické AMK
interference nukleotidů

- 180 - 230 nm – peptidická vazba

Výhody - nedestruktivní metoda
- není třeba kalibrace

snímek 17

VIS spektrofotometrie

Přídavek činidla → barevný derivát

- Destruktivní metoda
- Nutná kalibrační závislost

snímek 18

Biuretová metoda

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



Měření : 540 – 560 nm
310 nm

snímek 19

Folinova metoda

Princip : hydroxyfenolová skupina tyrosinu redukuje fosfomolybdenany na molybdenovou modř

Měření : 725 nm

snímek 20

Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a Biuretové metody

Měření : 600 nm

snímek 21

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

snímek 22

Fluorescence

Princip : - vazba fluoroforu na bílkovinu →
měření vzniklé fluorescence

- zhášení fluorescence přidávkem
bílkoviny

snímek 23

Polarografie

Princip : Brdičkova reakce – SH skupiny
bílkoviny vstupují v přítomnosti
Co²⁺ katalytické reakce na Hg
elektrodě → proud

snímek 24

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

snímek 25

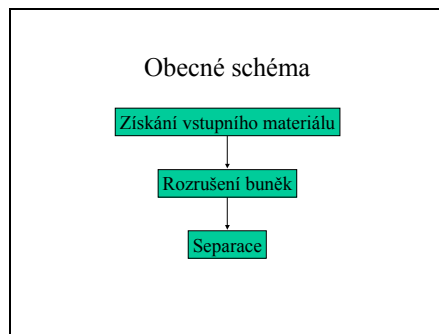
Stanovení biologické aktivity

Enzymatické, imunologické, toxické,
hormonální receptorové atd..

snímek 26

Vlastní separace

snímek 27



snímek 28

Vstupní materiál

snímek 29

Mikroorganismy

Bakterie, kvasinky, plísně, řasy

Výhody - lze je snadno získat v dostatečném množství

- selekce mutantů o požadovaných vlastnostech
- genetické inženýrství
- termofilní organismy

snímek 30

Bezobratlí

Hmyz, plži, mlži

Nevýhody - málo se používá, nesnadno se získává

snímek 31

Živočišné tkáně

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

snímek 32

Rostlinné tkáně

Špenát, řepa, hrách

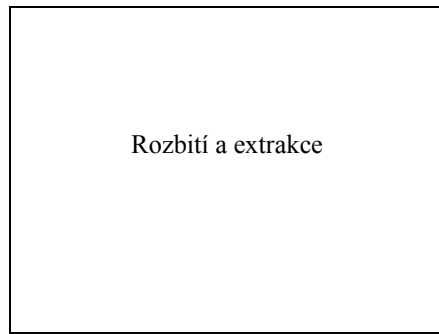
Nevýhoda – problematický růst za
definovaných podmínek

snímek 33

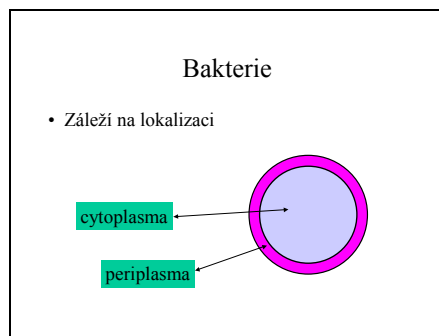
Manipulace s biologickým materiálem

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

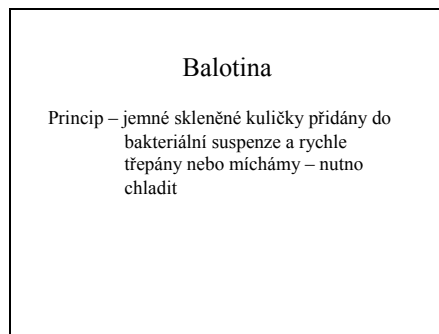
snímek 34



snímek 35



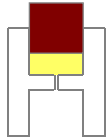
snímek 36



snímek 37

French (X) press

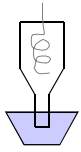
Princip – zmražená bakteriální suspenze protlačována malým otvorem, přičemž dochází k rekrystalizaci a rozrušení buněk



snímek 38

Ultrazvuk

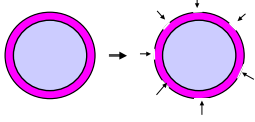
Princip – ultrazvuk (> 20 kHz) v roztoku vyvolává střížní síly – nutno chladit



snímek 39

**Lysozym + osmotický šok
(mírný osmotický šok)**

Princip – lysozym rozruší buněčnou stěnu, následně je bakteriální suspenze zředěna destilovanou H₂O – bakterie popraskají



snímek 40

Další

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

snímek 41

Kvasinky

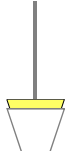
Toluenová autolýza
Princip – toluen extrahuje při 35–40 °C
fosfolipidy buněčné stěny →
osmotický šok → enzymová
autolýza

Balotina, French press,

snímek 42

Živočišné tkáně

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



snímek 43

Rostlinné tkáň

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

snímek 44

Optimalizace extrakce

- Teplota – 4 – 6 °C chlazení
- pH – optimální pro danou bílkovinu – práce v pufrách
- I – v prostředí o definované iontové síle
- Přidávky látek – EDTA, β-merkapt ethanol, kovové ionty, inhibitory proteáz

snímek 45

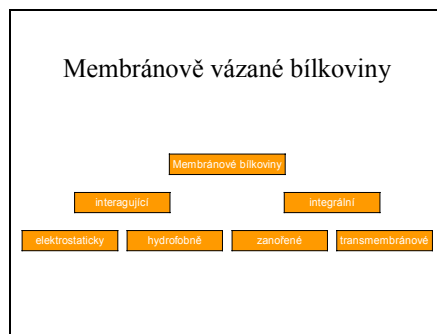
Separace subcelulárních organel

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'

snímek 46

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

snímek 47



snímek 48

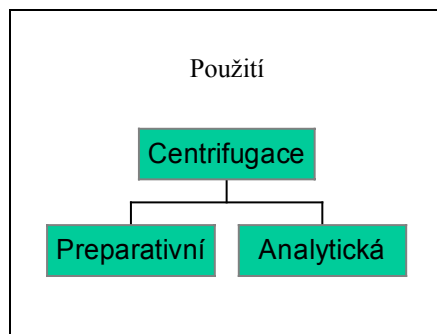
- Izolace membránových bílkovin
- *Chemicky* – detergenty, chaotropní soli, organická rozpouštědla, nízká iontová síla,
 - *Fyzikálně* - homogenizace, sonikace
 - *Enzymaticky* – fosfolipasy, lipasy, proteasy

snímek 49

Centrifugace

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

snímek 50



snímek 51

Otáčky → g

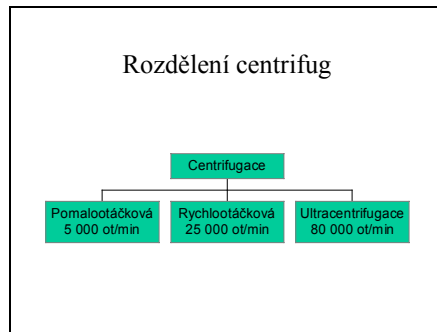
$g = \omega^2 \cdot r$

ω - uhlová rychlost (rad/s)

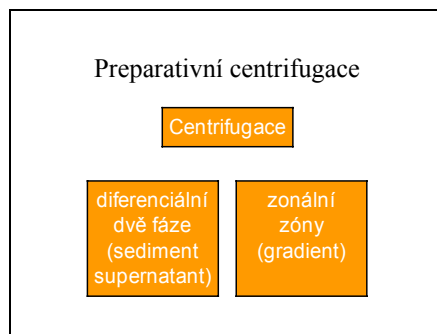
$\omega = 2\pi \cdot f$

f – otáčky/min

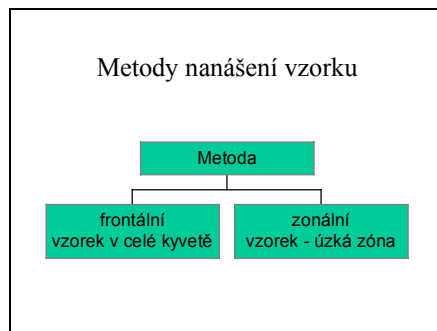
snímek 52



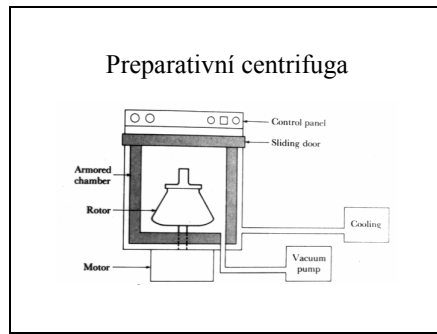
snímek 53



snímek 54



snímek 55



snímek 56



snímek 57



snímek 58

Rotory

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

snímek 59

Úhlový rotor


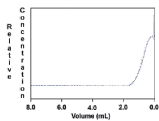



Figure 4



snímek 60

Výkyvný rotor


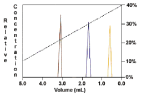



Figure 2



snímek 61

Gradientová centrifugace
médiá

- Sacharosa
- Glycerol

} Hypertonické prostředí
Nutno připravit gradient

- Ficoll - dextran
- Percoll – SiO₂

• CsCl – gradient vzniká během centrifugace

snímek 62

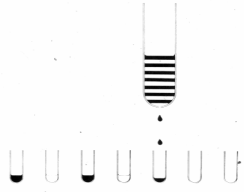
Gradientová centrifugace

Metoda

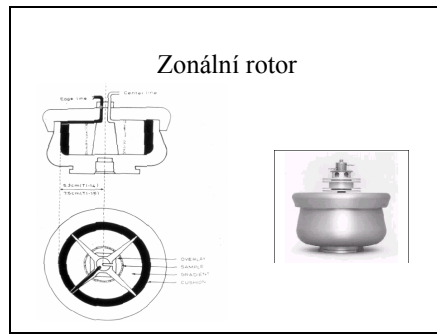
Izopyknická Nerovnovážná

snímek 63

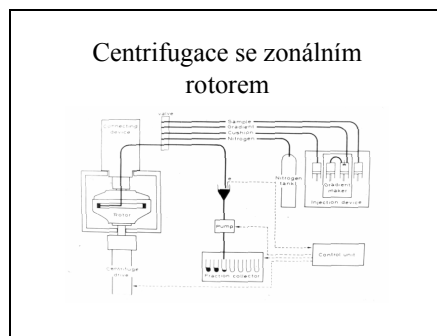
Gradientová centrifugace



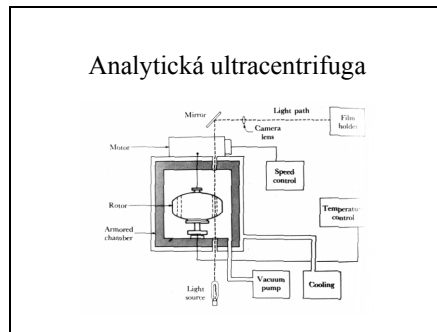
snímek 64



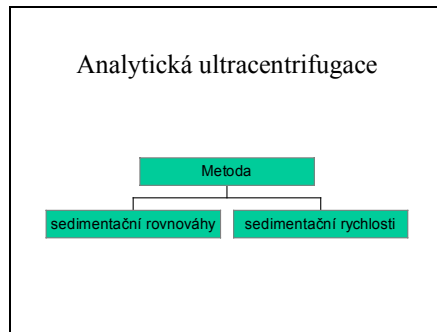
snímek 65



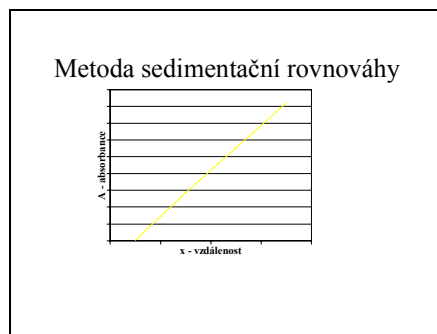
snímek 66



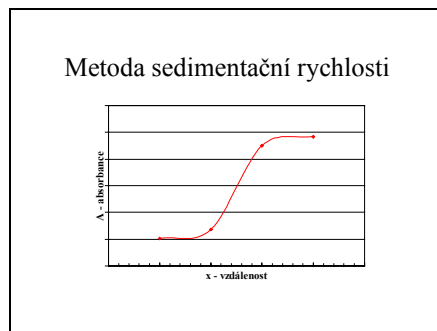
snímek 70



snímek 71



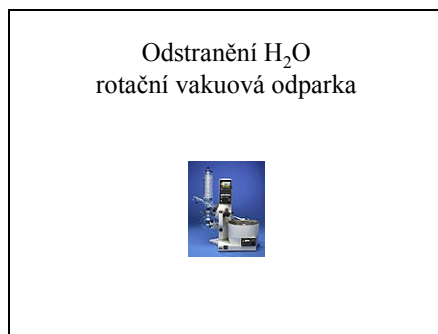
snímek 72



snímek 73



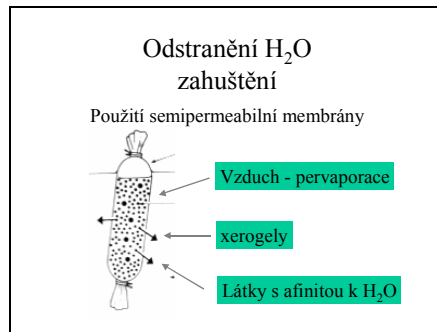
snímek 74



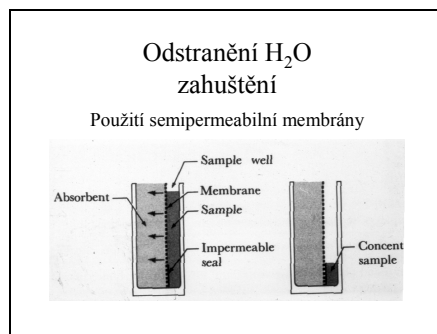
snímek 75



snímek 76



snímek 77



snímek 78



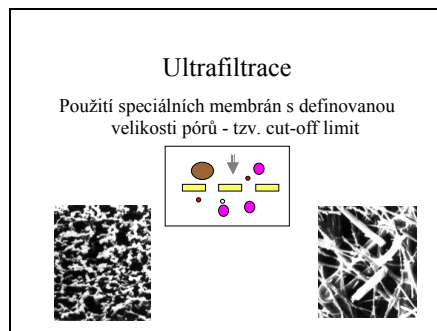
snímek 79



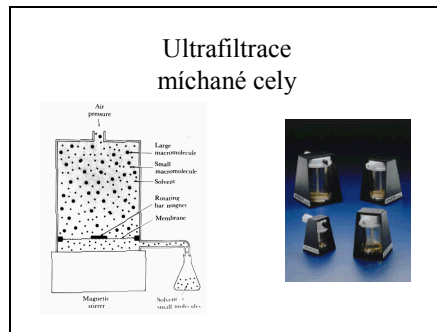
snímek 80



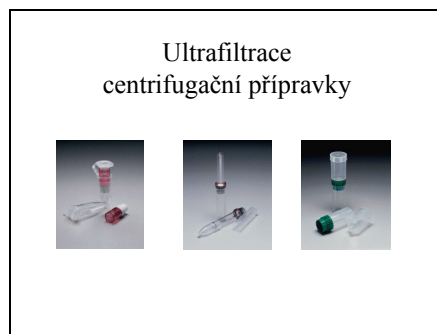
snímek 81



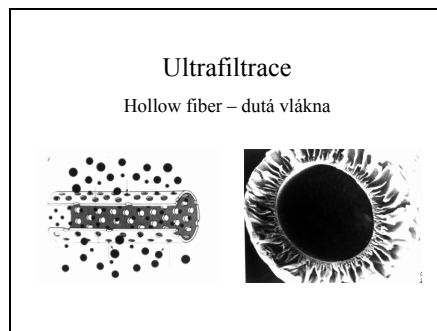
snímek 82



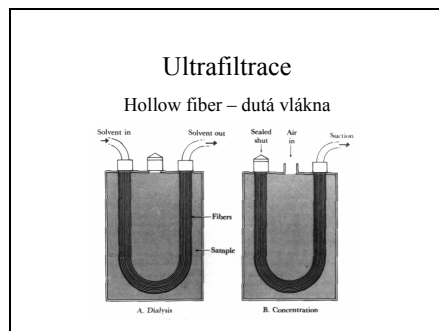
snímek 83



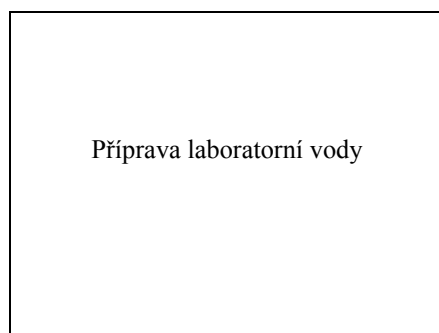
snímek 84



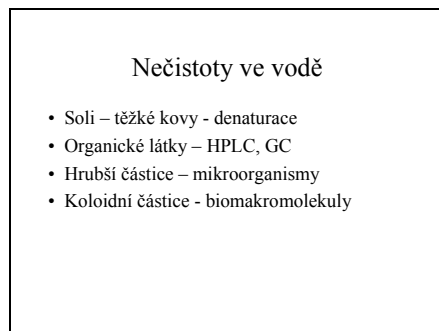
snímek 85



snímek 86



snímek 87



snímek 88

Kriteria čistoty

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

snímek 89

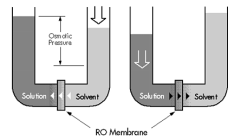
Postupy čistění destilace

- 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

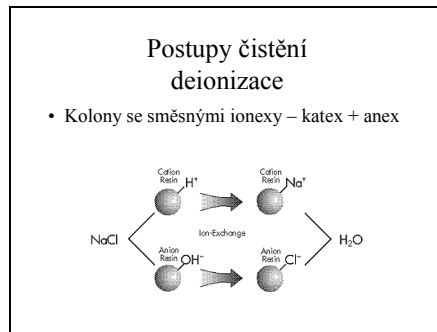
snímek 90

Postupy čistění reverzní osmoza

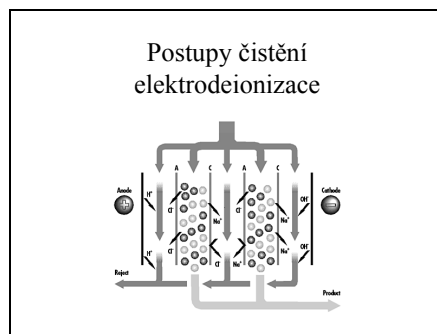


- Nevýhoda – malá kapacita, nevyčistí úplně

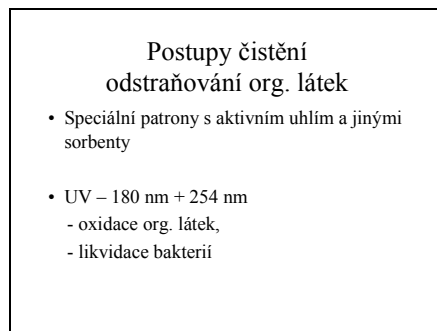
snímek 91



snímek 92



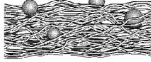
snímek 93



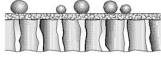
snímek 94

**Postupy čištění
filtrace**

- Membránová – větší póry – bakterie

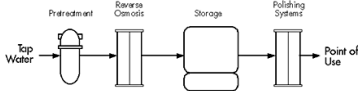


- Ultrafiltrace – malé póry - koloidní částice



snímek 95

**Kaskádový systém
kombinace**



snímek 96

**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