

Instrumentální biochemické metody



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Literatura

Understanding Bioanalytical Chemistry

Principles and Applications

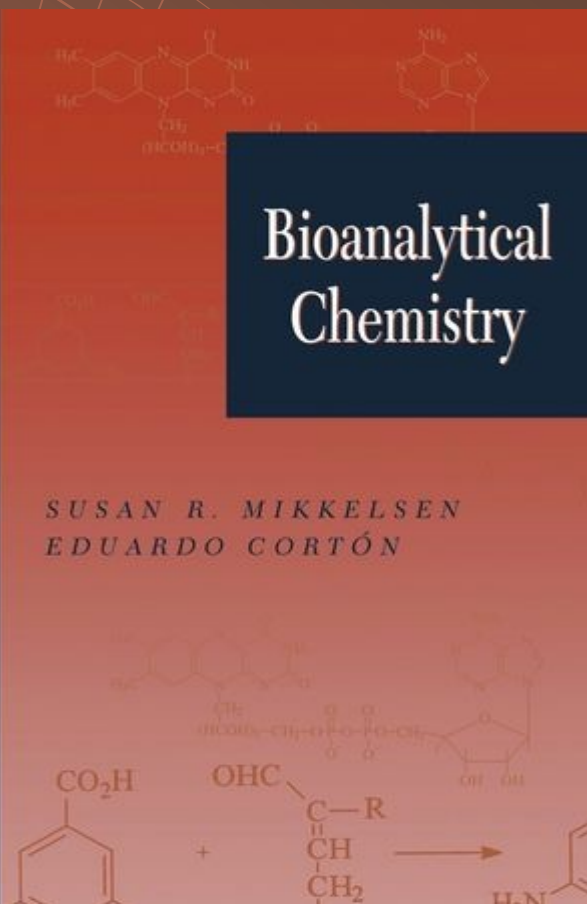


Victor A. Gault and Neville H. McClenaghan

WILEY-BLACKWELL

Bioanalytical Chemistry

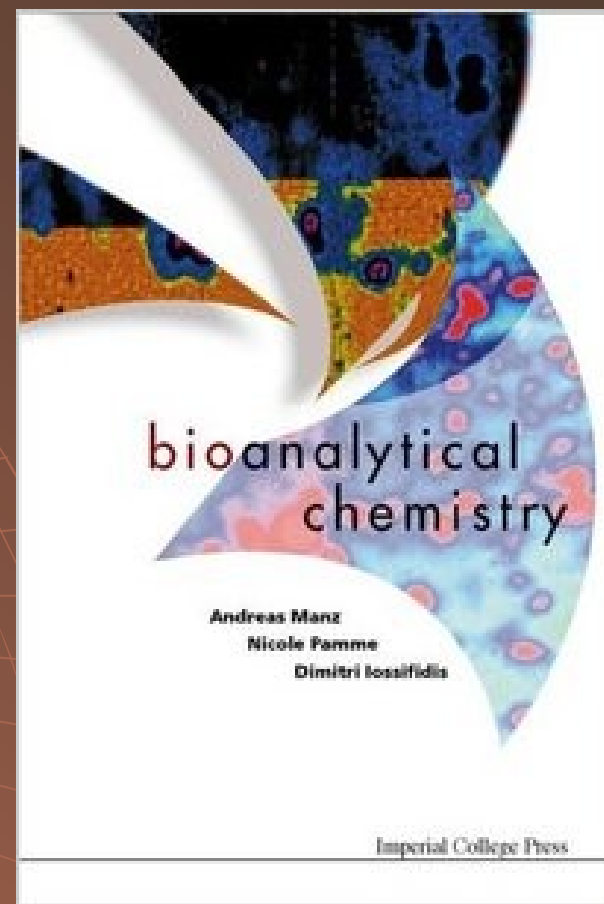
SUSAN R. MIKKELSEN
EDUARDO CORTÓN



bioanalytical chemistry

Andreas Manz
Nicole Famme
Dimitri Iossifidis

Imperial College Press



Literatura

- ◆ *Anzenbacher, Kovář* : Metody chemického výzkumu pro biochemiky. *MŠ Praha, 1986.*
- ◆ *Ferenčík, Škárka* : Biochemická laboratorní technika. *Alfa Bratislava 1981.*

Separační metody

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

Separace

◆ Analytické

kvalitativní

kvantitativní

◆ Preparativní

Charakterizace – pI, MW, spektra, AMK ...

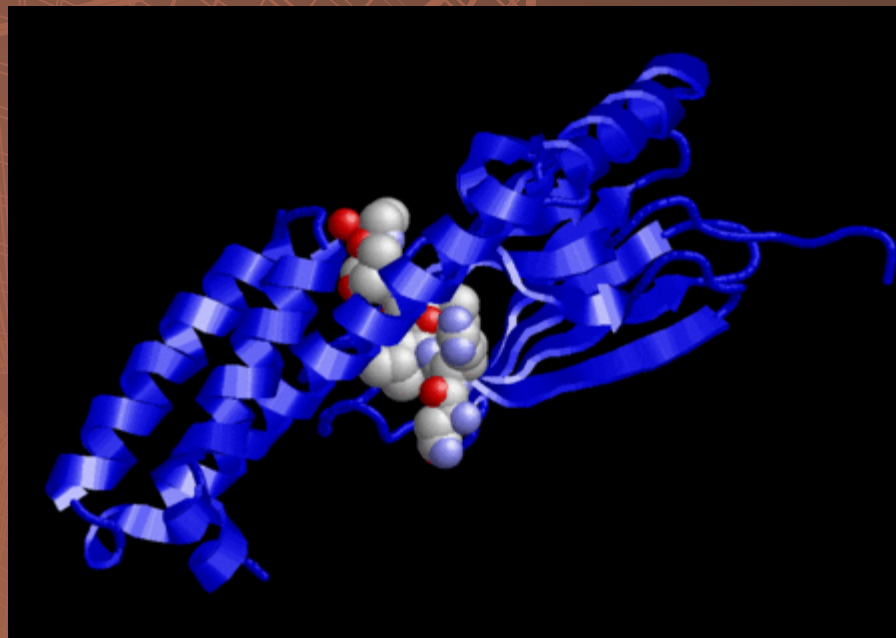
Problémy se vzorkem

- ◆ Komplexnost
- ◆ Malá množství
- ◆ Labilita

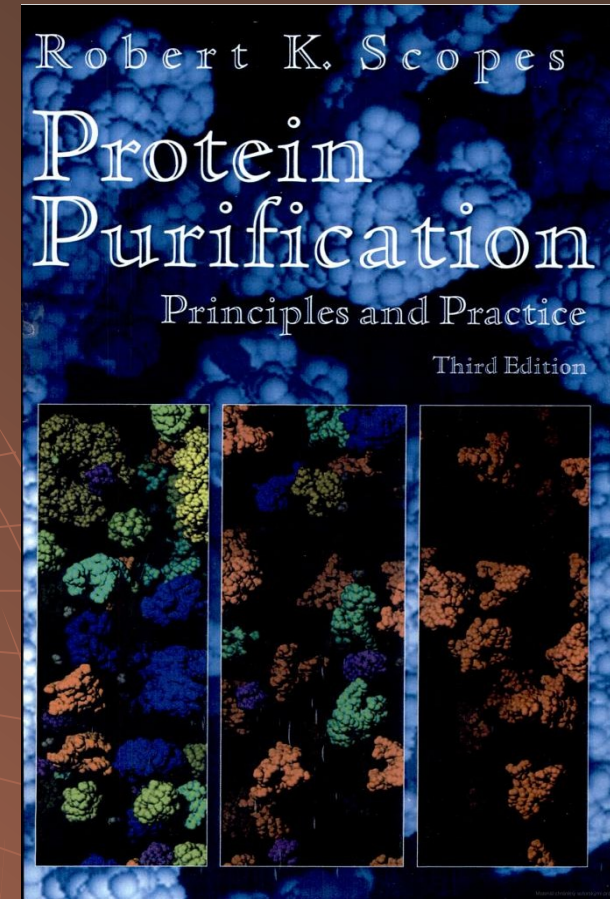
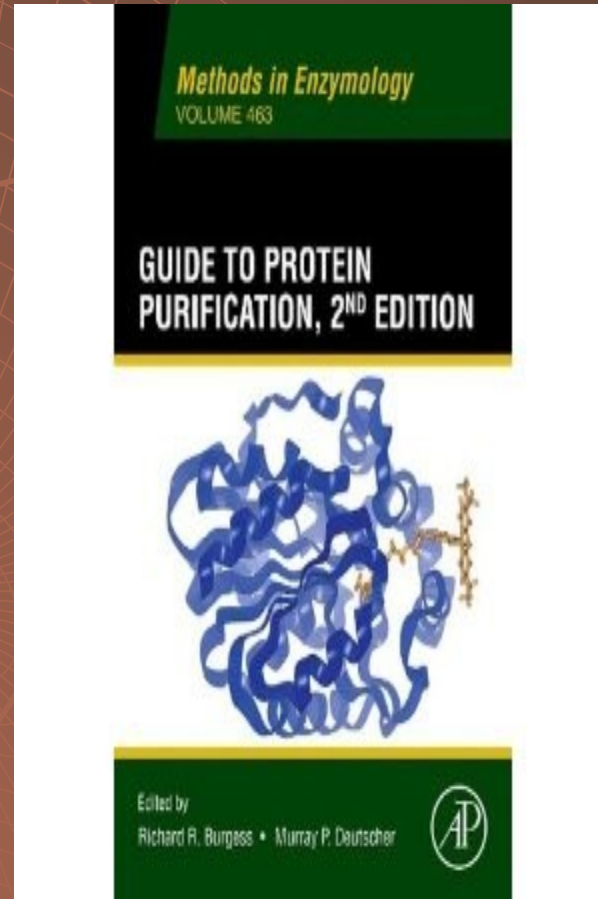
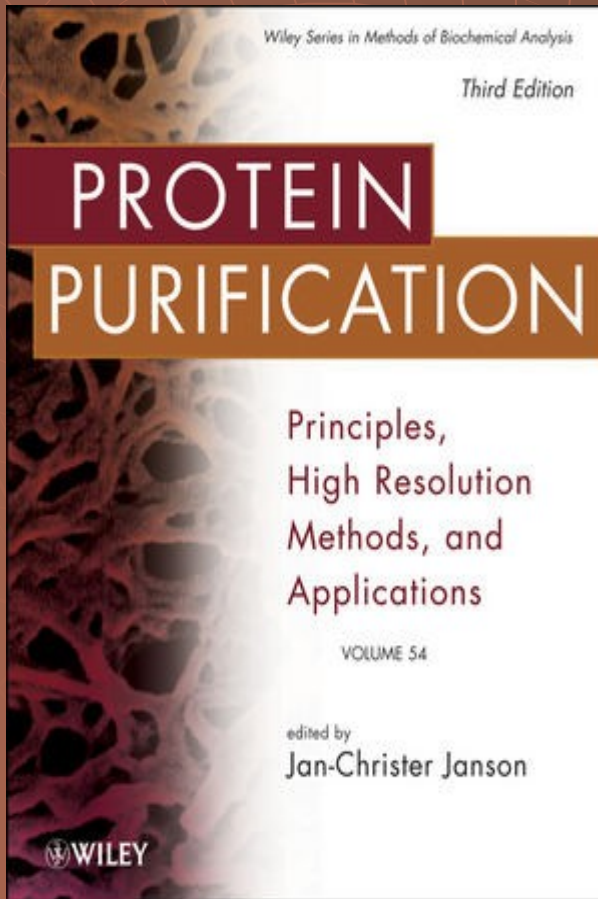
Zásady pro práci s biologickým materiálem

1. Teplota
2. pH + iontová síla
3. Koncentrace
4. Pěnění
5. Lokální přebytky
6. Proteasy, RNAsy, DNAsy

Separace bílkovin



Literatura





Plánování separace

Cíl izolace

- ◆ Získání homogenní bílkoviny
- ◆ Zachování biologické aktivity
- ◆ Čistota

↓

Závěr : získat vzorek o patřičné čistotě s vynaložením patřičného úsilí

Volba vstupního materiálu

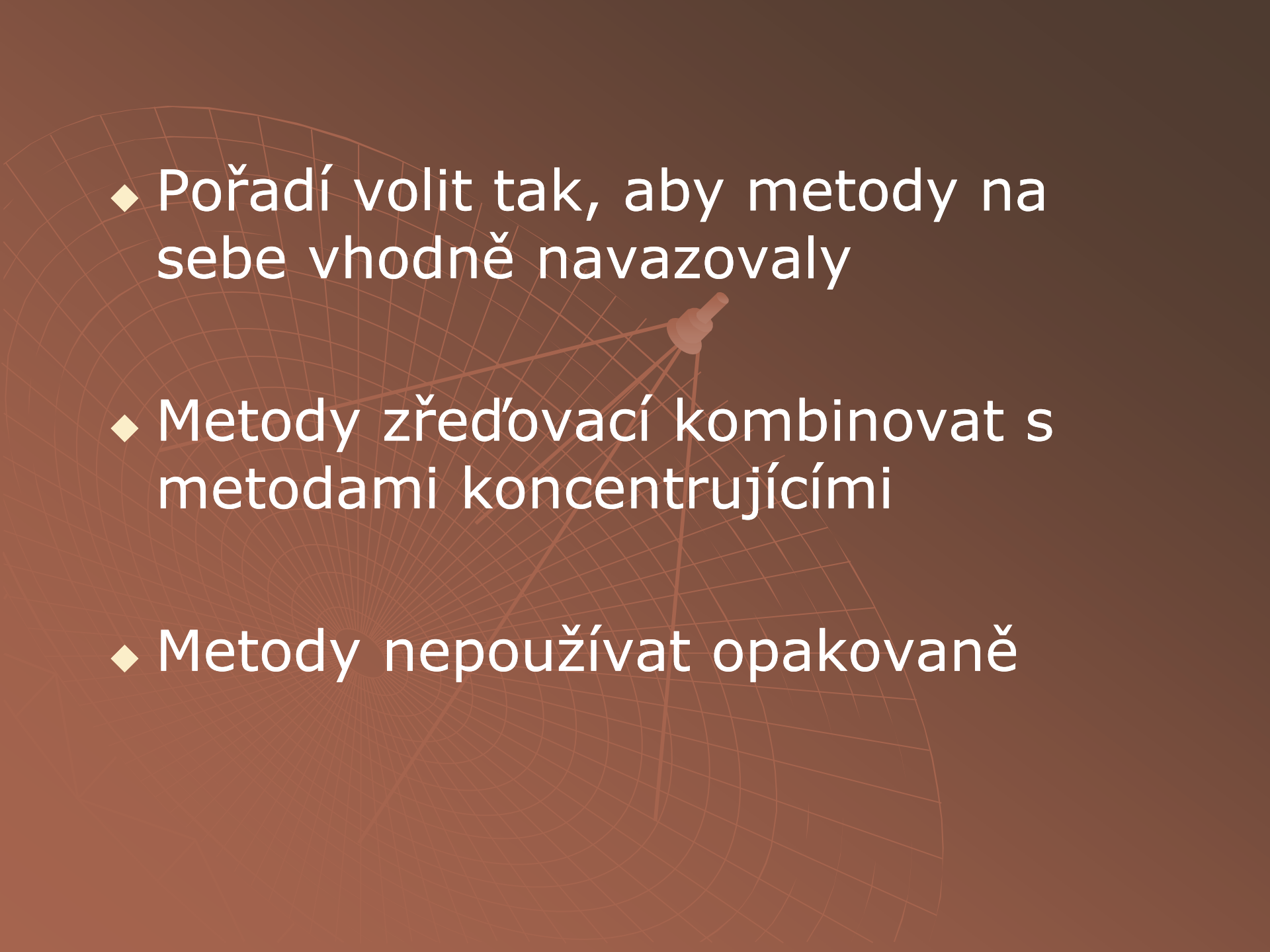
- ◆ Preparát z daného organismu
- ◆ Preparát s největším obsahem dané bílkoviny
- ◆ Preparát s nejmenším obsahem nečistot

Volba a kombinace separačních metod

- ◆ Selektivita
- ◆ Rozlišovací schopnost
- ◆ Kapacita
- ◆ Zpětný výtěžek
- ◆ Náklady – materiál, přístroje, člověk
- ◆ Stupeň zředování a koncentrace
- ◆ Slučitelnost mezi metodami
- ◆ Znalosti o dané bílkovině (pI, MW)

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 ■ vzorku již investovaná práce

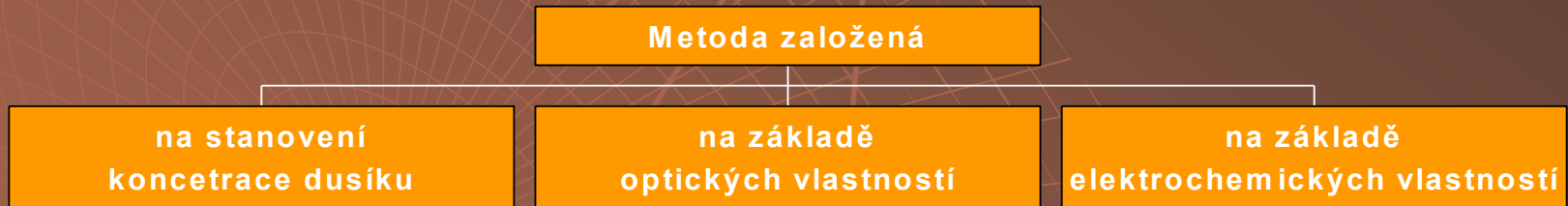
- 
- ◆ Pořadí volit tak, aby metody na sebe vhodně navazovaly
 - ◆ Metody zřetřovací kombinovat s metodami koncentrujícími
 - ◆ Metody nepoužívat opakovaně

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

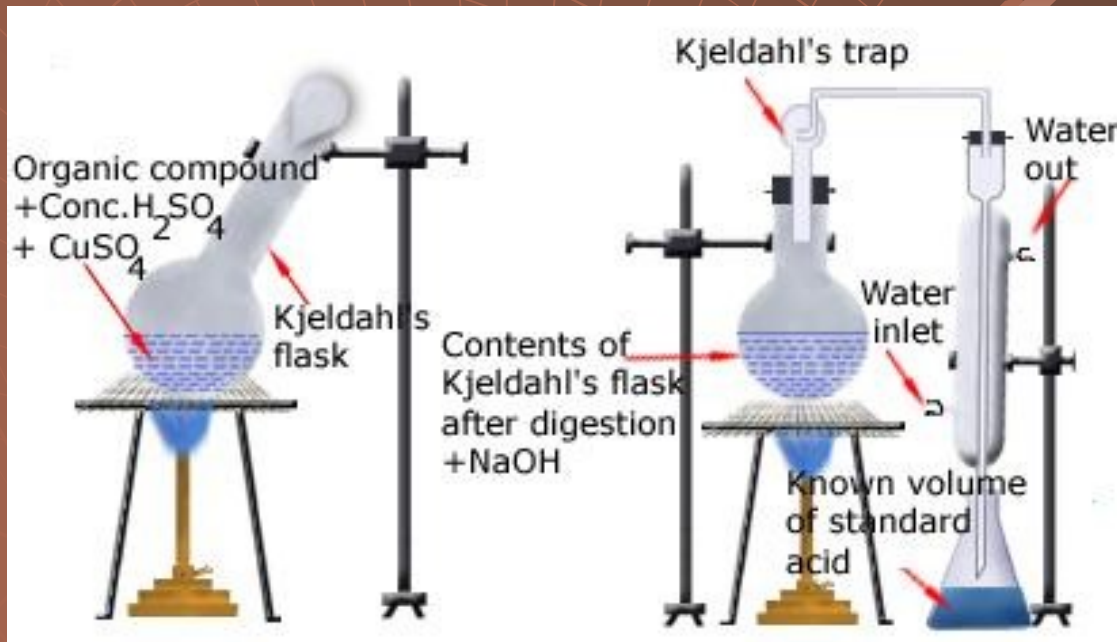


Kjeldahlova metoda – stanovení



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

Kjeldahlova metoda – stanovení N_2

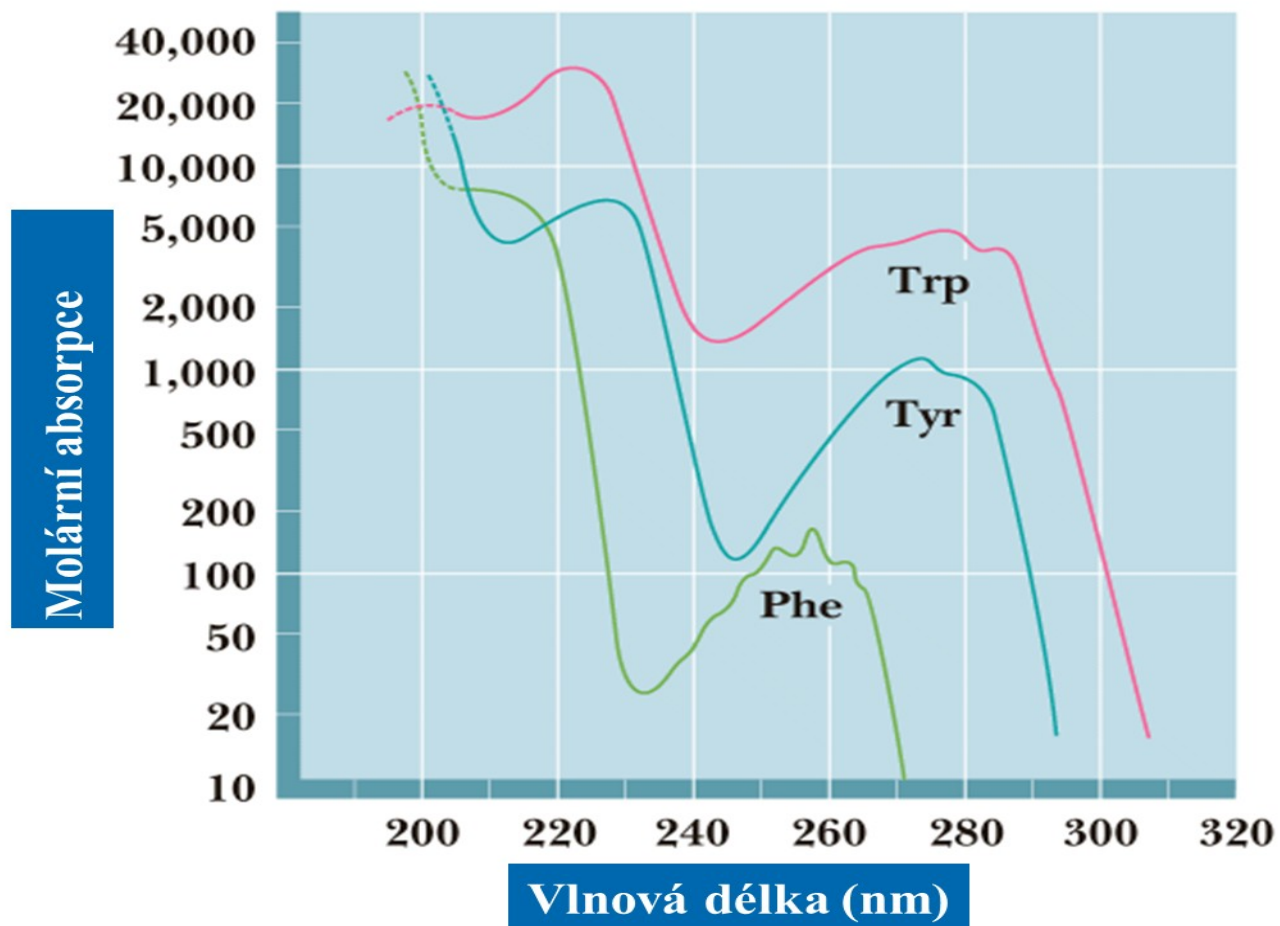


UV spektrofotometrie

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

Výhody - nedestruktivní metoda
- není třeba kalibrace

UV spektrofotometrie



UV spektrofotometrie

Vzorce pro přímé UV stanovení:

$$c \text{ (mg/mL)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

$$c \text{ (mg/mL)} = (A_{235} - A_{280})/2.51$$

$$c \text{ (mg/mL)} = (A_{224} - A_{233})/5.01$$

$$c \text{ (mg/mL)} = A_{205} [27 + 120 (A_{280}/A_{205})]$$

UV spektrofotometrie

Edelchova metoda

při znalosti aminokyselinového složení je možné spočítat extinkční koeficient proteinu e_{280} . Podmínkou je přítomnost tryptofanu nebo tyrosinu v molekule.

$$e_{280} = n\text{Trp}.5500 + n\text{Tyr}.1490 + n\text{Cys}.125 \text{ (M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)}$$

VIS spektrofotometrie

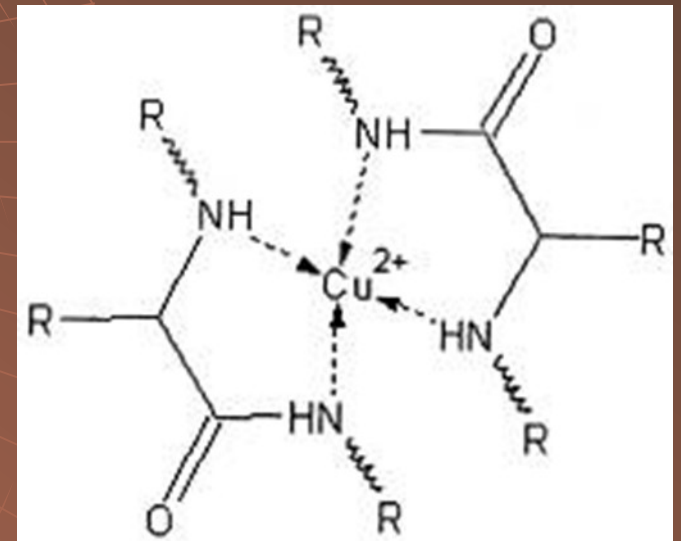
- ◆ Přídavek činidla  arevný derivát
- ◆ Destruktivní metoda
- ◆ Nutná kalibrační závislost

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 (Folin Ciocalteovo reagens) na molybdenovou modř

Měření : 725 nm

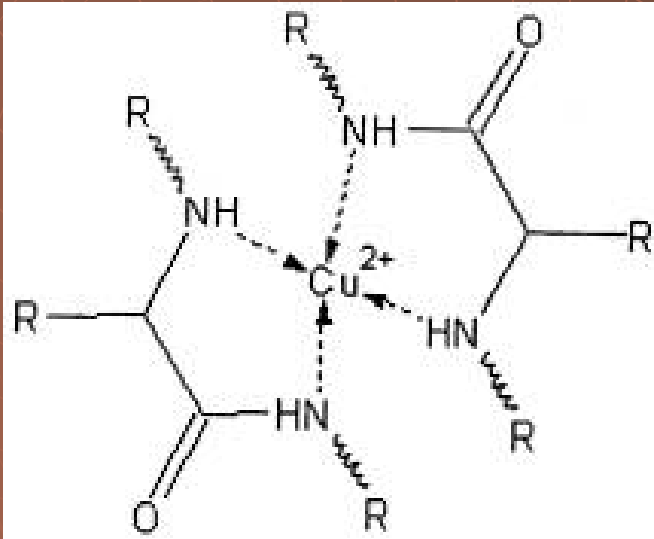


Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a
Biuretové metody

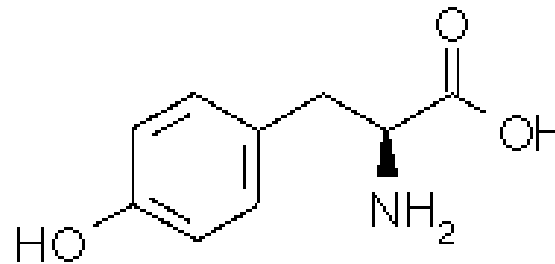
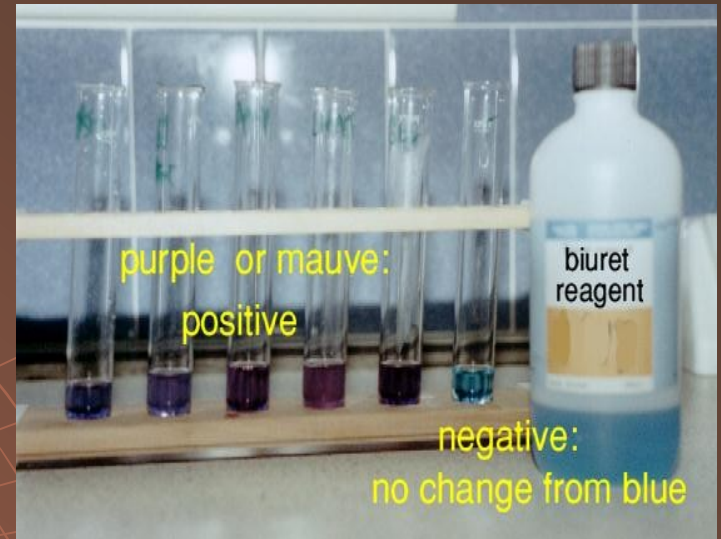
Měření : 600 nm

Lowryho metoda



•biuret ↑

•Lowry ↓

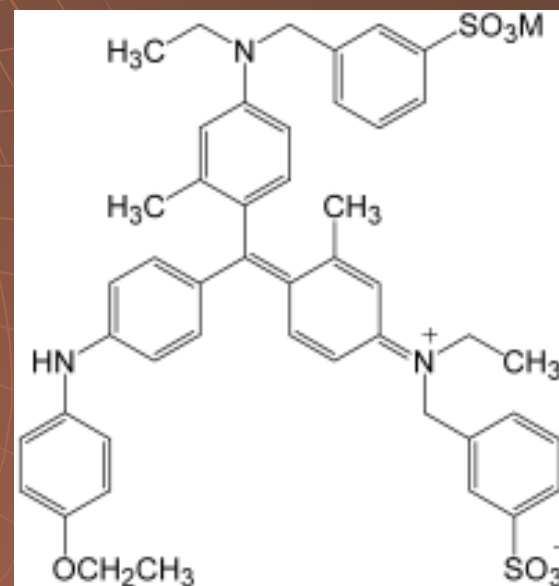


tyr y Tyrosin

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

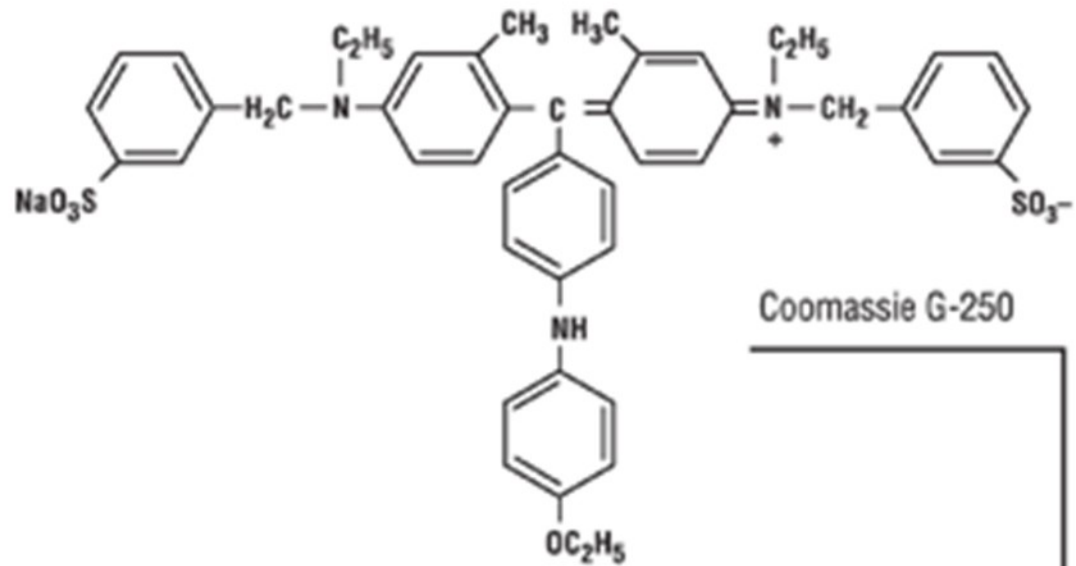


Metoda dle Bradfordové

PROTEIN

Basic and Aromatic
Side Chains

+



Coomassie G-250

465 nm

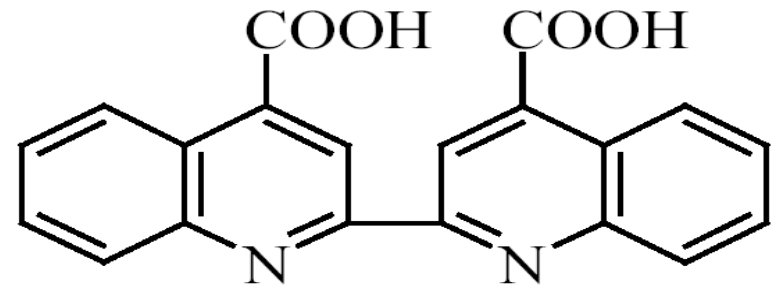


$A_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$

Protein-Dye Complex

BCA metoda

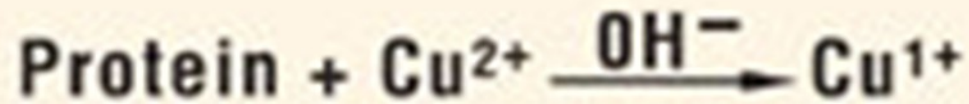
Princip : Na^+ sůl k. bicinchoninové (BCA), komplexuje Cu^+ tvořené reakcí peptidové vazby s Cu^{2+}



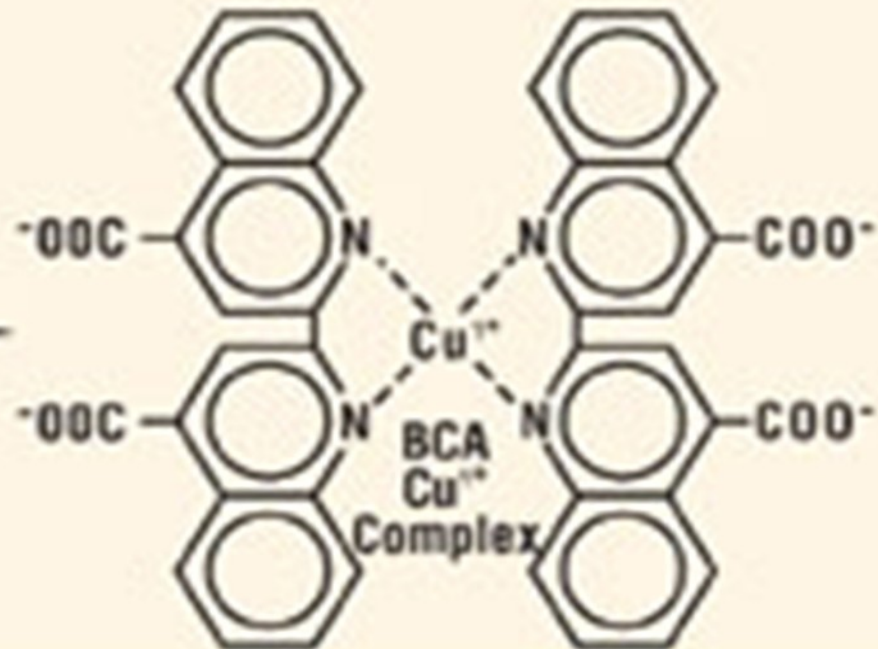
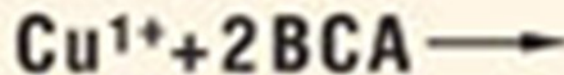
Měření : 562 nm

BCA metoda

STEP 1.



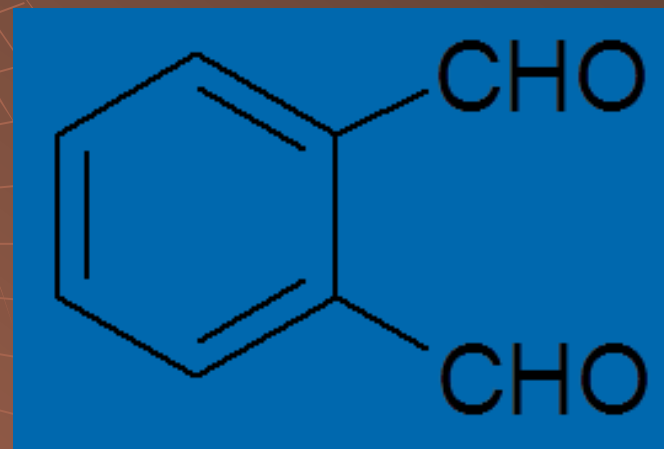
STEP 2.



Fluorescence

Princip : - vazba fluoroforu na
bílkovinu ■ měření vzniklé
fluorescence (OPA)

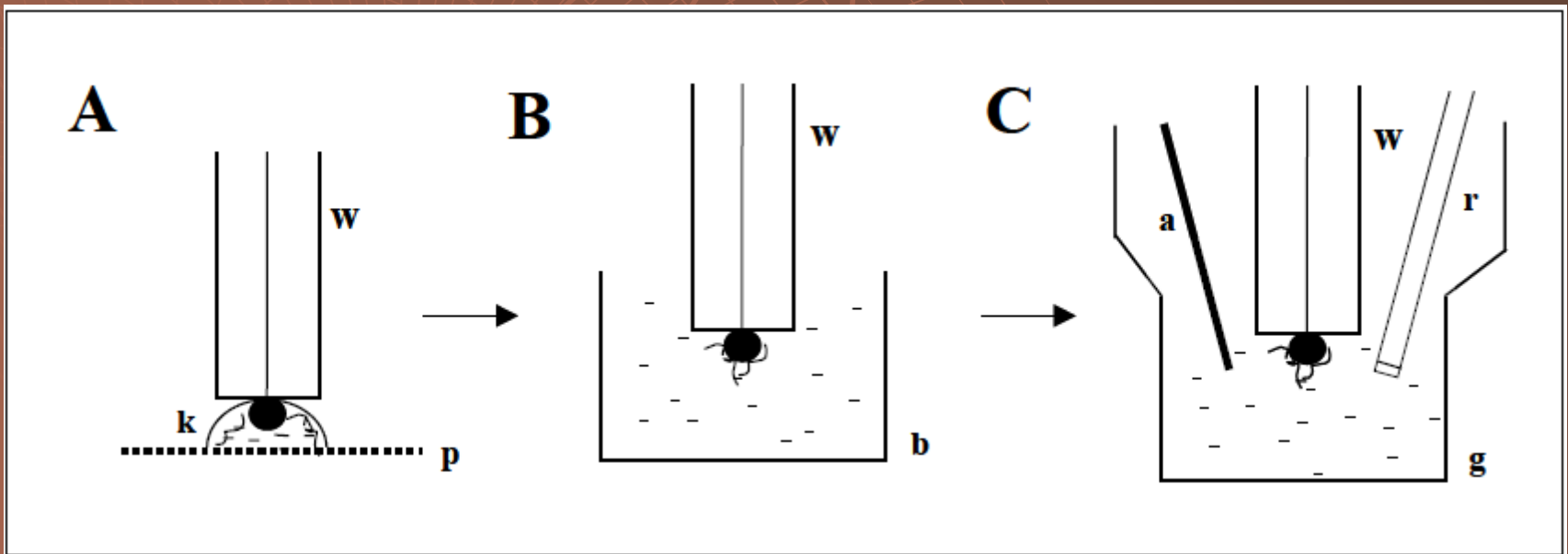
Měření : exc.340 nm
em.440 nm



- zhášení fluorescence přidavkem
bílkoviny

Polarografie

Princip : Brdičkova reakce – SH skupiny bílkoviny vstupují v přítomnosti Co^{2+} katalytické reakce na Hg elektrodě ████ roud



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

Nejčastěji používané metody

Stanovení	Citlivost	Přesnost	Interference
Biuret	0 – 1 mg	Vysoká, nezávislá na aminokyselino- vém složení	Aminoskupiny [Např. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]
Lowry	0 – 0.1 mg	Částečně závislá na aminokyselino- vém složení	Kyseliny, chelátory (EDTA), reduktanty (DTT, phenol), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Bradford	0 – 0.01 mg	Závislá na aminokyselino- vém složení	Detergenty (SDS, Triton X100, mýdlo)
BCA	0 – 0.05 mg	Většinou nezávislá na aminokyselino- vém složení	Redukující látky (2-merkapt ethanol, DTT), chelátory (EDTA)

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
 - psychofilní organismy



Mikroorganismy

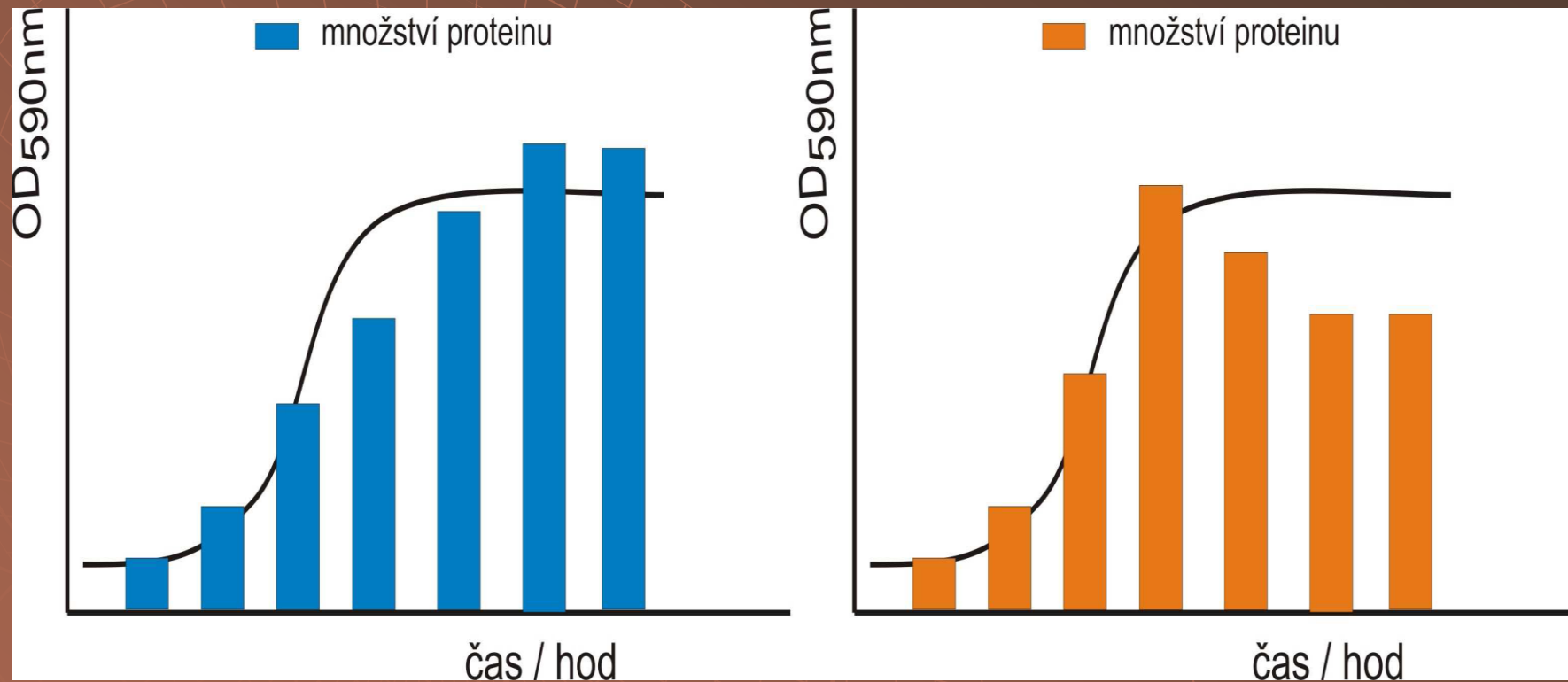


- CCM uchovává více než 3 000 kmenů bakterií (asi 1 400 druhů) a 800 kmenů vláknitých hub (přibližně 550 druhů), které nabízí ve svém Katalogu kultur.
- Specializovaná sbírka vodních hyfomycetů obsahuje asi 500 kmenů (60 rodů se 130 druhy).

Selekce optimálních producentů

- ◆ maximální produkce enzymu
- ◆ optimální vlastnosti enzymu
- ◆ snadné získání producenta
- ◆ snadnost purifikačního postupu

Mikroorganismy



Bezobratlí

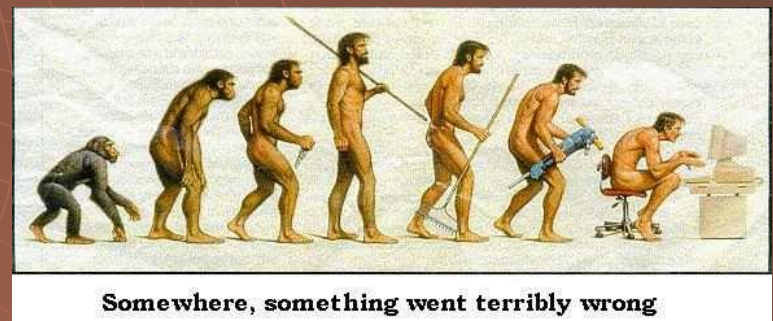
Hmyz, plži, mlži

Nevýhody - málo se používá, nesnadno se získává



Živočišné tkáně

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



Rostlinné tkáně

Špenát, řepa, hrách, tabák, *Arabidopsis thaliana*

Nevýhoda – problematický růst za
definovaných podmínek



Manipulace s biologickým materiálem

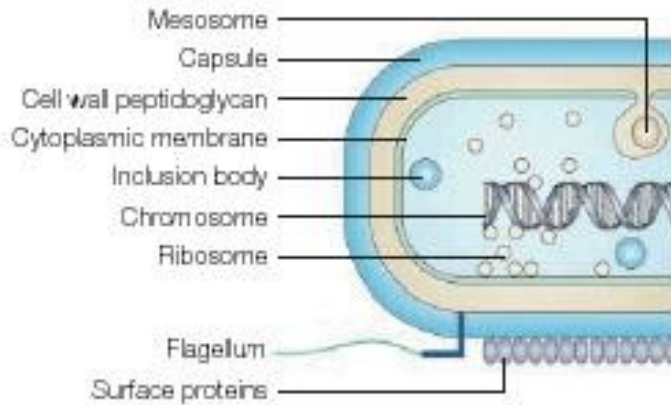
- ◆ Pokud možno zpracovat co nejdříve
- ◆ Zmražení – při $-60 - 80$ °C
- ◆ Rozmrazování – co nejrychleji



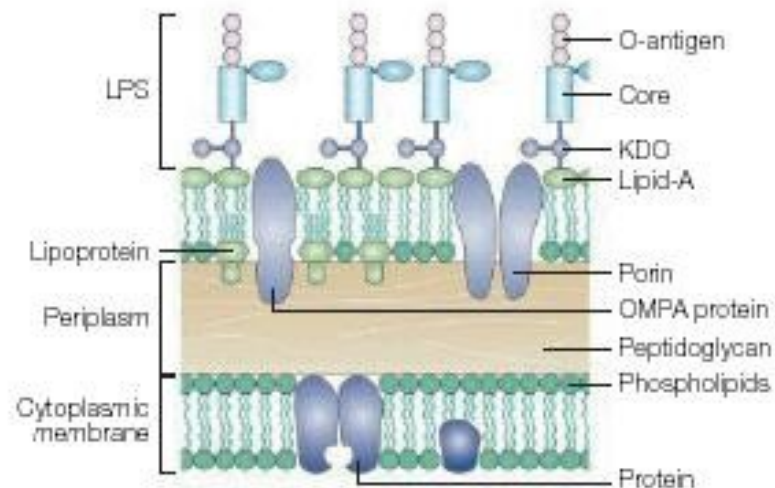
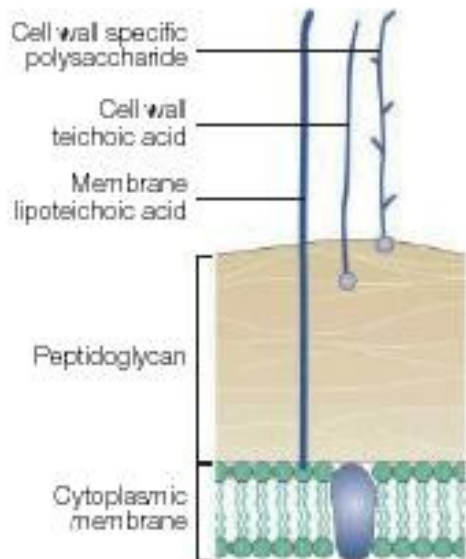
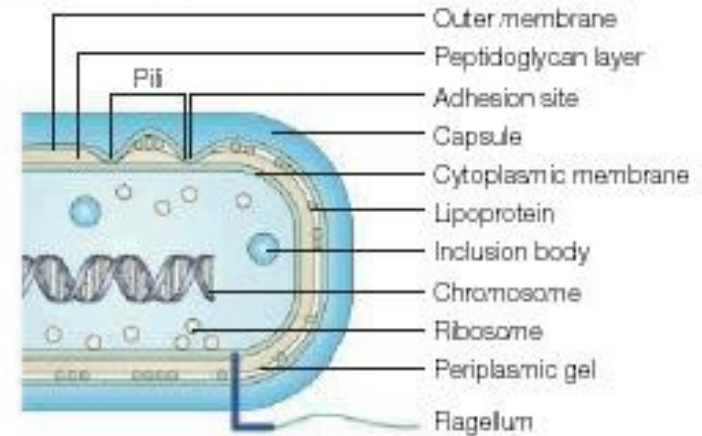
Rozbití a extrakce

Bakterie

a Gram positive



b Gram negative

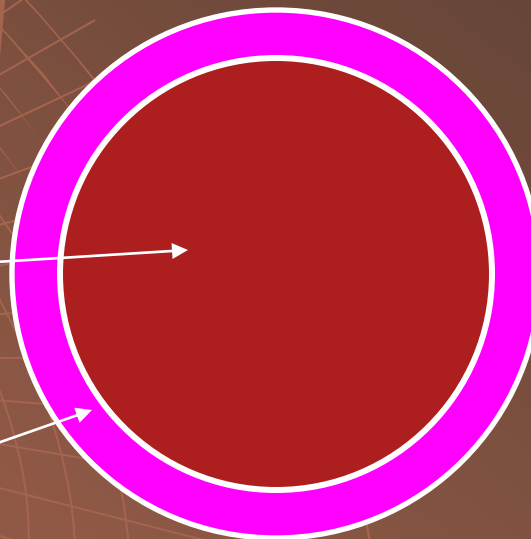


Bakterie

- ◆ Záleží na lokalizaci
 - Extracelulární
 - Intracelulární
 - ◆ Cytoplasma
 - ◆ Periplazma

cytoplasma

periplasma



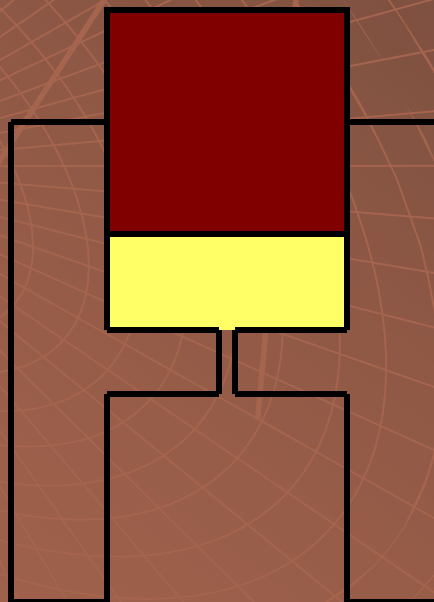
Balotina

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



French (X) press

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



French (X) press

Pressure Cells

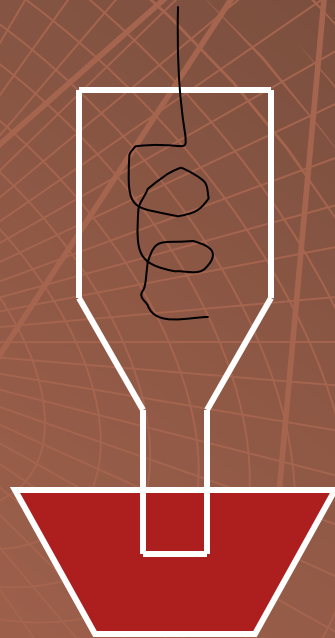


Mechanical Press



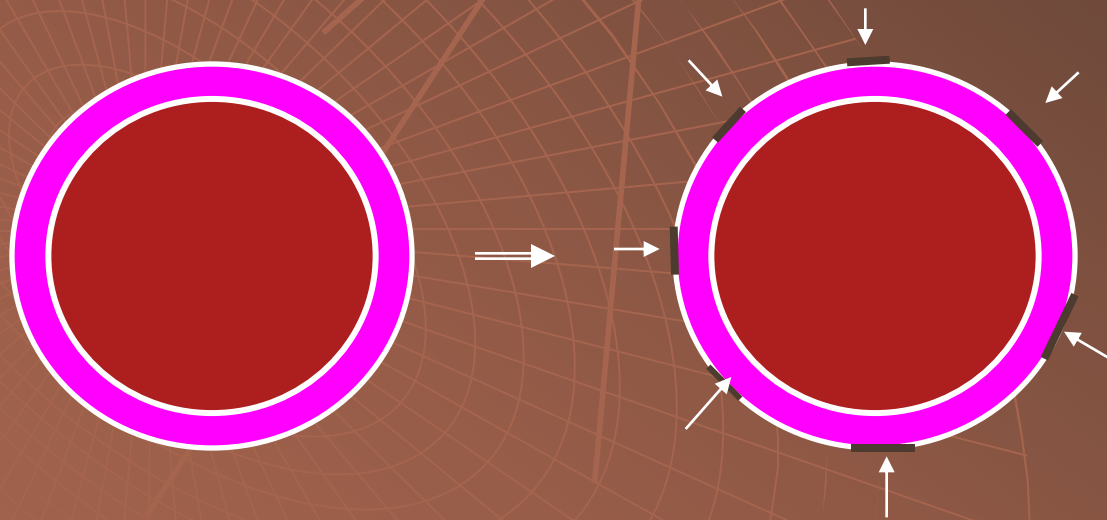
Ultrazvuk

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

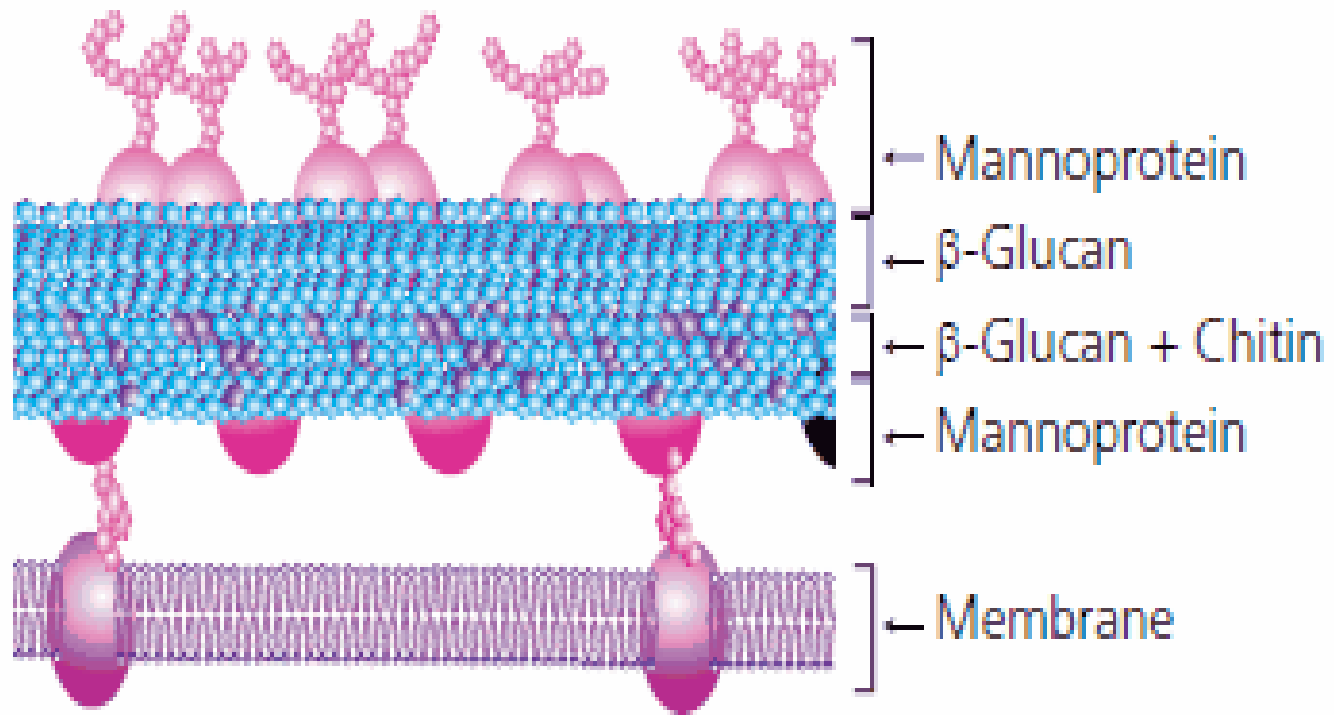


Další

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

Kvasinky

Yeast Cell Wall



Kvasinky

Toluenová autolýza

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

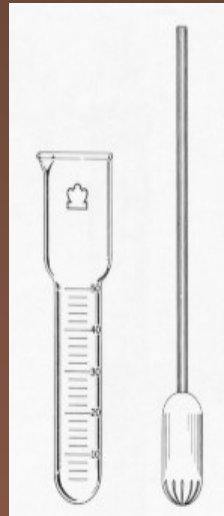
Balotina, French press,

Živočišné tkáně

- ◆ Třecí miska s pískem

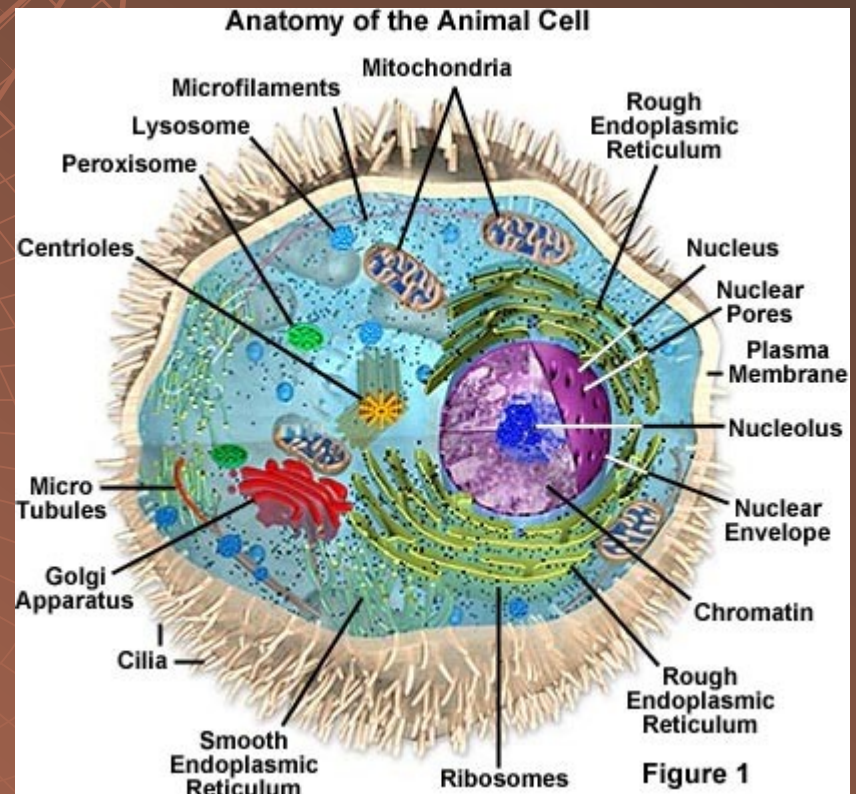


- ◆ Ruční homogenizatory – Potter – Elvehjemův



Živočišné tkáně

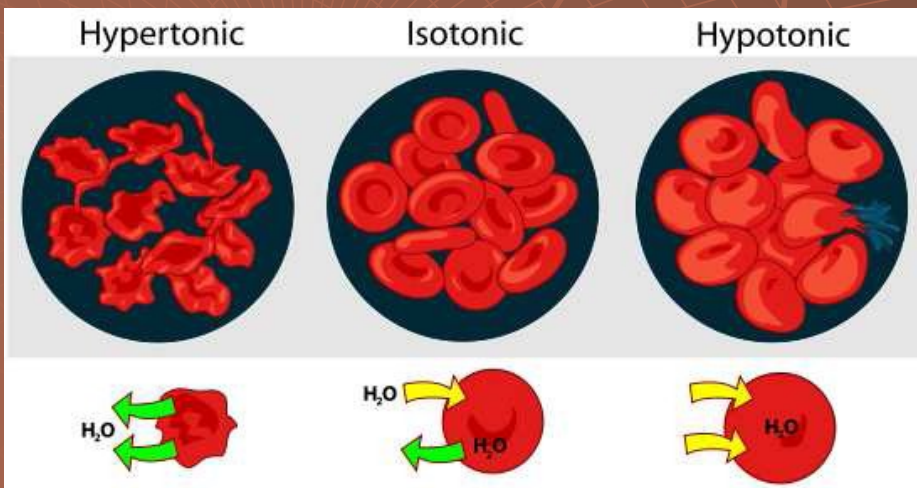
- ◆ Bez buněčné stěny
- ◆ Velmi křehké
- ◆ Tkáňové kultury



Živočišné tkáně

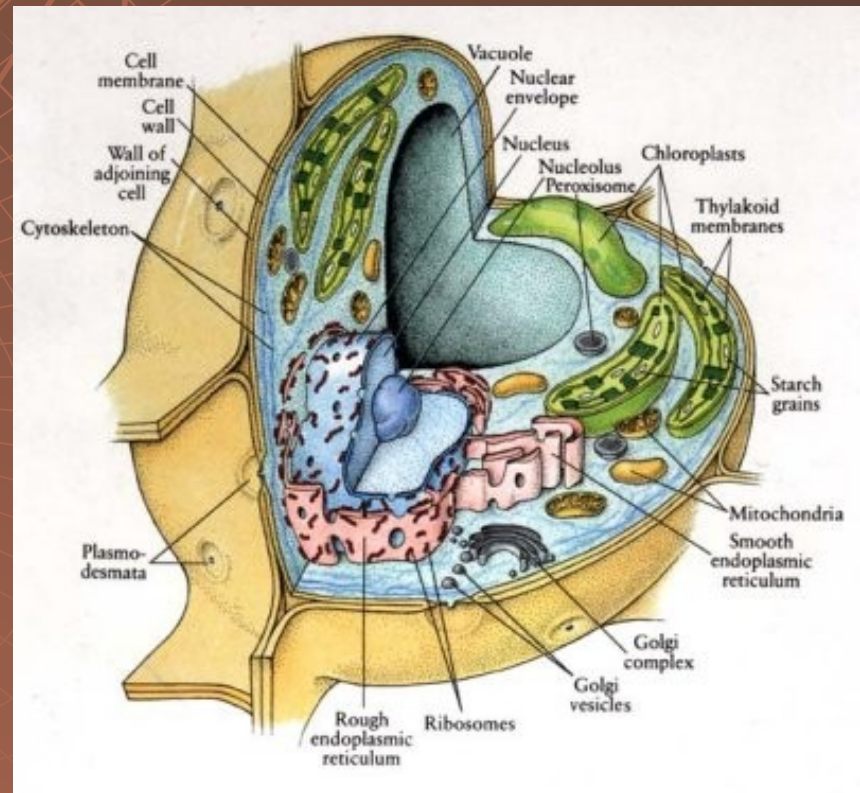
- ◆ Mixery

- ◆ Osmotická lyse - erythrocyty



Rostlinné tkáně

- ◆ Silná buněčná stěna - celuloza
- ◆ Tkáňové kultury křehké



Rostlinné tkáně

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

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, ■
merkaptoethanol, kovové ionty,
inhibitory proteas

Inhibitory proteas

Protease Inhibitor	General inhibitors for			
	Serine proteases ^a	Cysteine proteases ^b	Metallo-proteases ^c	Aspartic proteases ^d
Aprotinin		E-64	Phosphoramidon	Pepstatin
Pefabloc SC and Pefabloc SC PLUS			Bestatin (aminopeptidases)	
Leupeptin (<i>inhibits serine and cysteine proteases with trypsin-like specificity</i>)				
PMSF				
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets*				
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*				
α_2 -Macroglobulin				

Inhibitors included in the set	Specificity of inhibition	Quantity Supplied
Antipain-dihydrochloride	Papain, Trypsin, Cathepsin A and B	3 mg
Aprotinin	Trypsin, Plasmin, Chymotrypsin, Kallikrein	0.5 mg
Bestatin	Aminopeptidases	0.5 mg
Chymostatin	α -, β -, γ -, δ -Chymotrypsin	1 mg
E-64	Cysteine Proteases	3 mg
EDTA-Na₂	Metalloproteases	10 mg
Leupeptin	Serine and Cysteine Proteases such as Plasmin, Trypsin, Papain, Cathepsin B	0.5 mg
Pefabloc SC	Serine Proteases	20 mg
Pepstatin	Aspartic Proteases	0.5 mg
Phosphoramidon	Metalloproteinases, specifically Thermolysin	3 mg

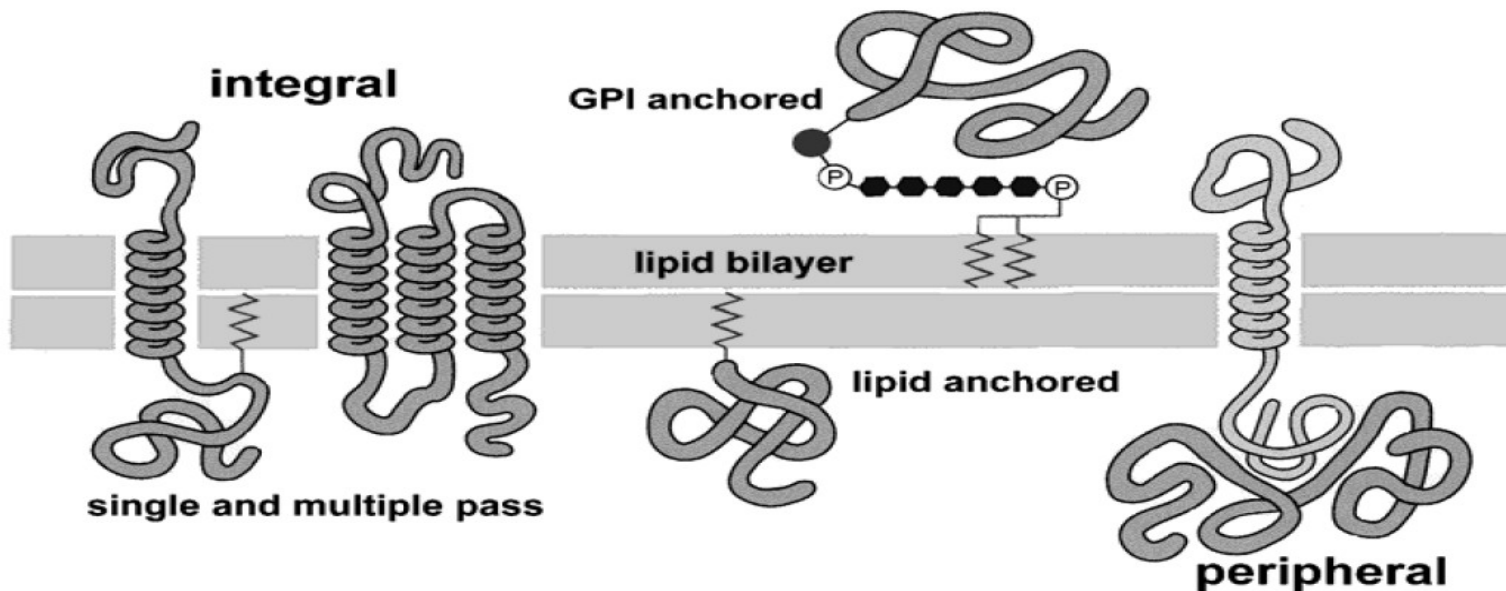
Separace subcelulárních organel

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

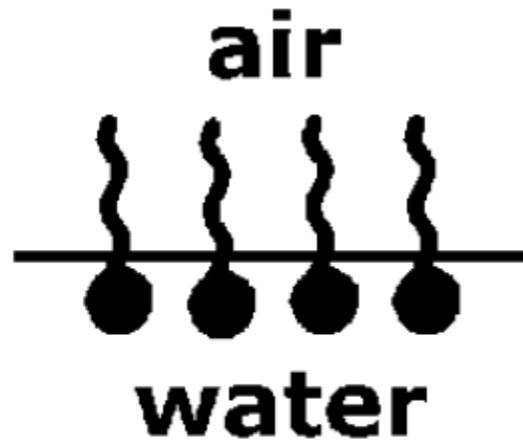
Membránově vázané bílkoviny









Izolace membránových bílkovin

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

Detergency

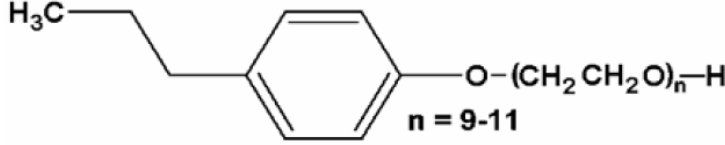
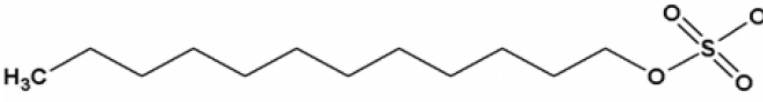
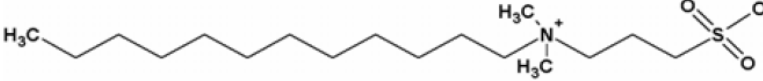
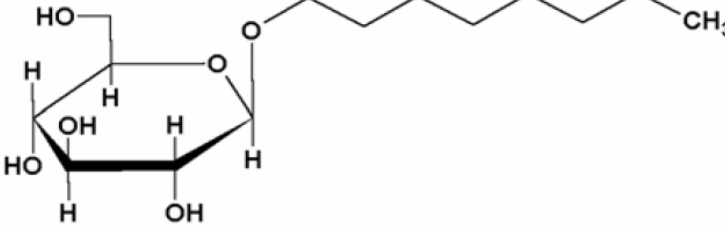
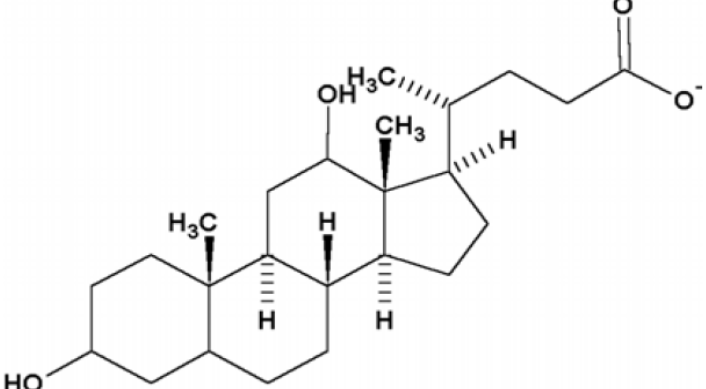


Detergenty

Detergent	CMC mM	MMW Da	koncentrace	odstranění	aplikace
ANIOGENNÍ					
SDS(dodecylsulfát sodný)	8,3	288,4	> 10 mg/mg prot.		denaturace proteinů, použití pro DNA, PAGE
DOC(deoxycholát sodný)	1-4	416,6	0,1-10 mg membr. lipidů		solubilizace membránových proteinů
N-lauroylsarkosin	7	488	0,1 -1,5 %		solubilizace membr. prot., příprava antigenů
KATIOGENNÍ					
CTAB (hexadecyltrimethyl amonium bromide)	4-5	337	0,1 – 1 %	???	rozpuštění membrány, tvoří komplex s DNA, odstranění polysacharidů
NEIONOGENNÍ					
Triton X-100 [octylphenolpoly(ethylen glyco lether) _n]	0,2	647 n=10	1 – 5 mM		solubilizace proteinů
Tween 20 [poly(oxyethylene) _n sorbitan- monolaurate]	0,06		> 10 mg/mg membr. lipid;		imunoblotty, ELISA
AMFOTERNÍ					
CHAPS (3-[(3- cholamidopropyl)dimethylam onio]-1-propanesulfonate)	4	614,9	6,5-13 mM		solubilizace membránových proteinů

Detergency

Examples of Detergents and Their Properties

Name	Structure	CMC	N (MW)
Nonidet [®] (N) P-40		0.3 mM	100-155 (647)
sodium dodecyl sulfate (SDS)		8.3 mM	62 (288)
sulfobetaine (SB12)		3.6 mM	55 (336)
n-octylglucoside		14.5 mM	20-25 (292)
deoxycholate		20 mM	3-12 (417)