

metody v genomice a proteomice

proteomika

separace proteinů a peptidů



jan havliš

: masarykova univerzita

:: středoevropský technologický institut

::: mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin

:: přírodovědecká fakulta, národní centrum pro výzkum biomolekul

::: oddělení funkční genomiky a proteomiky



lekce 1 02-04-13

Příprava proteinových izolátů a frakcionace/separace proteinů a peptidů – základní metody izolace proteinů z různých typů vzorků; elektroforetické separační techniky (IEF, SDS-PAGE, 2-D gelová elektroforéza, DIGE, aj.); kapalinově chromatografické techniky; separační postupy pro analýzu fosfoproteinů a glykosylovaných proteinů, vícerozměrné postupy pro analýzu komplexních proteinových vzorků

lekce 2 a 3 09-04-13 a 16-04-13

Hmotnostní spektrometrie proteinů – základní typy ionizace (ESI a MALDI) a MS instrumentace (TOF, iontová past, FTMS, hybridní přístroje); metody identifikace proteinů; charakterizace modifikací proteinů; metody kvantifikace (relativní a absolutní kvantifikace)

lekce 4 23-04-13

Analýza proteinových komplexů – izolace (tagy, MS analýza), charakterizace (analýza protein-proteinových interakcí, lokalizace), rekonstituce (funkční studie – architektura komplexů)

lekce 5 30-04-13

Metody makromolekulární strukturní analýzy – krystalografické techniky, NMR, cirkulárně dichroická spektroskopie - výhody a nevýhody; základní postupy proteinové krystalografie - makromolekulární krystalizační techniky, difrakční experiment, fázový problém a metody jeho řešení, mapy elektronové hustoty, strukturní model a jeho zpřesňování

lekce 6 07-05-13

Příprava rekombinantních proteinů – výběr hostitelského organismu pro expresi rekombinantních proteinů; expresní systém *E. coli*; struktura expresního vektoru; výběr hostitelského kmene *E. coli* s ohledem na možné problémy jako toxicita proteinu, využití kodonů, stabilita proteinu; cílená exprese proteinu; inkluzní tělíska a možnosti optimalizace exprese proteinu v rozpustné formě; zásady pro čištění proteinů; základní typy chromatografií; sledování čistoty proteinů; fúzní proteiny; afinitní purifikace; uchovávání čistých proteinů



sylabus

příprava proteinových izolátů frakcionace/separace proteinů a peptidů

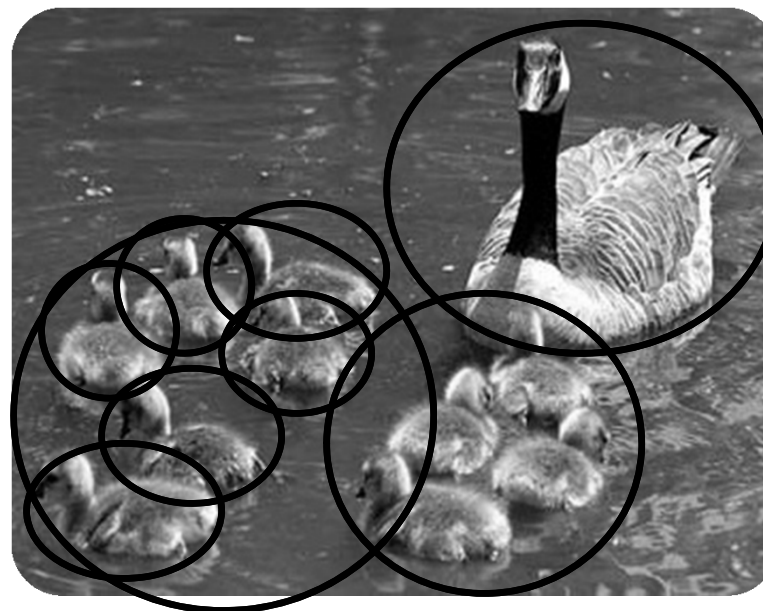
- : **elektroforetické** separační techniky
- : **kapalinově chromatografické** techniky
- : **afinitně chromatografické** techniky
- : **vícerozměrné postupy** pro analýzu **komplexních** proteinových vzorků
- : základní metody **izolace proteinů** z různých typů vzorků

separace proteinů/peptidů

: jaká separace?

:: úroveň

:: technika



separace

oddělení komponent(y) ze směsi látek v prostoru (a čase)

(s e p a r a c e)

původní směs

(s) + (e p a r a c e)

izolace,
purifikace,
preparace

částečná
separace

(s e) + (p a) + (r a) + (c e)

frakcionace

(s) + (e) + (p) + (a) + (r) + (a) + (c) + (e)

úplná separace

hledáme jehlu v kupce sena

: složité směsi

:: vydělení proteinů/peptidů z b. obsahu

:: vydělení žadanych proteinů/peptidů ze směsi

preparativní separace

: získání části z celku

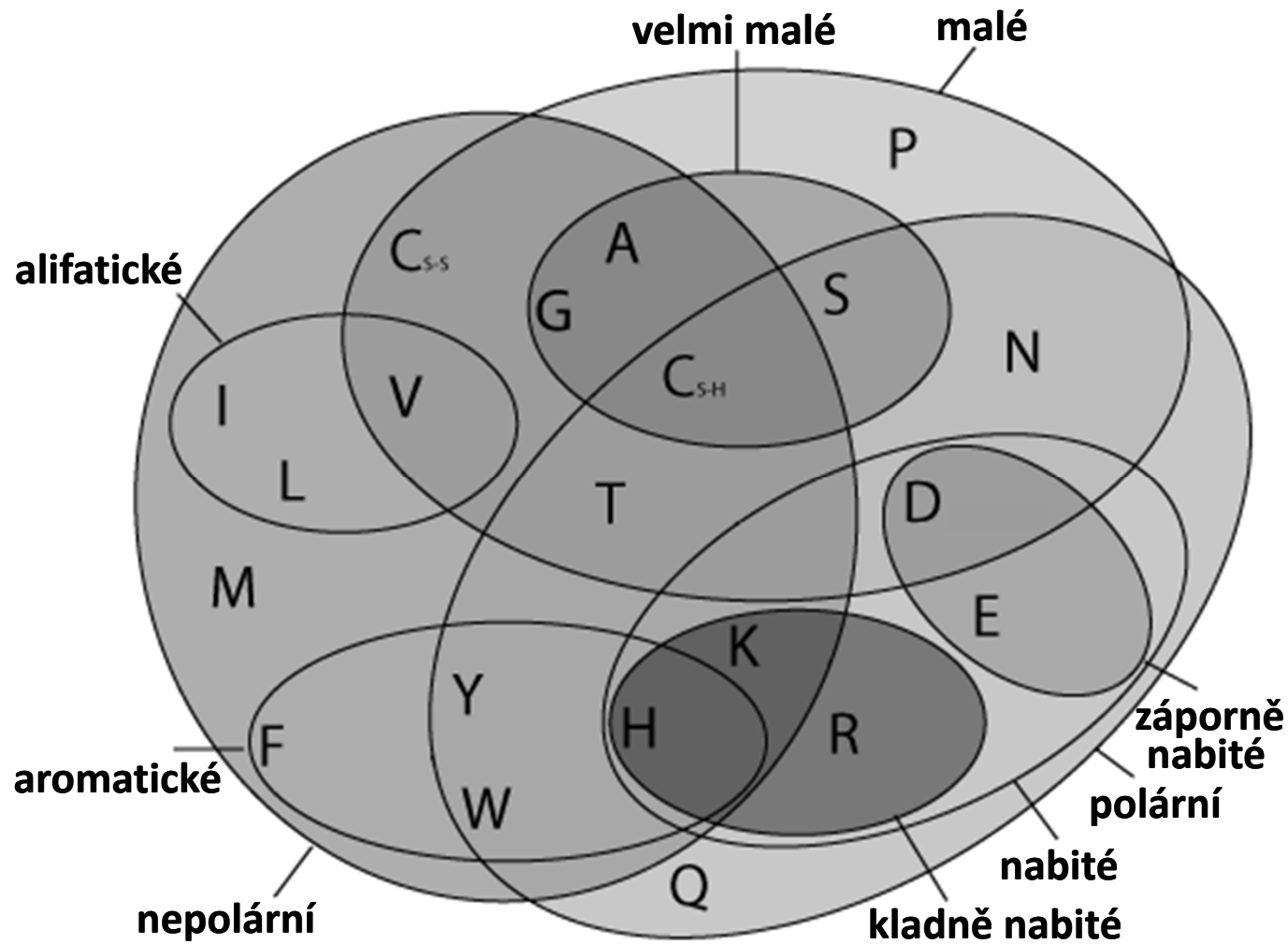


analytická separace

: separace na individua za účelem další instrumentální analýzy

:: hmotnostní spektrometrie *atp.*

separační vlastnosti aminokyselin/peptidů



multifunkční struktura aminokyselin/peptidů

: náboj

:: kladný – N-konec; boční řetězce (primární amin, guanidin, imidazol)

:: záporný – C-konec; boční řetězce (karboxyl, hydroxyl)

: stabilní dipóly

:: polární boční řetězce (Trp, Tyr, Thr...)

: indukované dipóly

:: alifatické boční řetězce (Ile, Leu, Val...)

: reaktivní skupiny

:: Cys, Met, Lys, Asp, Glu...

faktory ovlivňující separaci

: pH

: polarita prostředí

: iontová síla

chromatografické metody

elektromigrační metody

membránové separace

kapacita separace

(*peak capacity*)

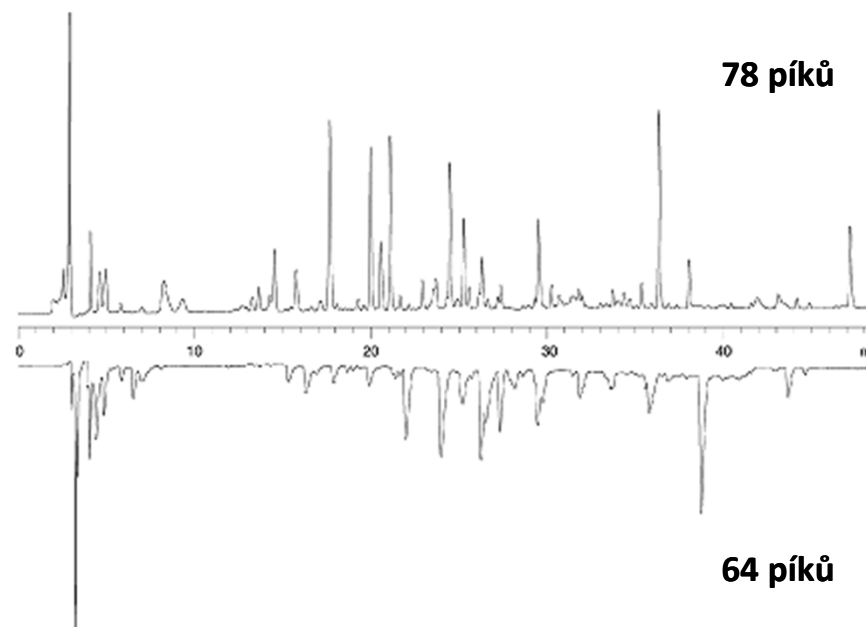
schopnost separovat

: počet dobře rozlišených ($R \geq 1.5$) píků (n) po dobu separace (t_{R0} až t_{Rmax})

$$n = \frac{t_{Rmax}}{\sum_{i=1}^j w_i / j}$$

w – šířka píku při základně

j – počet píku v separaci (za čas t_{Rmax})



maximalizace kapacity separace

: delší čas separace (v jednom rozměru)

: spojováním více rozměrů či technik (*hyphenation*)

elektroforetické separační techniky

základní principy

elektroforetická metoda – separace dle náboje, tvaru *atp.* v elmag poli

$$\mu = \frac{Q}{6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v}$$

elektroforetická pohyblivost μ

η viskozita, r poloměr, Q náboj a v rychlost iontu

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{Q \cdot A}{\sqrt{M}} - B$$

Joklova rovnice

A , B konstanty, M molekulová hmotnost

Q náboj

$$\mu_{\text{eff}} = \sum_{i=1}^n \mu_i \cdot x_i$$

efektivní pohyblivost μ_{eff}
x molární zlomek látky

$$\log \mu = \log \mu_0 - K \cdot [M]$$

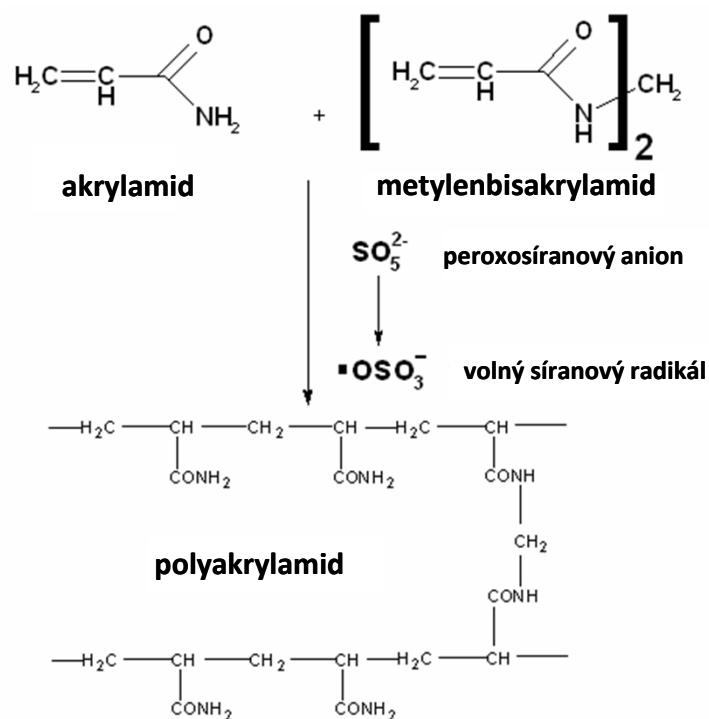
vztah mezi velikostí póru a pohyblivostí

K konstanta obsahující vlastnosti nosiče

μ_0 pohyblivost bez nosiče, μ pohyblivost v nosiči

gelová elektroforéza (GE, gel electrophoresis)

: separace v gelu a elektrickém poli



polyakrylamidový gel

hustota gelu

(procento zesíťování;
poměr *akrylamidu* a *bis-akrylamidu*)

↓ % zesíťování

⇒ snadnější pohyb velmi hmotných molekul

12% – běžné pro 15 kDa – 60 kDa

8% – molekuly 30 kDa – 120 kDa

25% – < 15 kDa;

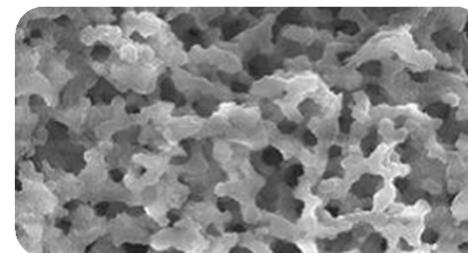
speciální protokol podle Schäggera-von Jagowa

peroxosíran amonný

: iniciátor

tetrametyletylendiamin (TEMED)

: katalyzátor



viskozita $\sim 100 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$

průměr kavity (12%) $\sim 4.4 \text{ nm}$

: vzorek se před analýzou denaturuje

(+ EtSH, 95 °C, 5 min)

:: rozbití disulfidických můstků

:: sbalení do konformace náhodného klubka (*random coil*)

: vodící barva

:: bromfenolová modř

nedenaturující (nativní) PAGE

(nativní)

: separace dle pI, tvaru i M_w

separace kyselých a bazických proteinů zvlášť

: vodící barva

:: bromfenolová modř pro kyselé

:: metylenová modř pro zásadité

separace kyselých a bazických proteinů dohromady

: udělení jednotkového náboje bez denaturace

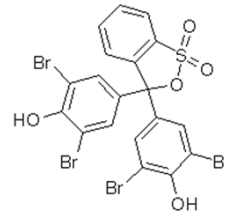
modrá nativní PAGE (*blue native*; BN-PAGE) – CBB R-250 (~ 1 g na 1 g proteinu)

bezbarvá nativní PAGE (*clean native*; CN-PAGE) – n-dodecyl- β -maltosid a digitonin

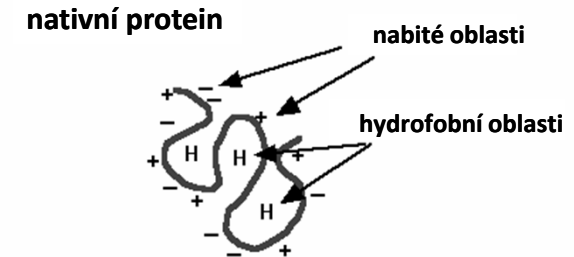
denaturující PAGE

(SDS, *Lämmliho*)

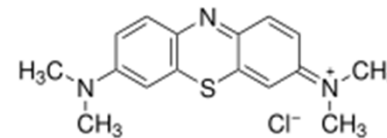
: separace dle M_w



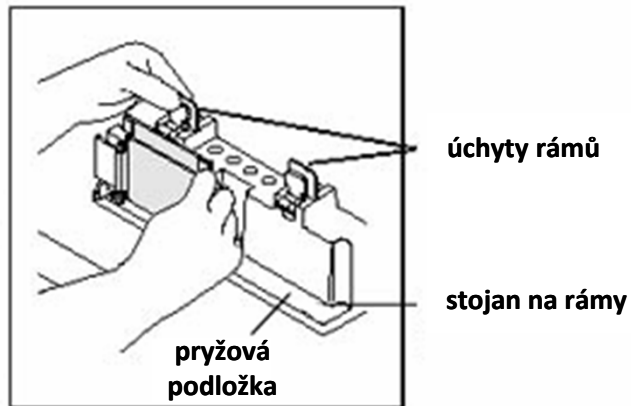
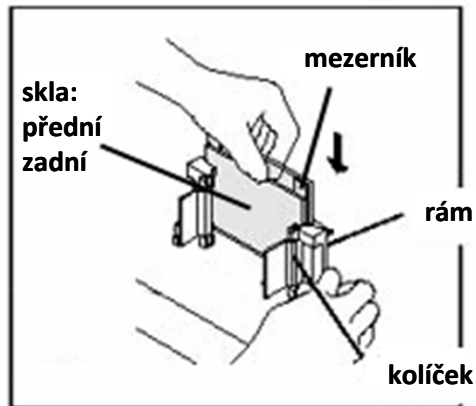
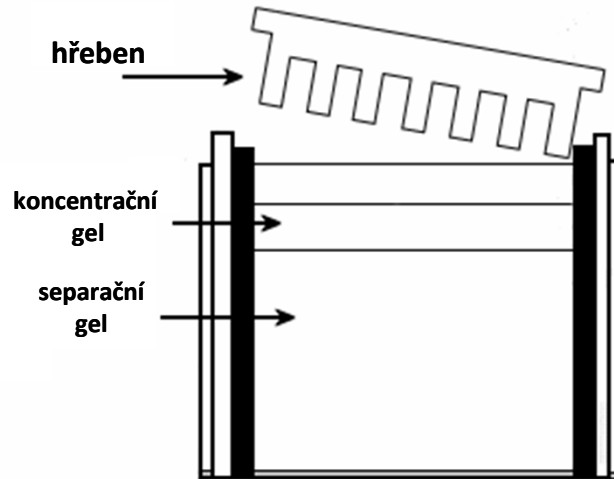
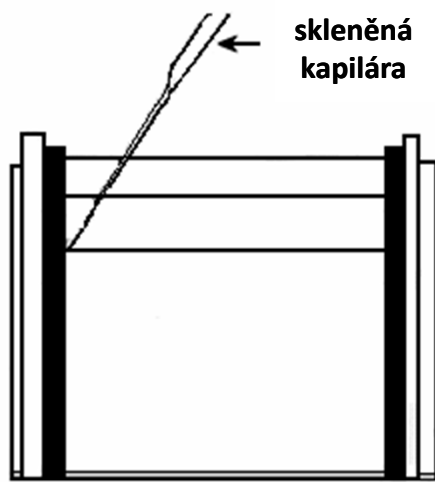
nativní protein



po denaturaci SDS

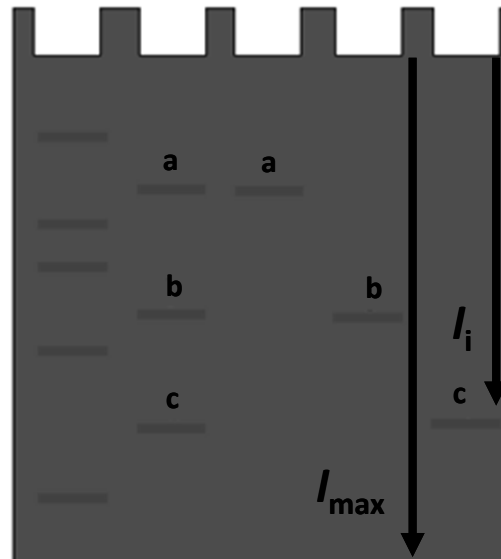
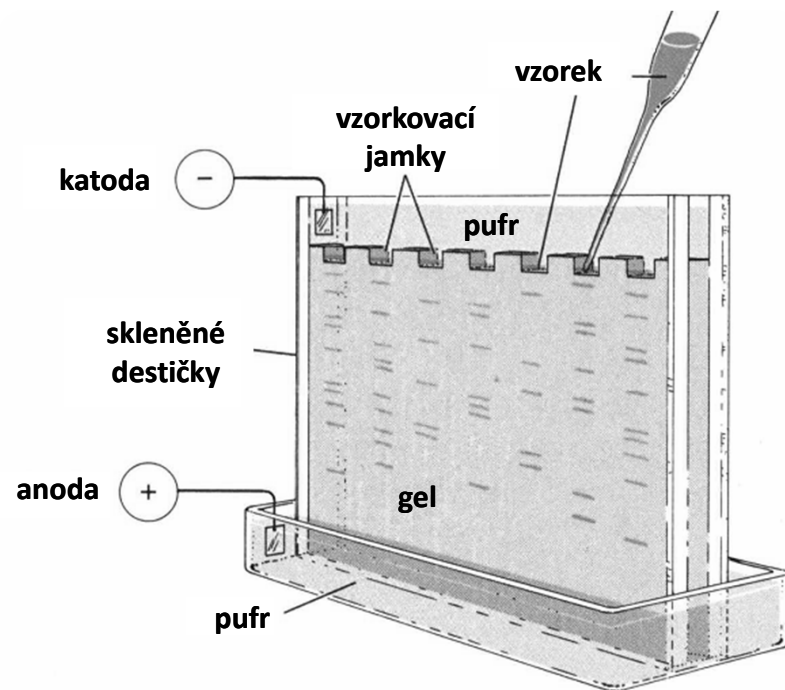


uspořádání



základní provedení

1. ke vzorku se přidá vzorkovací pufr
2. vzorek se nanese do jamek
3. gel se umístí mezi elektrolyty a aplikuje napětí
4. opláchne a obarví



$$R_f = \frac{I_i}{I_{\max}}$$

retenční faktor

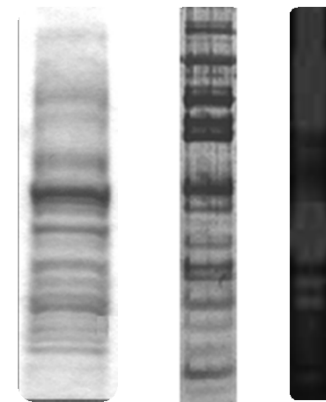
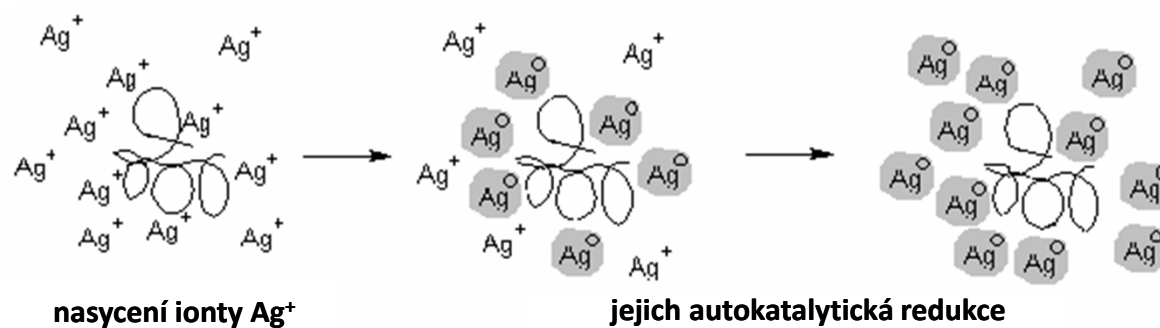
vizualizace (staining)

Coomassie Brilliant modř (CBB; fixování, barvení, odbarvování)
stříbro (+ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, + AgNO_3 , + formaldehyd /iniciace red./, **stop** – kyselina octová)

SYPRO rubínová – fluorescenční

Zn^{2+} + imidazol, + ZnSO_4 ; negativní barvení (zóny neobarvené), odstranitelné

Cu^{2+} + CuCl_2 ; negativní barvení (zóny neobarvené), odstranitelné



barvení pro MS

: CBB R-250 (ne koloidní G-250)

: stříbro (nízká koncentrace vzorku)

kvalitní, ale omezená separace (M_w , pI)

: extrémní pI a M_w

využití

: separace jednodušších směsí (1D PAGE)

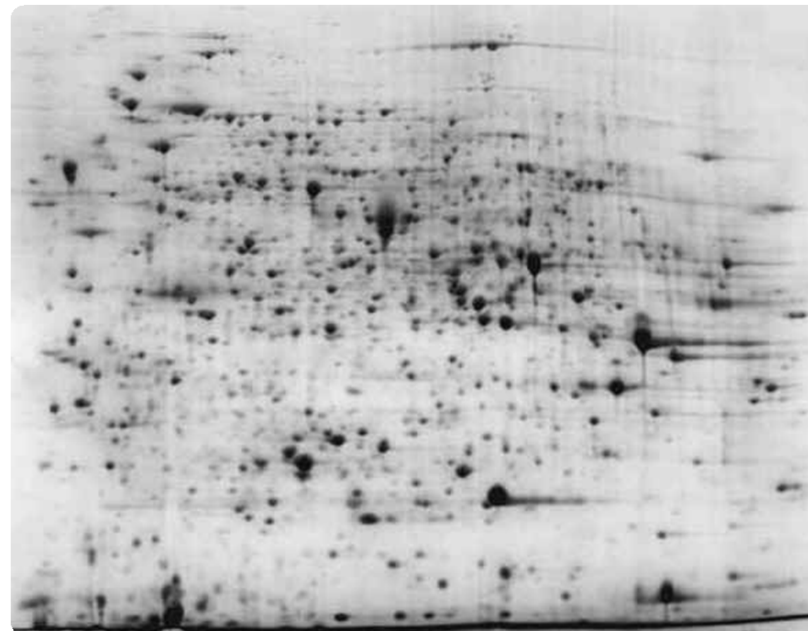
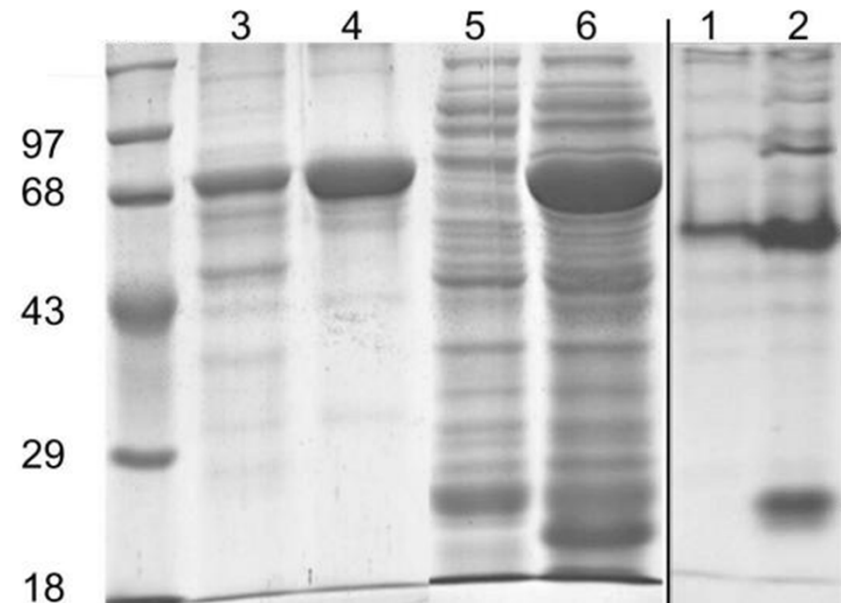
: separace složitých směsí (2D PAGE)

: identifikace proteinů

:: nepřímé spojení GE-MS

:: přímé spojení CE-GE-MS

: problémy se zpracováním gelu



přenos (otisku)
(blotting)

přenos analytu z gelu na membránu

- : další zpracování informací
- : manipulace se separovanými analyty

princip

- : aplikace síly kolmo k rovině gelu (difúze, elektroforetická mobilita)

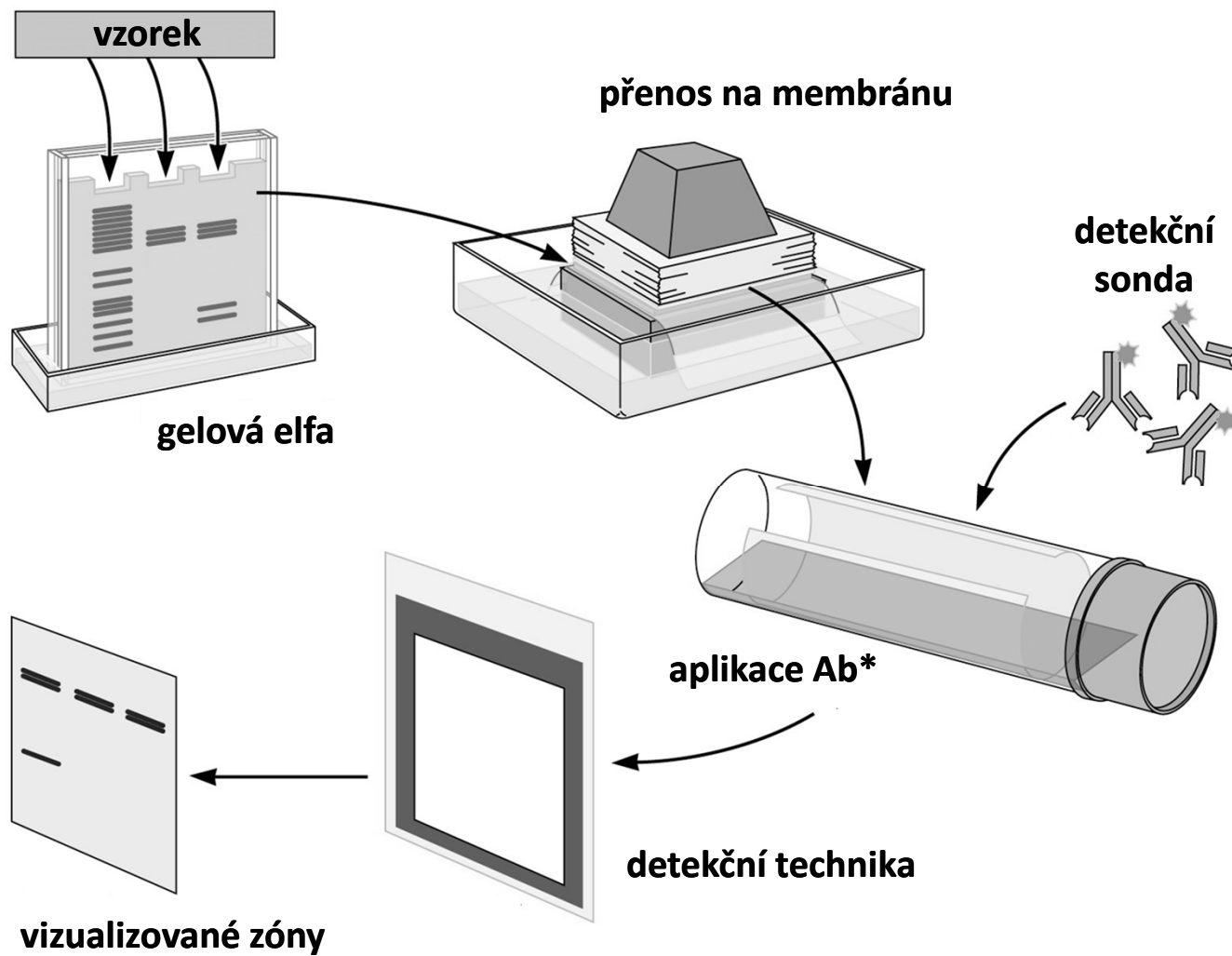
materiály membrán

- : nitrocelulóza, polyvinyliden fluorid (PVDF)

proteiny

Westernův přenos (1979)

detekce – monoklonální protilátky
⇒ *imunoblot*

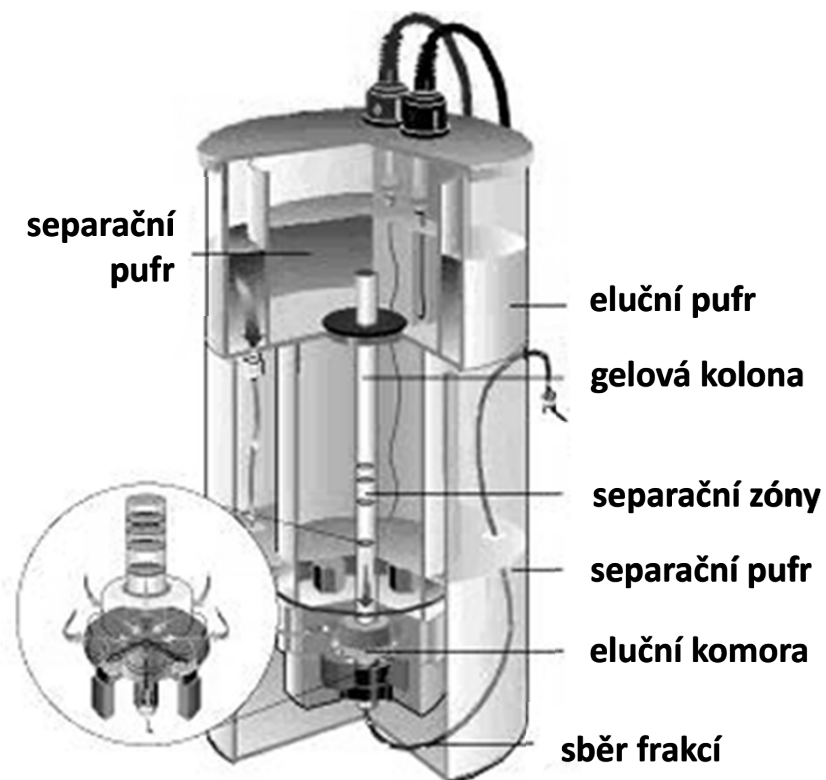


kolonová (průtoková) preparativní gelová elektroforéza (*CEGE, column nebo continuative elution gel electrophoresis*)

: technika podobná plošné GE – primárně preparativní (labilní proteiny)

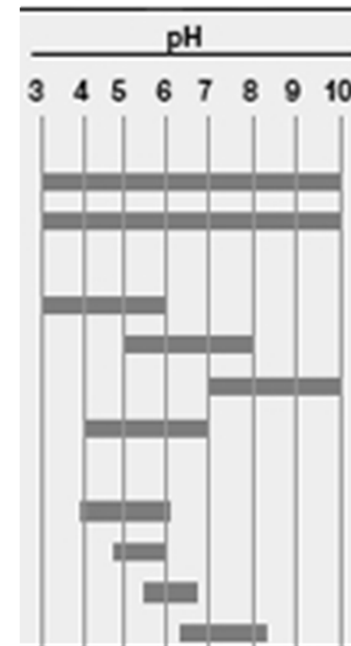
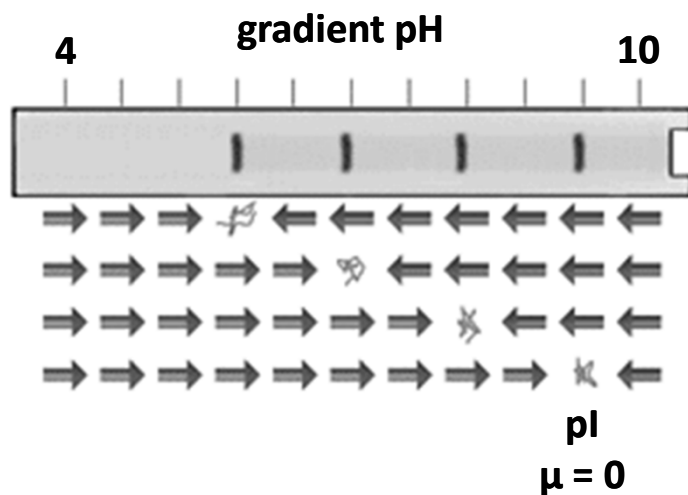
:: převážně SDS-PAGE

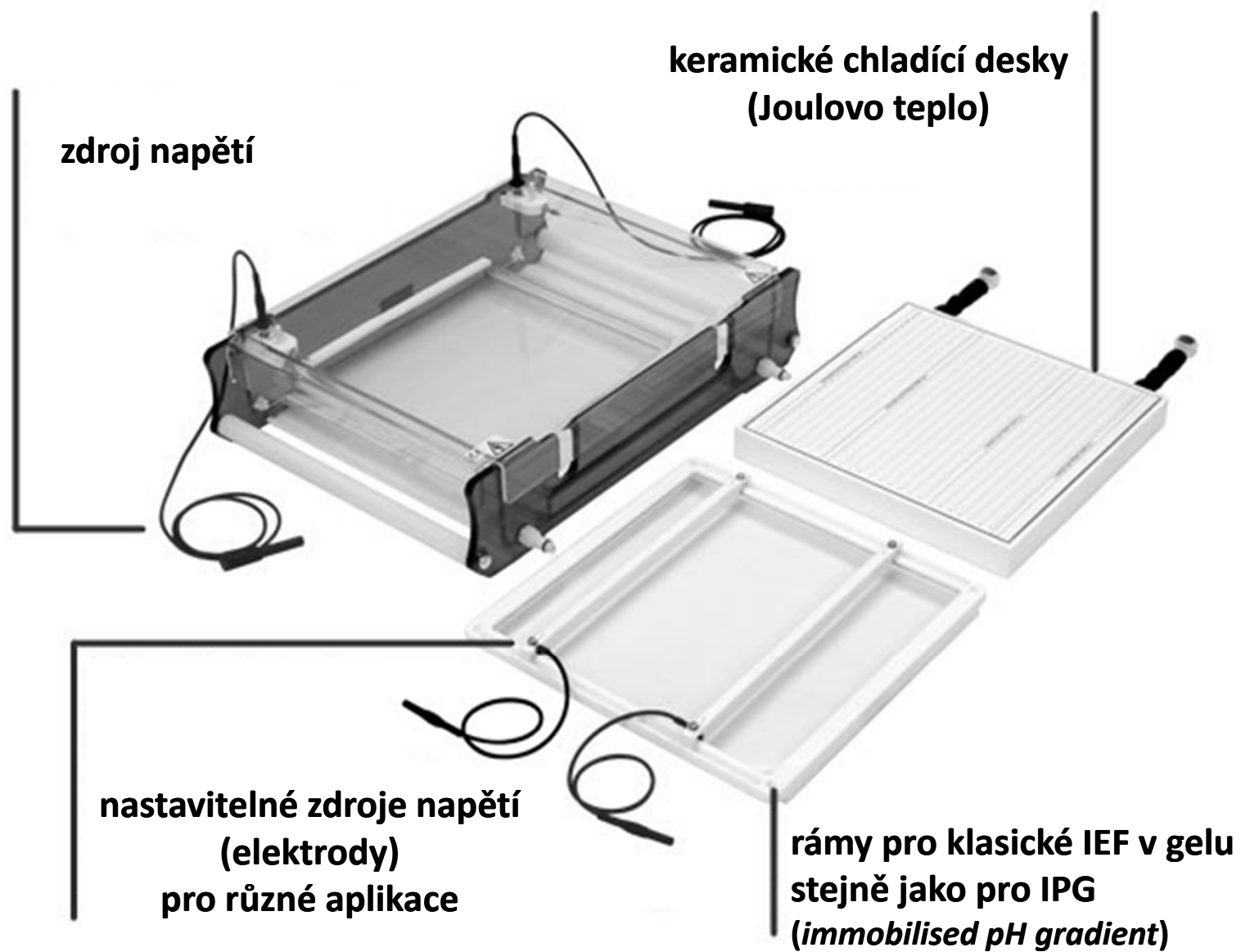
: vhodná pro on-line spojení s detekčními technikami (MS)



izoelektrická fokusace (IEF; *isoelectric focusing*)

: separace v gradientu pH, v elektrickém poli
(a gelu)



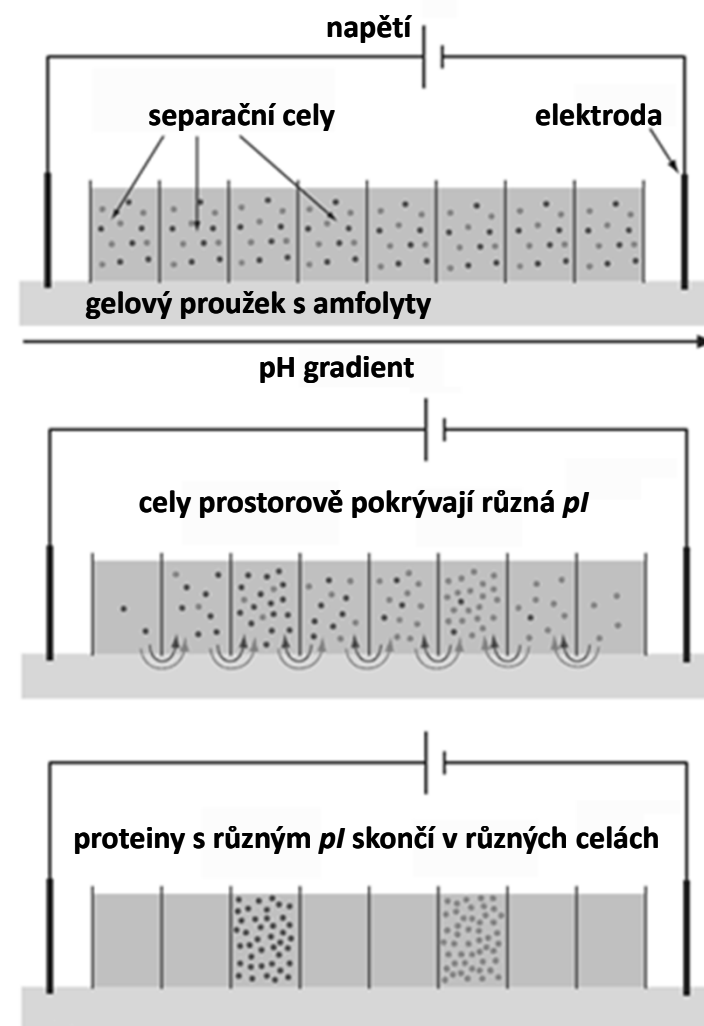


izoelektrická fokusace mimo gel (IEF *off gel*; OFFGEL)

- : peptidově/proteinově specifické
- : spíše frakcionace než separace
- : artefakty v MS

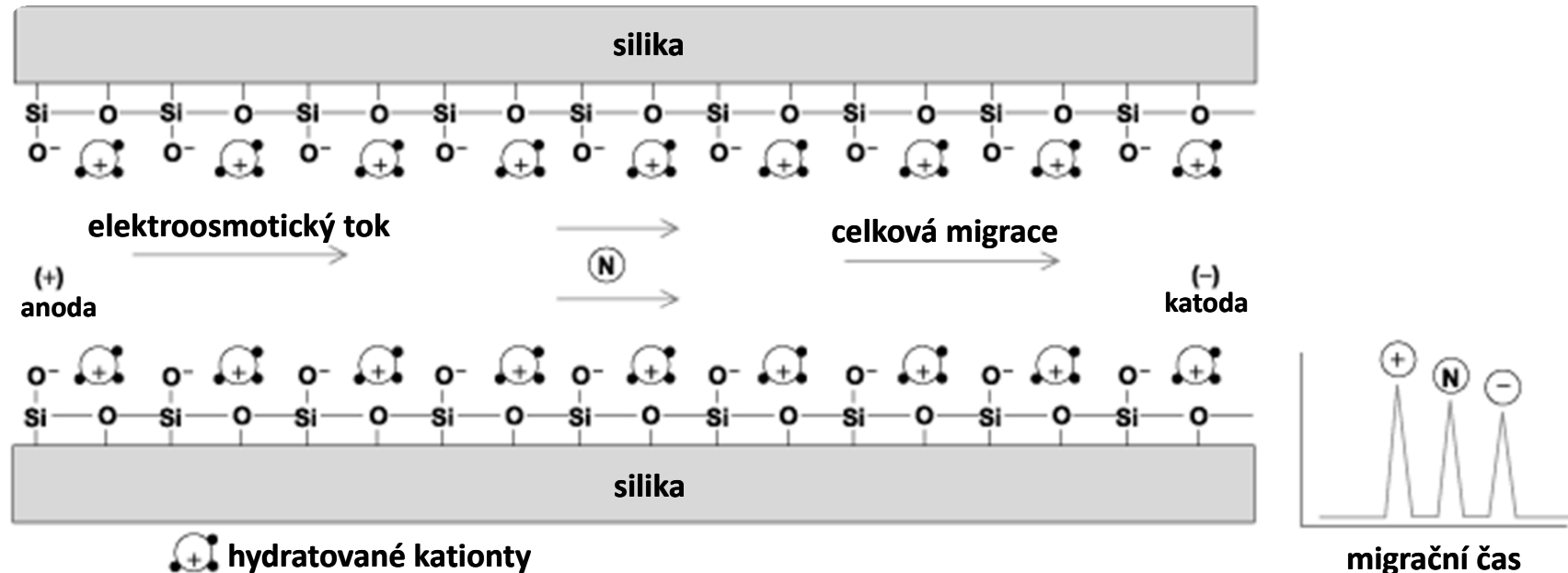
využití

- : nepřímé spojení
s detekční technikou



kapilární zónová elektroforéza (CZE, capillary zone electrophoresis)

: separace v elektrickém poli (s využitím elektroosmózy)



adsorpce na stěny separačního kanálu

: řešení CGE (fyz. i chem. gely)

malá kapacita, nástřik cca 20 nl

využití

první rozměr spojených technik

: nutný kapalinový spoj před MS

: nebo záchyťová kolona

kapalinově chromatografické techniky

základní principy

chromatografická metoda – separace distribucí mezi dvěma fázemi

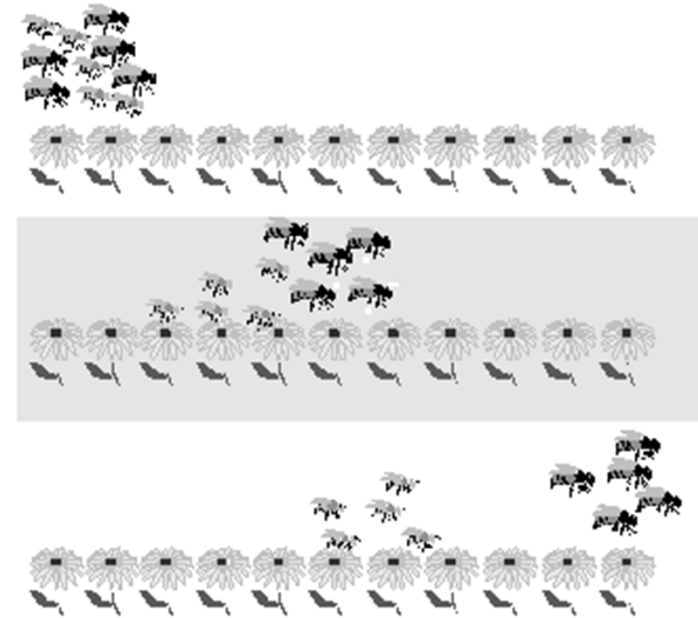
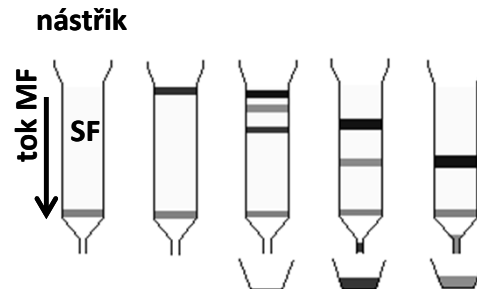
stacionární fáze (SF) – pevná, kapalná **mobilní fáze (MF)** – kapalná, plynná

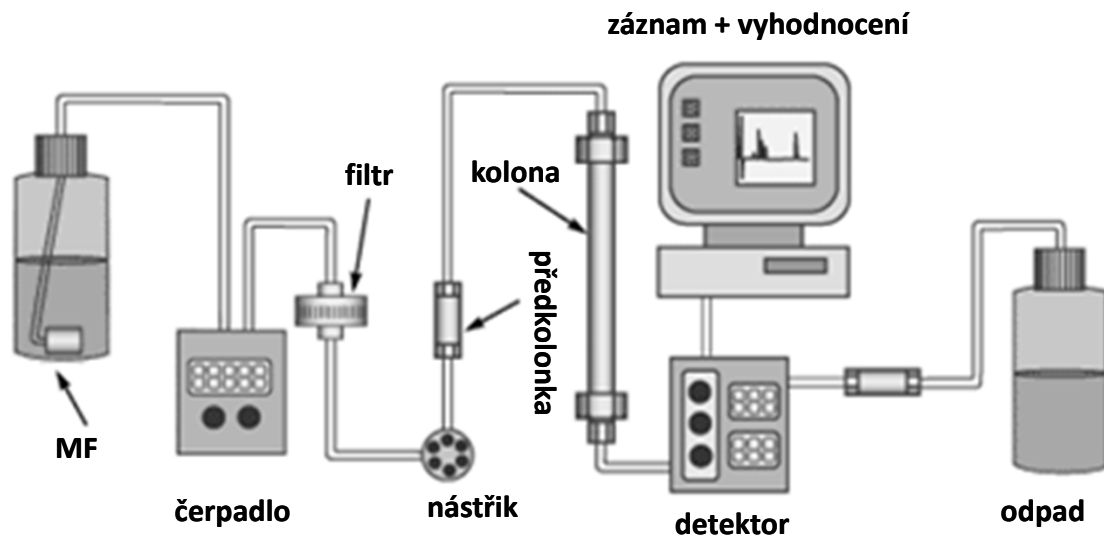
distribuce složek – separace v toku dle polarity, náboje a velikosti

$$K = \frac{a_A^{II}}{a_A^I} \approx D = \frac{C_A^{II}}{C_A^I}$$

distribuční koeficient K (poměr D)

A separovaná látka, I fáze stacionární, II fáze mobilní
a aktivita, c koncentrace





základní provedení

MF

: eluční síla
 :: kontrast k SF

: tok

: retenční čas
 : mrtvý retenční čas

: rozlišení

SF – sférické částice, monolity

: polární (NPLC, **HILIC**), nepolární (**RPLC**, **HIC**)

: iontově výměnné (anex, katex; **IEC**)

: molekulová síta (**GPC**)

eluze

: izokratická

: gradientová (>15 látek)

kolona

: klasická – 10 až 250 mm

: mikrokolony (max 5 cm), kapilární kolony

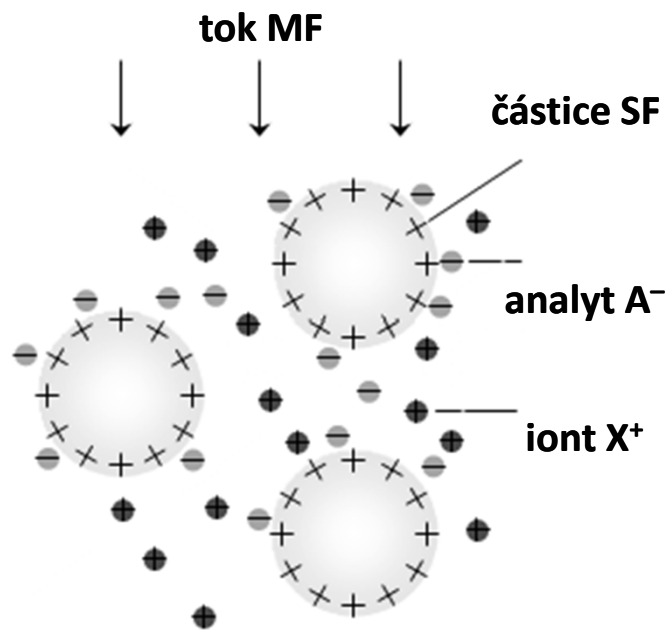
detekce

: spektrofotometrická, hmotnostní spektrometrie

: fluorescence – derivatizace

iontově výměnná chromatografie (IEC, *ion-exchange chromatography*)

: separace **nabitých látek** na **nabité SF**



iont SF + protiiont opačné polarity
: výměna protiiontu za iont analytu
: výměna iontu analytu za iont eluční MF
: výměna iontu eluční MF
za původní protiiont

malý specifický náboj proteinu
: na rozdíl od anorganických iontů
: C a N-konce a pět nabitých AK
:: tři kladně, dvě záporně
: zachování nativity/náboje
:: SF s mezerníky

využití

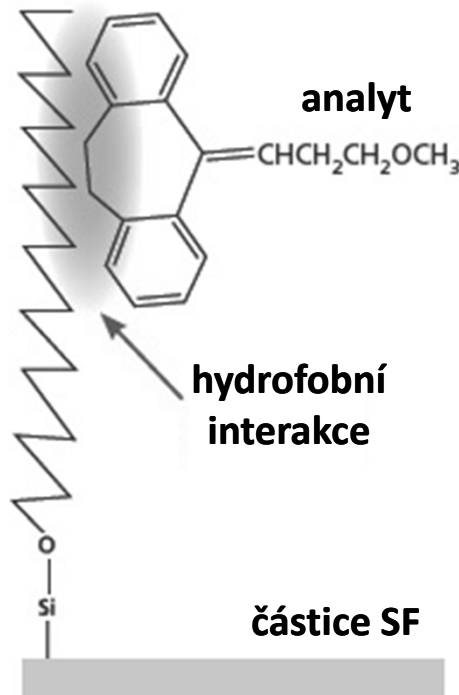
: méně účinná separace proteinů
: první rozměr 2D-LC-MS
:: odsolení v druhém rozměru
: SCX při pH \approx 3

chromatografie na obrácené fázi (RP-HPLC, RPLC, *reversed phase chromatography*)

- : separace **nepolárních látek** mezi **SF** a **MF** o **různé polaritě**
- :: MF je **polárnější** než SF

molekuly analytů se dělí mezi **SF** a **MF** na základě své **rozdílné polarity**

- : méně polární látky setrvávají v systému déle
- : než látky polárnější



peptidy (i proteiny)

: převážně slabě polární až nepolární

⇒ iontově-párovací mód
(TFA, FA, AFA)

využití

- : separace peptidů (C18, C12), proteinů (C4 - 6)
- : druhý rozměr 2D-LC-MS
- :: vysoké rozlišení, na monolitu rychlé
- :: kompatibilní rozpouštědlově s MS
- : IP-RPLC při pH \approx 3 nebo pH \approx 10

chromatografie s hydrofilními interakcemi (HILIC, *hydrophilic interaction chromatography*)

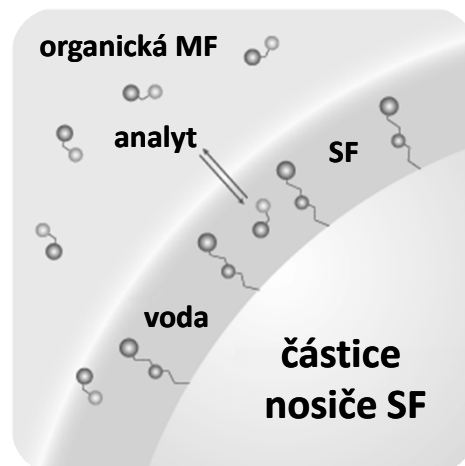
: separace **polárních látek** mezi **SF** a **MF** o **různé polaritě**

:: SF je polárnější než MF

molekuly analytů se dělí mezi **SF** a **MF** na základě své **rozdílné polarity**

: polárnější látky setrvávají v systému déle

: než látky méně polární



využití

: separace peptidů a proteinů

: první rozměr 2D-LC-MS

:: polární separace s vysokým obsahem organiky

chromatografie s hydrofobními interakcemi (HIC, *hydrophobic interaction chromatography*)

: separace **nepolárních látek** mezi **SF** a **MF** o **různé polaritě**

:: MF je polárnější než SF

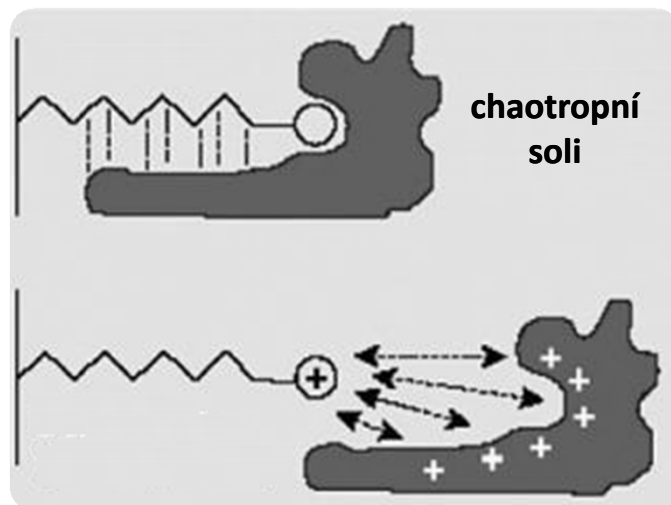
molekuly analytů se dělí mezi **SF** a **MF** na základě své **rozdílné polarity**

: **chaotropní soli** odstraní solvatační obaly a exponují nepolární skupiny

:: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

: **anti-chaotropní soli** je zase obnoví

:: KSCN a KClO_4



velký vliv **teploty**

využití

: separace proteinů (C4 – 8)

molekulová vylučovací chromatografie (SEC, GPC, GFP, *size exclusion chromatography*)

: separace **látek o různé velikosti** pomocí **sítového efektu**
:: *de facto* nejde o chromatografii

molekuly analytů se dělí mezi na základě své **rozdílné velikosti**

: **větší molekuly** se **nevejdou** tak **hluboko** do pórů **SF**
a setrvávají v systému **kratší dobu**

: **menší molekuly** se do nich **vejdou hlouběji**
a setrvávají v systému **delší dobu**

: **MF látky** jen **unáší**

využití

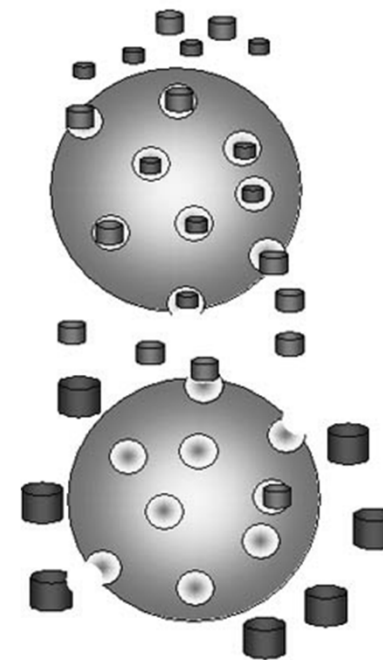
: separace proteinů

: odsolení směsí proteinů

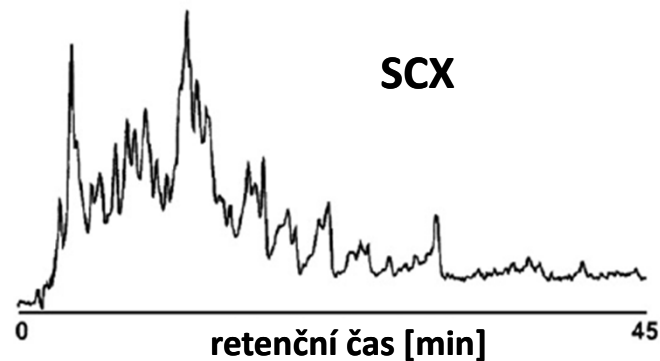
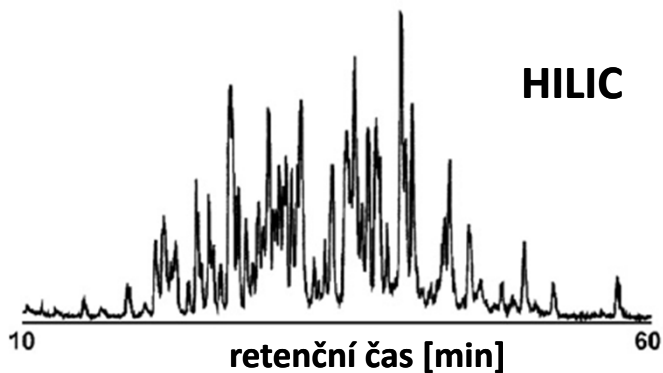
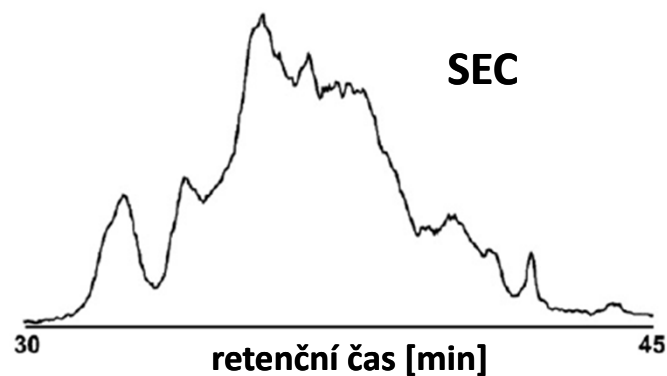
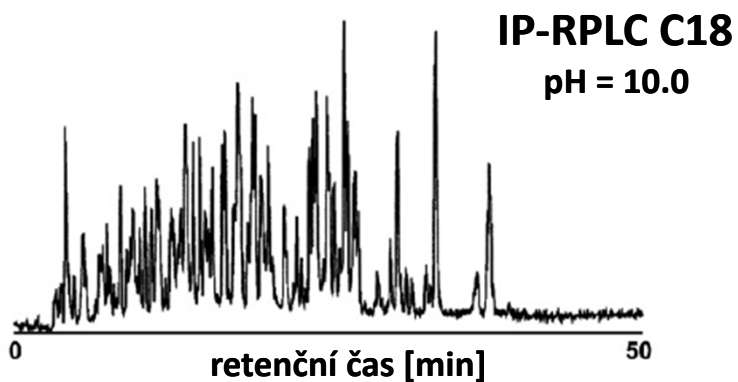
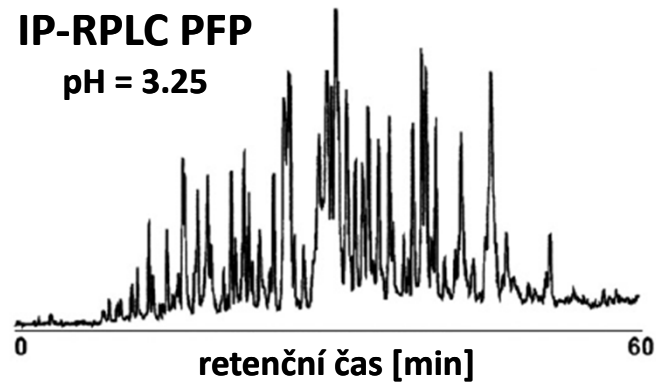
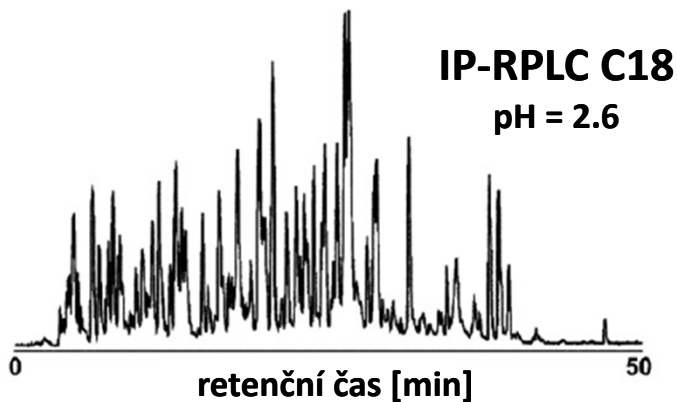
: frakcionace podle mol. hmotnosti

: první rozměr 2D-LC-MS

:: nepříliš vhodná pro LC-MS – složení MF



tryptická směs peptidů z fosforylázy B



predikce separačních vlastností na základě sekvence

komplexnost vzorku, nízká množství proteinu, ionizace
⇒ **najdeme náš protein/peptid?**

retenční/migrační čas (t_R/t_m)

: závisí na chemickém složení; AK sekvenci

známe-li sekvenci, odhadneme retenční čas

: větší pravděpodobnost nalezení proteinu/peptidu

jak t_R/t_m odhadneme?

: numerické modelování (*hard modelling*)

: poloaproximační modelování (*semi-hard modelling*)

:: SSRCalc, LCMSWARP, ScoreRidge, SVR

: aproximační modelování (*soft modelling*)

:: umělé neuronové sítě (ANN)

molekulové deskriptory (*polo-aproximační modelování*)

- : délka peptidu, počet AK
- : molekulová hmotnost (M_w)
- : hydrofobicita (HydroMCalc)
- : hydrofobní moment (μ_H ; HyperChem)
- : logaritmus teoreticky vypočítaného rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda (logP; Molinspiration)
- : van der Waalsův objem (VvdW)
- : objem molekuly dostupný rozpouštědлу (VSA)

optimální deskriptory pro ANN (chyba předpovědi t_R 12 %)

- : struktura ANN 27-3-1
- : aminokyselinové složení
- : délka peptidu
- : logP
- : hydrofobicita
- : zadání 1. AK z N- a C- konce (rozdělení do 7 skupin)

afinitní chromatografie (AF, *affinity chromatography*)

: separace látek o různé afinitě k ligandu pomocí specifické interakce
:: *de facto* nejde o chromatografii

: **ligand – analyt**

:: enzym – substrát, inhibitor, koenzym

:: antigen – protilátka

:: polysacharidy – lektin

:: vnesená značka (*tag*)

:: His₆, myc, TAP

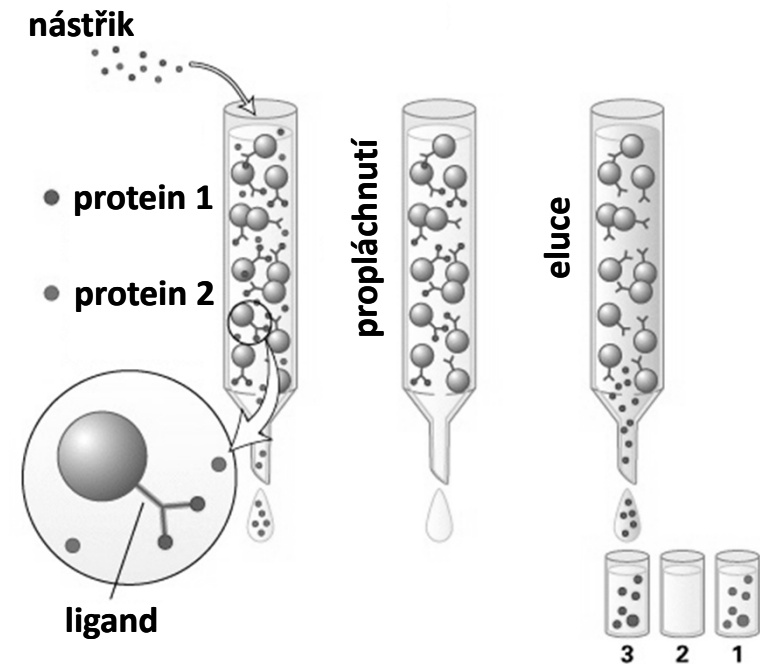
: **chirální separace**

:: cyklodextriny, makrocyclická antibiotika

využití

: purifikace, izolace

(: studium komplexu ligand-biomakromolekula)



afinitní chromatografie s vázaným iontem kovu (IMAC, *ion metal affinity chromatography*)

ligand – chelatační ligand (např. iminodiacetát; IDA) + iont kovu

eluce

- : Δ teploty, pH, iontové síly
 - :: roztoky solí, kyselin, zásad
- : Δ permitivity prostředí (ϵ)
 - :: organická rozpouštědla
- : specifickými činidly
 - :: volnými ionty kovu ($\text{Ga}^{\text{III}+}$, $\text{Fe}^{\text{III}+}$, $\text{Ni}^{\text{II}+}$, $\text{Cu}^{\text{II}+}$)
 - :: nízkomolekulárním ekvivalentem funkční vazebné skupiny

izolace analytu

- : účinná, elegantní; selektivní separace
- : z velmi složitých směsí látek bez dalších čistících postupů

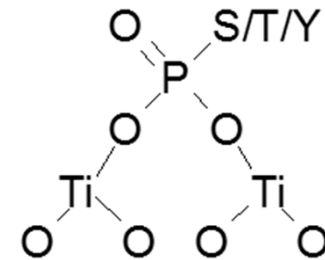
afinitní chromatografie s vázaným oxidem/hydroxidem kovu (MOAC, *metal oxide/hydroxide affinity chromatography*)

ligand – TiO_2 , FeTiO_3 , ZrO_2 nebo $\text{Al}(\text{OH})_3$

: lewisovské kyseliny, které interagují s lewisovskými bázemi ($-\text{PO}_4^-$)

afinitní purifikace (*enrichment*)

: fosfoproteinů/fosfopeptidů



vazba

: za nízkého pH (2 – 3); zábrana nespecifické vazby

: další aditiva – AcN (50 – 80 %), mono- a dikarboxylové kyseliny

eluze : zvýšením pH (10 – 12)

: anorganické fosforečnany

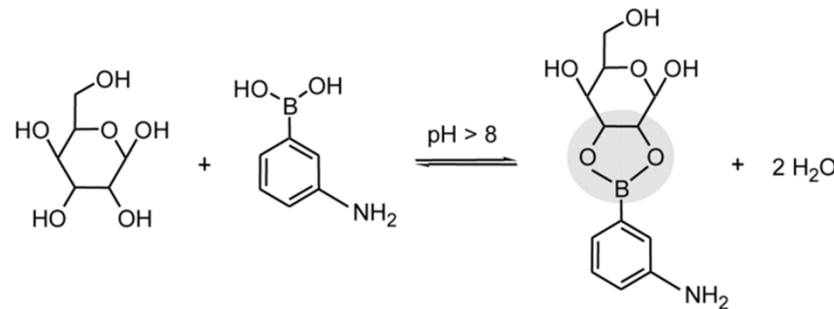
: organické báze (piperidin, pyrrolidin)

afinitní chromatografie pro glykosylované proteiny

ligand : konkanvaliny (např. ConA)

: lektiny (LCA čočkový, PNA arašídový, SBA sójový, WGA pšeničný, UEA hlodášový)

: boráty



rychlá chromatografie proteinů
(FPLC, *fast protein liquid chromatography*)

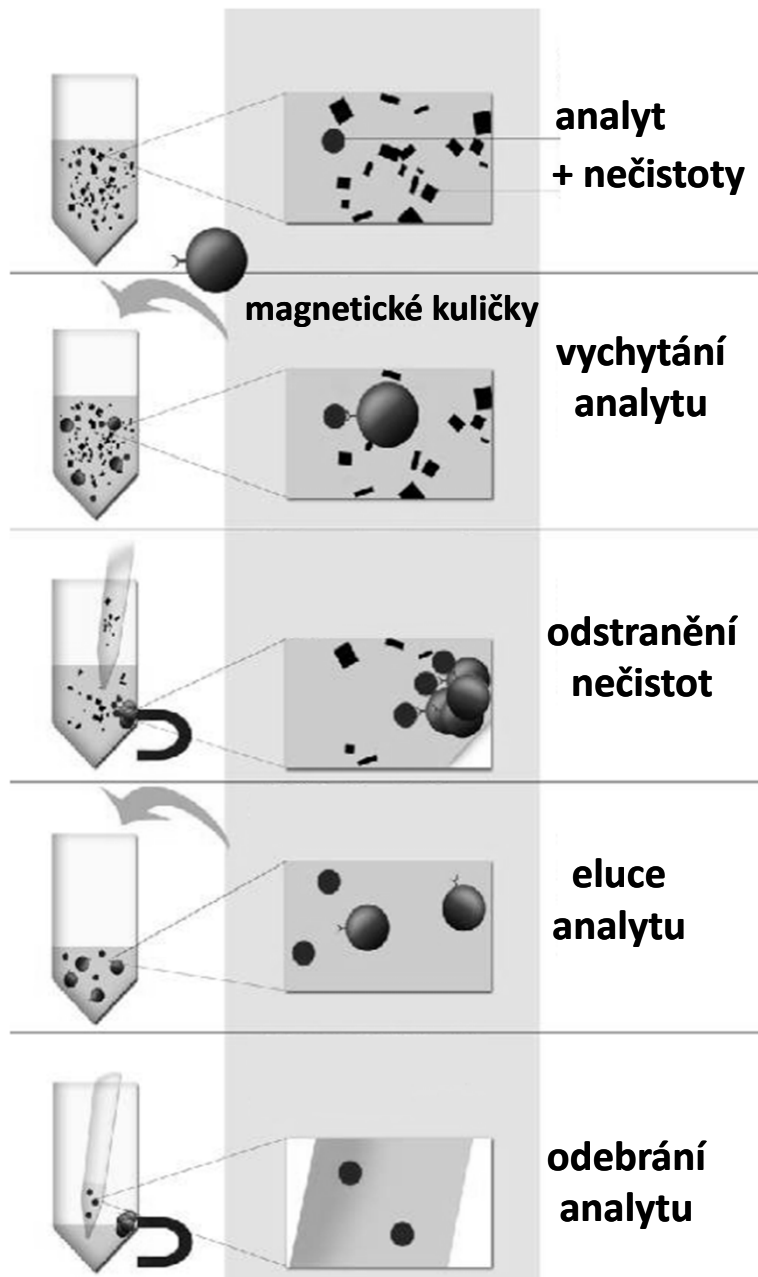
spíše obchodní název fy *Pharmacia*

rozdíly oproti HPLC

: stejné SF (mol. síta, iontoměniče, polární i nepolární)

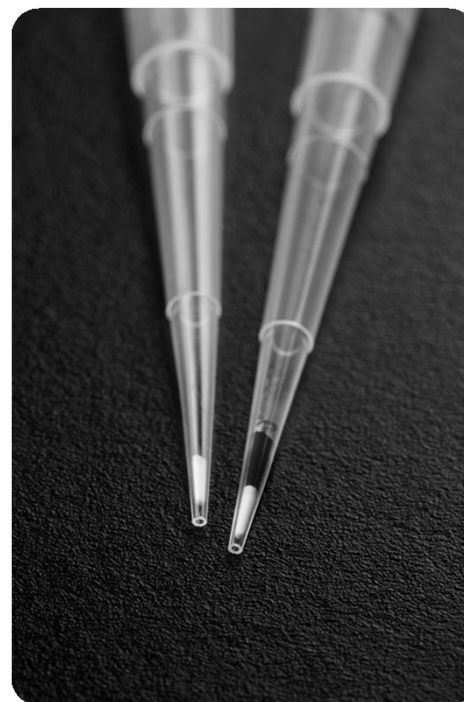
: nižší tlaky – 3-4 MPa vs. 10-40 MPa

magnetické kuličky (*mag. beads*)



jiné než kolonové systémy

špičky (*tips*)



čipy (*chips*)



vícerozměrné separace

podstatné **zvýšení kapacity separace**

: $n_1 \times n_2$

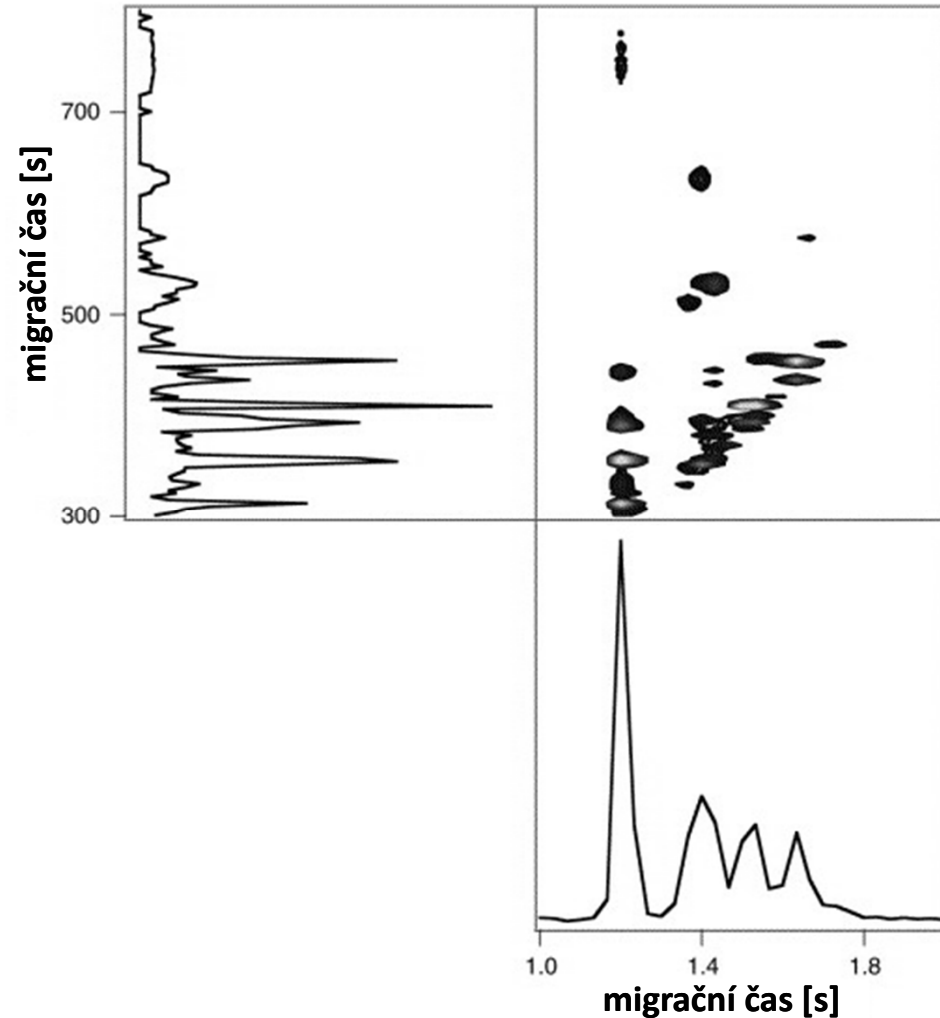
: **přímá** (*in-line*)

:: přímý vstup do 2D z 1D

: **nepřímá** (*off-line*)

:: dávkování sesbíraných frakcí 1D

komplementarita rozměrů
(*orthogonality*)



2D gelová elektroforéza

dvě dimenze

: 1D – IEF

: 2D – SDS-PAGE

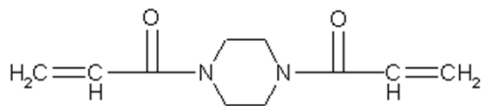
denaturující gelová elfa

: SDS není v gelu už od polymerace (jako u 1D)

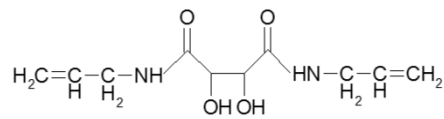
:: tvořily by se micely

: jako zesíťovací činidlo se užívá

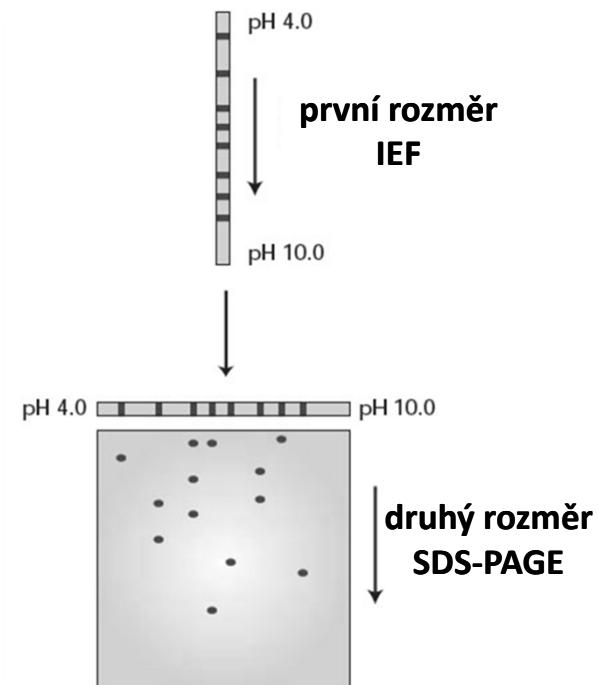
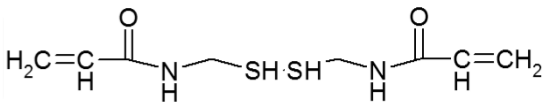
:: piperazindiakrylyl (PDA)



:: diallyltartardiamid (DATD)



:: bisakrylylcystamin (BAC)



thiosíran sodný v gelu snižuje pozadí při barvení stříbrem

vyžívá se i **hustotní gradient** (9 – 16 %)

ve **spojených nádobách** se míchá

: roztok **bez zesítovadla** (B)

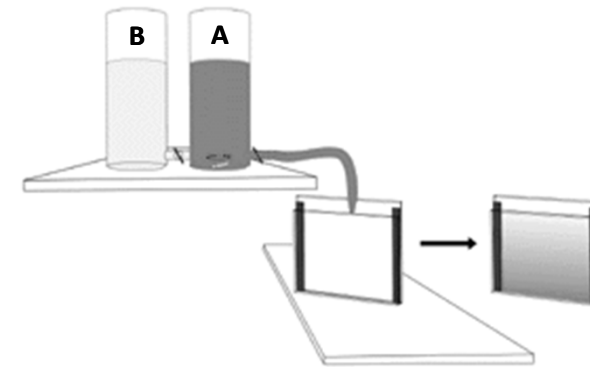
: roztok s **max. koncentrací zesítovadla** (A)

na výtoku se formuje rostoucí gradient zesítovadla

: **profil gradientu** se určuje **tvarem nádob**

nově také **nelineární pH gradienty** v IEF

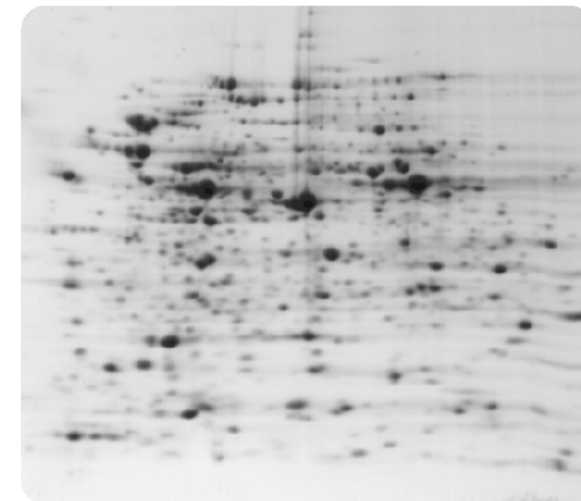
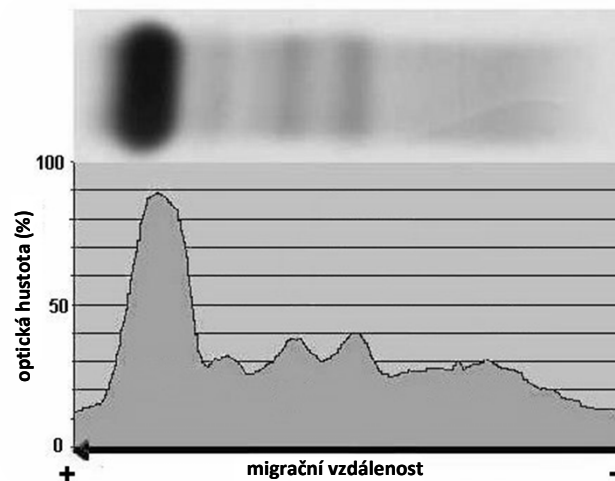
nutno **chladiť** více než 1D (na 5 – 12 °C)

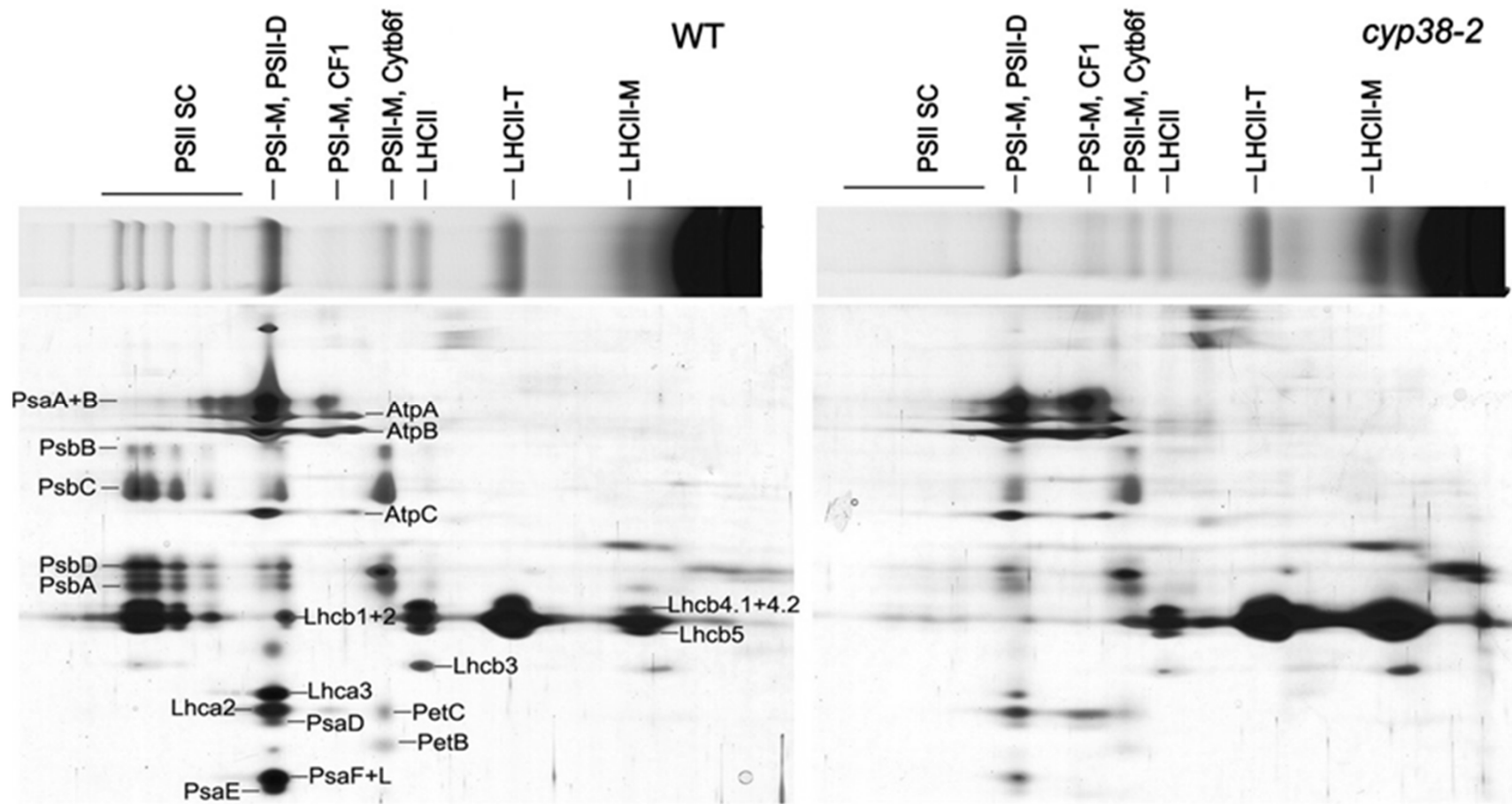


po obarvení

: denzitometrie

: fluorimetrie





2D kapalínová chromatografie

: přímá

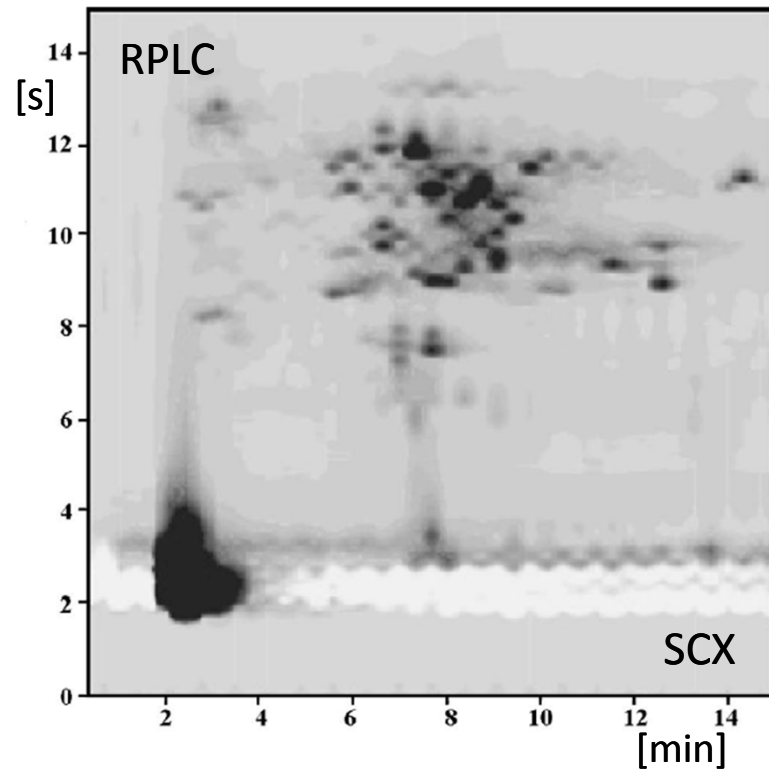
- :: smyčky (průtočné, vypařovací), záchytové kolony
- :: 1D pomalý, 2D rychlý
- :: paralelní měření ve více 2D

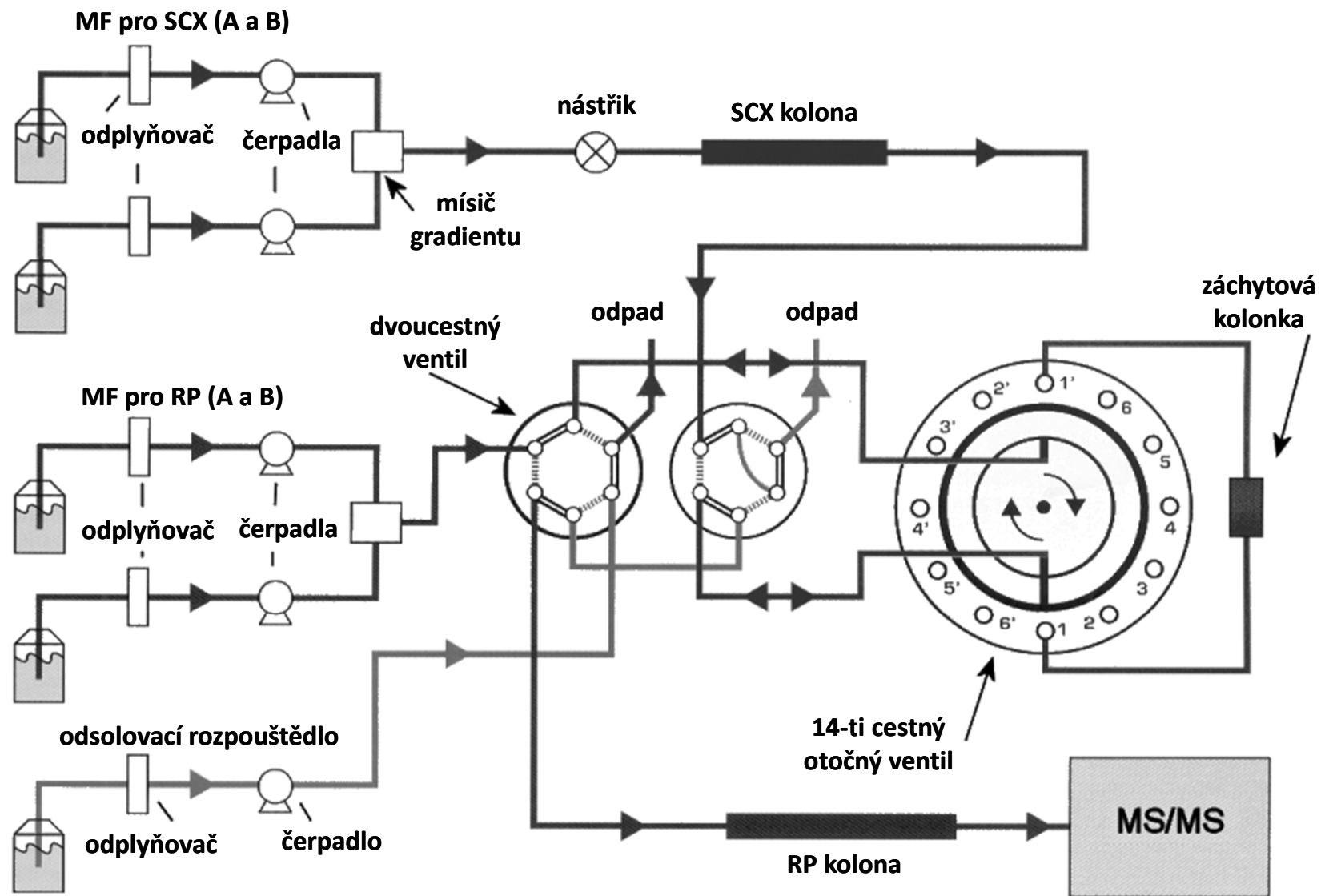
: nepřímá

- :: nezáleží na průtocích v 1D a 2D

kompatibilita

- : rozpouštědlová
- : průtoková





dvě dimenze

: 1D – IEC (SCX), RPLC, HILIC

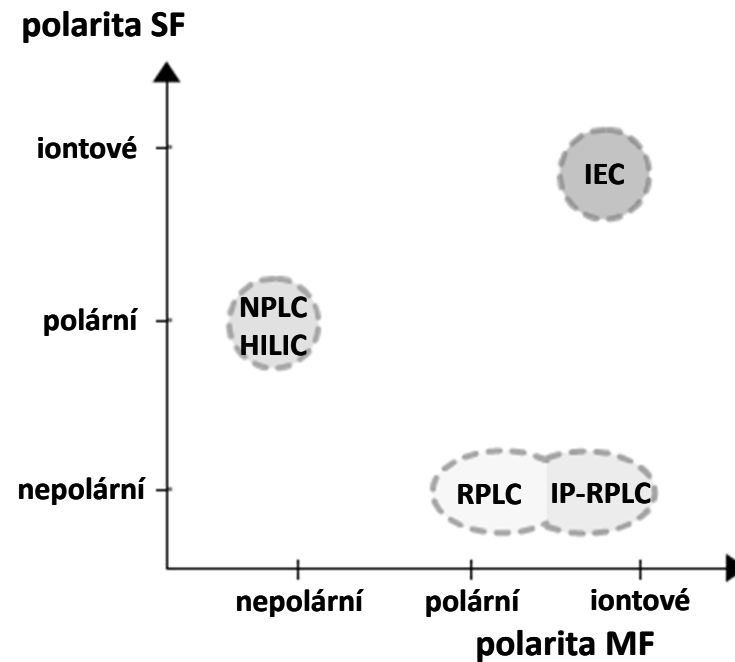
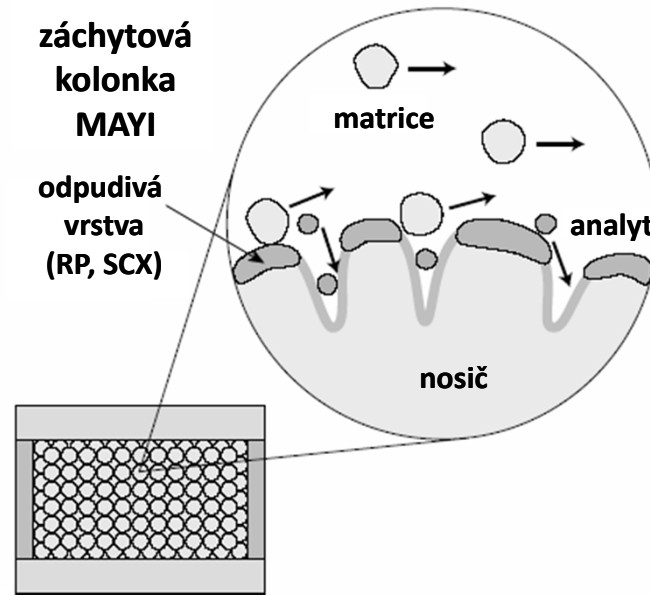
: 2D – RPLC, HILIC

příklady praktického využití

: IP-RP(*basic*)–IP-RP(*acidic*)–MS

: SCX–IP-RP–MS

: HILIC–IP-RP–MS



spojené separační techniky (hyphenated techniques)

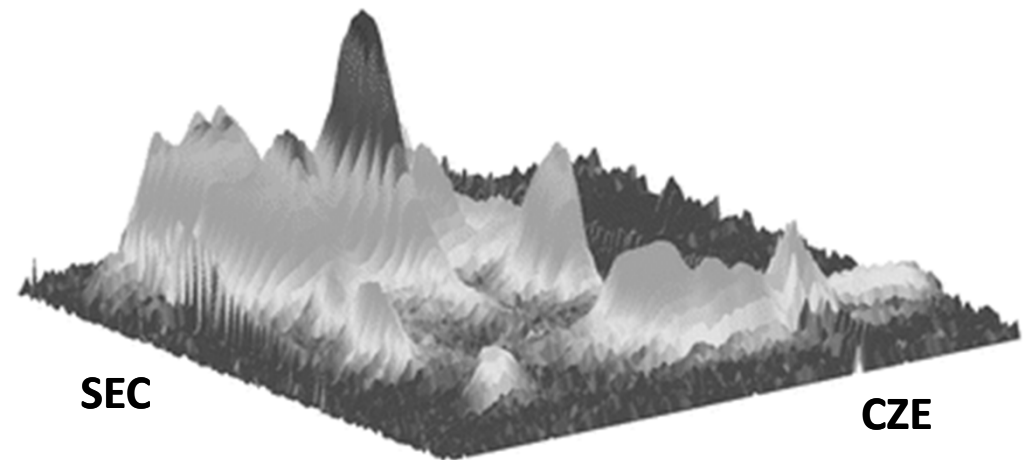
kompatibilita

- : principiální
- : rozpouštědlová

: zvláštní rozhraní

- :: např. kapalinový spoj

komplementarita rozměrů (orthogonality)



LP-IEF-SCX-RPLC-MS

:: frakcionace (20 frakcí)

:: frakcionace (7 frakcí z každé LP-IEF frakce)

:: separace (každé SCX frakce)

příprava proteinového vzorku

- : příprava proteinových izolátů
- : frakcionace/separace proteinů a peptidů

biologický systém → izolace → charakterizace

cíle

- : zachování **čistoty**, **aktivity** a **obsahu** pro následné metody
- : definování vlastností vzorku a jeho akceptovatelných nečistot
- :: vzhledem k výběru analytické metody

prostředky

- : komplementární preparativní techniky
- : minimalizace manipulačních kroků
- :: akumulace chyb, ztráty materiálu
- : minimalizace kontaminování vzorku prostředky preparace

- : zdroj vzorku **přírozený** nebo **umělý systém** exprese proteinů
- : **hostitel** (přírozený systém)
 - :: bakterie, kvasinky, rostliny, transgenní organizmy
- : proteinový obsah, kontaminace
- : procesy **lýze** a **čeření**
- : **subcelulární** (organelová) **frakcionace**
- : **selektivní srážení**
 - :: oddělení různých materiálů
 - ::: nukleových kyselin
 - ::: proteinů

základní postup preparace

třífázová purifikační strategie (CIPP)

: hrubá izolace (*capture*)

:: rychlé odstranění hlavních nečistot (a zakoncentrování)

:: adsorpční metody (IEC, AC)

: čištění meziprojektu (*intermediate purification*)

:: další odstraňování nečistot a zakoncentrování

:: jiné techniky než k hrubé izolaci (AC, HIC; odsolení SEC)

: dočištění izolátu (*polishing*)

:: finální odstranění stopových nečistot (ředí vzorek!)

:: nejčastěji SEC, následné zakoncentrování (precipitace, UF)

kontrola postup preparace

sledování celkového obsahu proteinu

- : jednoduchá separace vizualizuje nečistoty
- :: denaturující PAGE

sledování specifické aktivity enzymů

- : nečistoty a okolnosti v první a druhé fázi mohou aktivitu inhibovat
- :: teplota, proteolýza, oxidace, agregace *atp*.
- : měří se jako specifická aktivita na celkový obsah proteinu

výtěžek

- : celkový obsah proteinu
- : celková specifická aktivita na celkový obsah proteinu

příklad preparace enzymu
alkalická fosfatáza (ALP)

- : periplazmatický protein u *E. coli*
- : defosforylace terminálních fosfátů u ligací DNA
- : termostabilní, metaloprotein (Zn)

vstupní materiál *E. coli*

- : fosfátová „dieta“

specifická lýze buněk *E. coli*

- : aplikace sacharózy (snižuje turgor v membráně, plazmolýza)
- : aplikace lysozymu
 - :: centrifugace
 - ::: oddělení rozpustného enzymu od zbytků buněk
 - :: dialýza na odstranění lyzačního pufu
- : aplikace DNAzy
 - :: snížení viskozity

alternativní lýze buněk *E. coli* – osmotický šok

- : aplikace sacharózy
- : aplikace EDTA – zvýšení permeability membrány
- : přenos do pufru s nízkou osmotickou silou
 - :: pouze periplazmatické proteiny
 - ::: bez lysozymu, DNAzy a s nižší koncentrací sacharózy
 - ::: méně kroků při čištění

odstranění nečistot

- : tepelná precipitace termolabilních bílkovinných nečistot
 - :: centrifugace sraženiny
- : srážení proteinu (ALP) síranem amonným
 - :: odstranění nebílkovinných nečistot
 - :: dialýza na odstranění vysolovacího činidla
- : aniontově výměnná chromatografie (SF – dietylaminoetyl)

určení výtěžku a kontrola průběhu

: stanovení celkového obsahu proteinu

:: metoda podle Bradfordové

:: denaturující PAGE

: stanovení enzymové aktivity

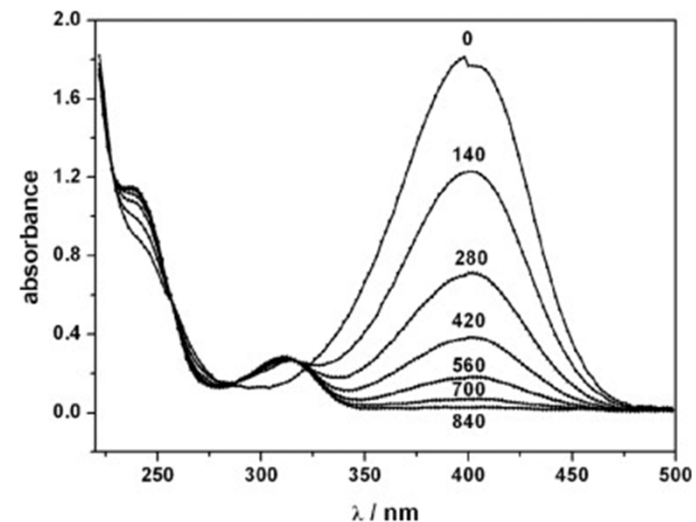
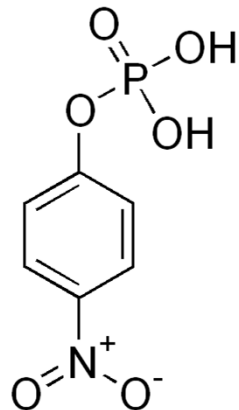
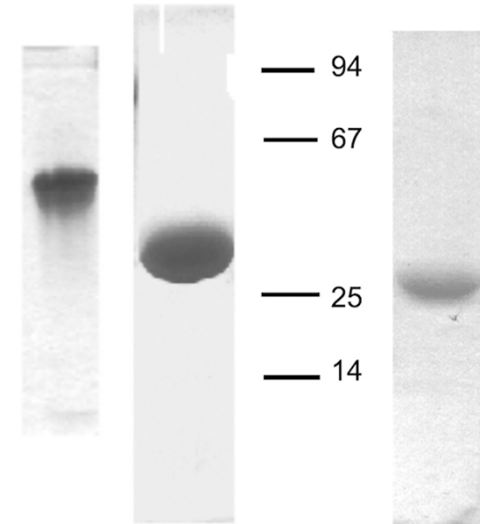
:: s umělými substráty (PNPP)

:: $\text{pNPP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{pNP} + \text{P}_i$

:: spektrofotometrie při 405 nm a $\text{pH} > 8$

::: metoda konstantního času

::: metoda konstantní koncentrace



stabilita (rozpuštnost) roztoku proteinu

: složení roztoku

:: soli, látky s nízkou polaritou (org. rozpouštědla), tenzidy

: okyselení roztoku

:: posun mimo pl

: tenzidy

:: nesmí překročit c_{MC} (kritická micelární koncentrace)

:: membránové proteiny

: protokol *zmraz-rozmraz*

:: rychlé zamražení na suchém ledu (3 min)

:: okamžité zahřátí na 42 °C za intenzivního míchání

:: opakuje se až 3x

srážení proteinů při izolaci

: nežádoucí srážení

:: teplo, pH, vymrazení, vysolení, těžké kovy...

: renaturace

:: odstranění těžkých kovů – chelatony

:: odstranění chaotropních solí – odsolení

:: anti-chaotropní látky – močovina

:: obnovení disulfidických můstků – glutathion, cystein, cysteamin



vliv separace na izolát

- : SEC** – ředí vzorek, mění pufr
- : IEC** – zvyšuje iontovou sílu roztoku a mění pH
- : HIC** – snižuje iontovou sílu roztoku

účinné kombinace separačních postupů

hrubá izolace > čištění > dočištění

- : AC > 0 > SEC/RPLC**
- : IEC > 0 > SEC/RPLC**
- : IEC > HIC > SEC**

pro vysoce nepolární proteiny

- : extrakce s SDS > 0 > SEC**
- : extrakce s SDS > HIC > SEC**

proteinový ekvalizér
protein equaliser beads

metoda afinitní prekoncentrace peptidů a proteinů s nízkým obsahem
: **ekvalizér** – srovnání obsahů minoritních a majoritních složek

ligandová knihovna – částice SF s kombinatorickou knihovnou ligandů

- 1) „čistá“ částice SF je modifikována prvním ligandem; X typů ligandů
- 2) SF první/n-té třídy je rozdělen na X dílů
- 3) každý X-podíl je modifikován druhým/(n+1)-vým ligandem
- 4) jdi na 2)

počet „knih“ : X^X

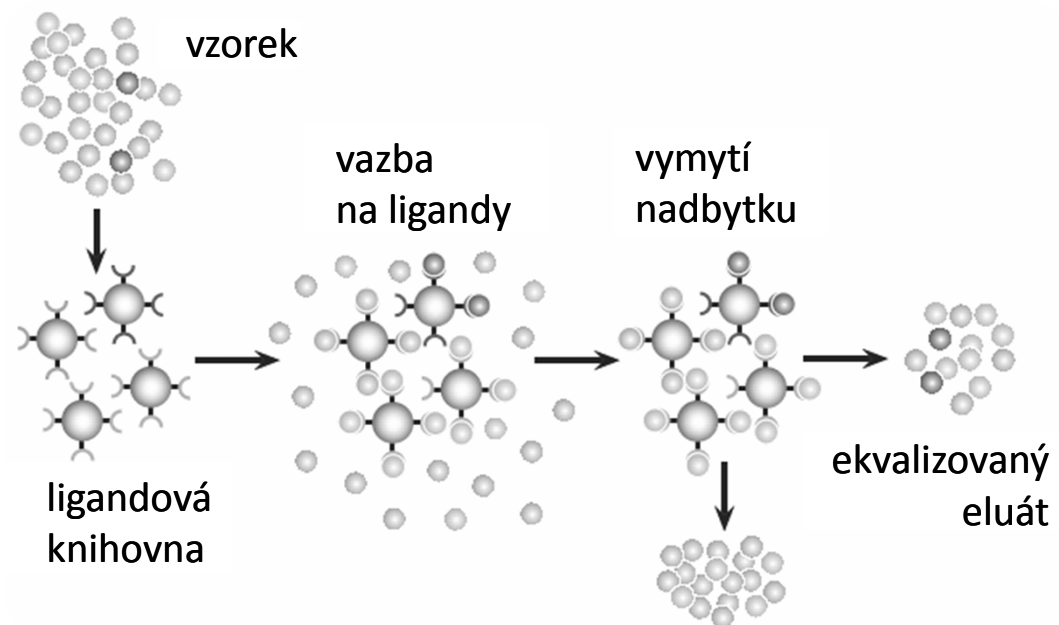
vhodné pro afinitní separace

: *proteinů a peptidů*

(ligand – aminokyselina)

: *nukleových kyselin*

(ligand – nukleotid)



komerční izolační soupravy
(protein isolation kit)

GST-Bind™ Purification Kits

His-Bind® Purification Kits

Magnetight™ Oligo d(T) Beads

MagPrep® Streptavidin Beads

Protein A and Protein G Plus Agaroses

S-Tag™ Purification Kits

Streptavidin Agarose

T7-Tag™ Affinity Purification Kit

ProteoSpin™ CBED (*concentration, buffer exchange and desalting*) Maxi Kit
: snadné odsolení a zakoncentrování

ProteoSpin™ Detergent Clean-up Micro Kit
: odstranění detergentů

:: SDS, Triton® X-100, CHAPS, NP-40 a Tween 20

C7021 Separační metody A

: podzimní semestr

: teorie separace, kapalinová chromatografie, preparativní separace, chirální separace

C8022 Separační metody B

: jarní semestr

: elektromigrační metody, plynová chromatografie, separace makromolekul, membránové separace, hmotnostní spektrometrie, validace a optimalizace

C8980 + C8980c Příprava a charakterizace proteinů I - Exprese a purifikace

: jarní semestr

C6260 + C6270 Metody separace proteinů

: jarní semestr