

snímek 1

Izolace proteinu

snímek 2

Literatura

- *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 proteinu

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

snímek 4

Problémy se vzorkem

- Komplexnost
- Malá množství
- Labilita

snímek 5

Plánování separace bílkovin

snímek 6

Cíl izolace

- Získání homogenní bílkoviny
- Zachování biologické aktivity
- Cistota

↓

Záver : získat vzorek o patricné cistote s vynaložením patricného úsilí

snímek 7

Volba vstupního materiálu

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

snímek 8

Sledování průběhu separace

Metoda	Celková bílkovina	Celková aktivita	Specifická aktivita	Precištění	Výtěžek
extrakt	100	100	1	-	100 %
HIC	50	99	1.99	1.99	99 %
IEX	25	75	3	1.5	75 %

snímek 9

Stanovení koncentrace bílkoviny

Metoda založená

na stanovení koncentrace dusíku	na základě optických vlastností	na základě elektrochemických vlastností
---------------------------------	---------------------------------	---

snímek 10

Kjeldahlova metoda – stanovení
 N_2

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

snímek 11

UV spektrofotometrie

- 280 nm – aromatické AMK interference nukleotidu
- 180 - 230 nm – peptidická vazba

Výhody - nedestruktivní metoda
- není třeba kalibrace

snímek 12

VIS spektrofotometrie


Přídavek činidla → barevný derivát

- Destruktivní metoda
- Nutná kalibrační závislost

snímek 13

Biuretová metoda

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



Měření : 540 – 560 nm
310 nm

snímek 14

Folinova metoda

Princip : hydroxyfenolová skupina tyrosinu redukuje fosfomolybdenany na molybdenovou modr

Měření : 725 nm

snímek 15

Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a Biuretové metody

Měření : 600 nm

snímek 16

Metoda dle Bradfordové

Princip : při vazbě Coomassie Brilliant Blue G 250 na bílkovinu dochází k posunu absorpčního maxima z 465 na 595 nm.

Měření : 595 nm

snímek 17

Nejčastěji používané metody

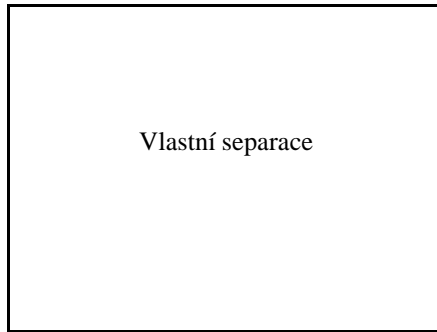
Metoda	Rozsah (ng)	Poznámka
Biuretová	0.5 - 5	okamžitý vývoj
Lowryho	0.05 - 0.5	pomalý vývoj
UV - 280 nm	0.05 - 2	interference
UV - 205 nm	0.01 - 0.05	interference
Bradfordové	0.01 - 0.05	sorpce barviva

snímek 18

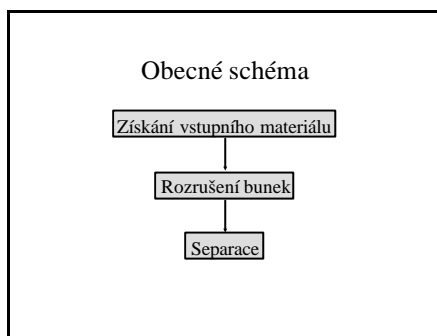
Stanovení biologické aktivity

Enzymatické, imunologické, toxické, hormonální receptorové atd .

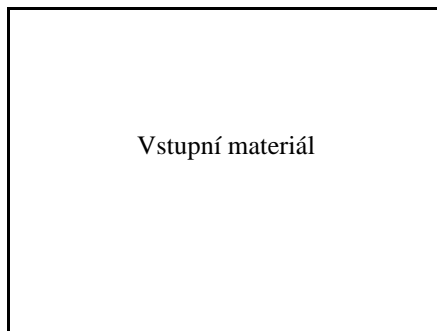
snímek 19



snímek 20



snímek 21



snímek 22

Mikroorganismy

Bakterie, kvasinky, plísne, rasy

Výhody - lze je snadno získat v dostatečné množství

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

snímek 23

Bezobratlí

Hmyz, plži, mlži

Nevýhody - málo se používá, nespolehlivě se získává

snímek 24

Živocíšné tkáně

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

snímek 25

Rostlinné tkáňe

Špenát, repa, hrách

Nevýhoda – problematický rust za definovaných podmínek

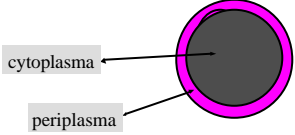
snímek 26

Rozbití a extrakce

snímek 27

Bakterie

- Záleží na lokalizaci



The diagram shows a cross-section of a bacterium. It has a dark grey central area representing the cytoplasm and a pink outer ring representing the periplasm. Two labels with arrows point to these areas: 'cytoplasma' points to the dark grey center, and 'periplasma' points to the pink outer ring.

snímek 28

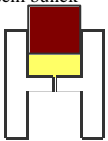
Balotina

Princip – jemné sklenené kulčky přidány do bakteriální suspenze a rychle trepány nebo míchány – nutno chladit

snímek 29

French (X) press


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



snímek 30

Ultrazvuk

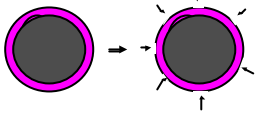
Princip – ultrazvuk (> 20 kHz) v roztoku vyvolává strižní síly – nutno chladit



snímek 31

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


Princip – lysozym rozruší bunecnou stenu, následne je bakteriální suspenze zředena destilovanou H₂O – bakterie popraskají



snímek 32

Živocišné tkáče

- Trecí miska s pískem
- Rucní homogenizatory – Potter – Elvehjemuv
- Mixery
- Osmotická lyse - erytrocyty

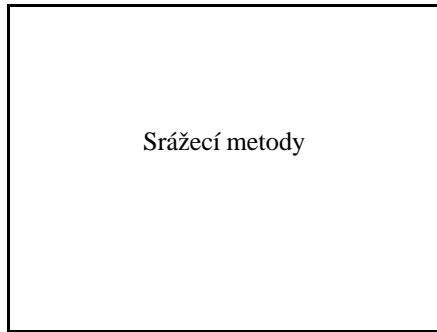


snímek 33

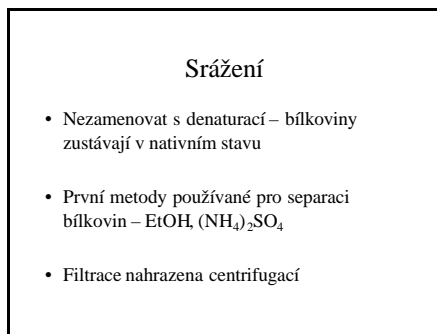
Rostlinné tkáče

- Rozrušení bunecné steny pomocí celulas,
- Obsahují hodne fenolických látek, které mohou být oxidovány na chinony – melaniny, které mohou modifikovat bílkoviny

snímek 34



snímek 35



snímek 36

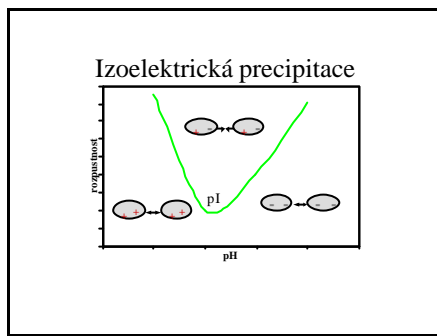


snímek 37

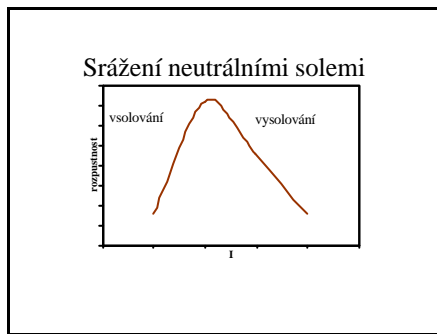
Rozpustnost bílkoviny

- Vlastnosti roztoku – pH, iontová síla, org. rozpouštědla, org. polymery, teplota

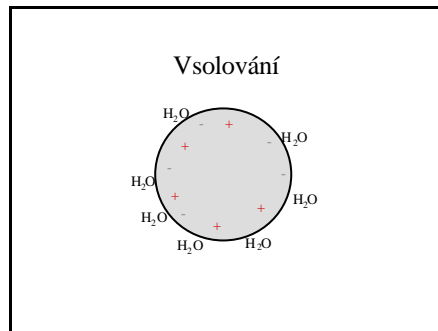
snímek 38



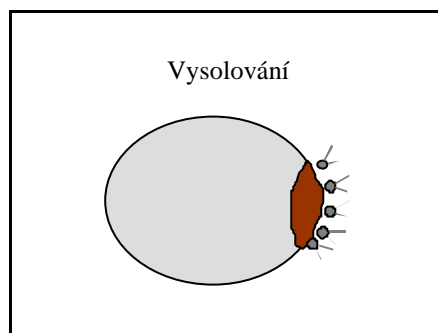
snímek 39



snímek 40



snímek 41



snímek 42

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

- Rozpustnost se málo mění s teplotou
- Satureovaný roztok 4 M - hustota 1,235g/cm³ umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin (hustota 1,29 g/cm³)
- Levný
- Stabilizuje bílkoviny
- Relativně čistý

snímek 43



snímek 44



snímek 45

Srážení org.rozpouštědly
mísitelnými s vodou

- COHN – separace plazmatických bílkovin EtOH
- Nutno provádět při $T < 0\text{ }^{\circ}\text{C}$, při větší teplotě dochází k denaturaci
- Dvojstupnove
- Přidávky z tabulky nebo podle vzorce

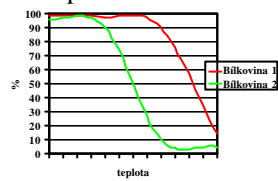
snímek 46

Srážení selektivní denaturací

- Při této metodě denaturujeme balastní bílkoviny, cílová bílkovina musí zůstat z 85 - 90 % v nativním stavu.
- Denaturační vlivy – T, pH, org. rozpouštědla
- Bílkovina musí nejen denaturovat i precipitovat

snímek 47

Tepelná denaturace



snímek 48

Chromatografické metody


snímek 49

Chromatografie

- Cvet – separace chlorofylu na Al_2O_3 1906

snímek 50

Chromatografie

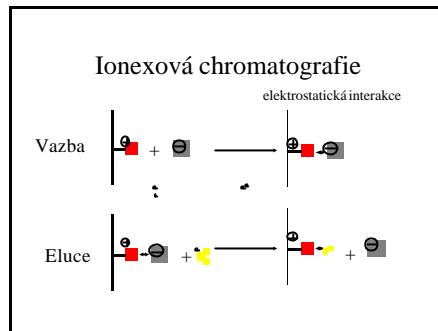


snímek 51

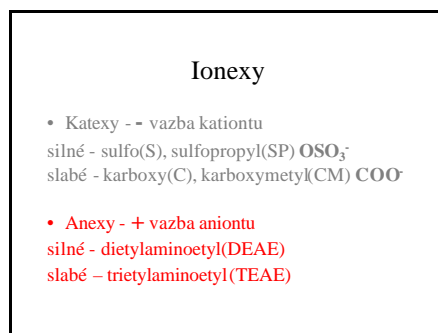
Zarízení pro LPC



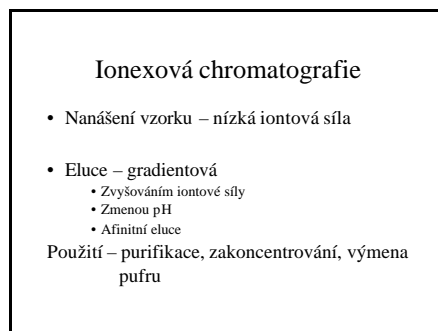
snímek 52



snímek 53



snímek 54



snímek 55

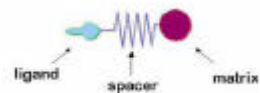
Hydrofobní chromatografie

- Stacionární fáze – - C₈, -fenyl
- Mobilní fáze – vodné roztoky
1.7 M (NH₄)₂SO₄
- Eluce – snižováním iontové síly

Použití : purifikace bílkovin

snímek 56

Afinitní chromatografie



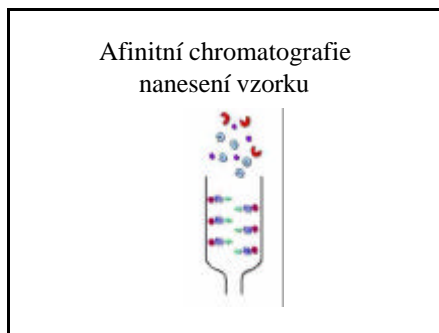
snímek 57

Afinitní páry

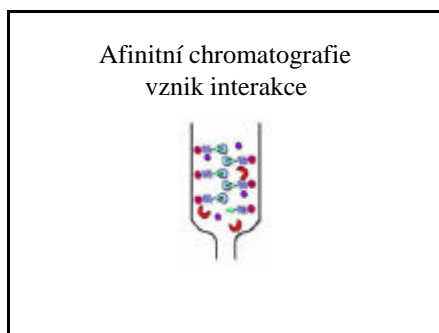
Ligand	Bílkovina	K _d (M)
antigen	polyklonální protilátka	10 ⁹ – 10 ¹⁰
antigen	monoklonální protilátka	10 ¹² – 10 ¹⁶
hormon	enzym	10 ¹⁰
sacharid	lektin	10 ⁷ – 10 ¹¹
hormon, kofaktor	specifická proteina	10 ⁹ – 10 ¹²
substrát	enzym	10 ⁷ – 10 ¹¹
inhibitor	enzym	10 ¹¹ – 10 ¹⁶

K_d = 10⁹ – 10¹⁶ M

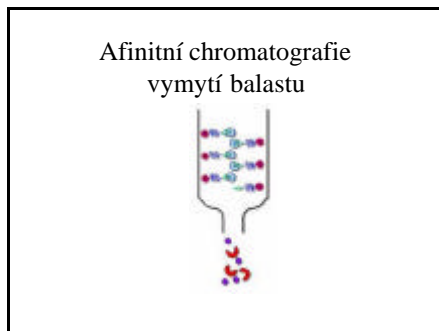
snímek 58



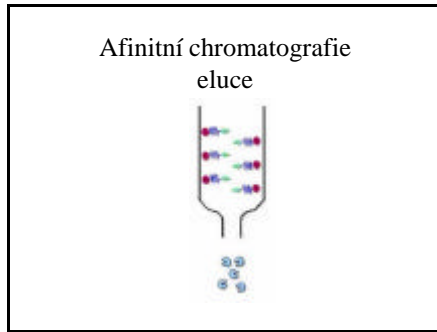
snímek 59



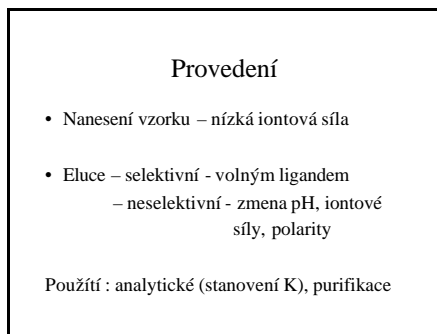
snímek 60



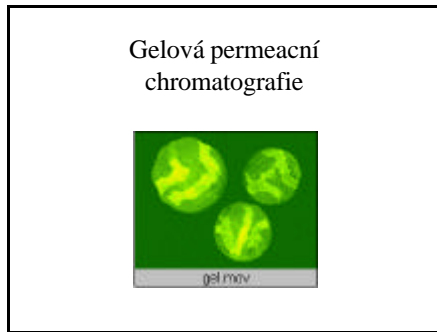
snímek 61



snímek 62



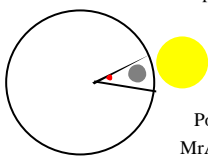
snímek 63



snímek 64

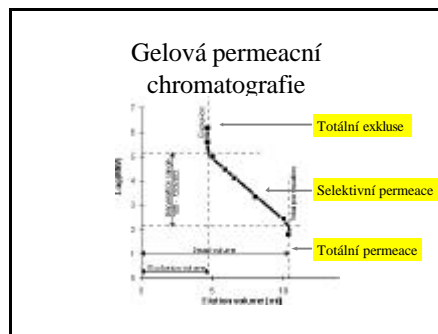
Gelová permeační chromatografie

Princip - stericá exkluze
- omezená difuze



Poradí eluce :
MrA>MrB>MrC

snímek 65



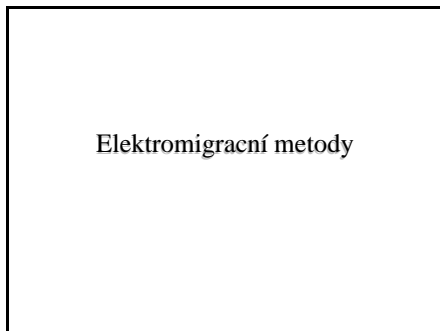
snímek 66

Gelová permeační chromatografie

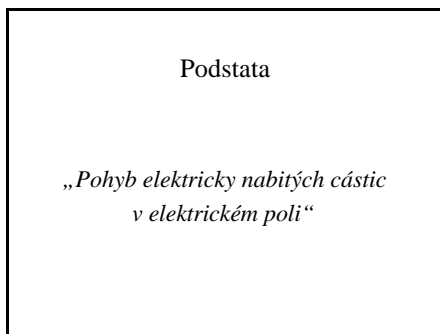
- Nanášení vzorku – objem vzorku < 2% objemu kolony
- Eluce – izokratická

Použití : stanovení Mr, odsolování, purifikace

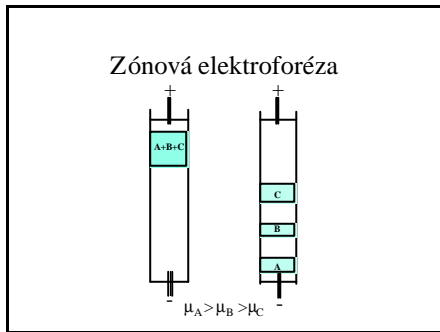
snímek 67



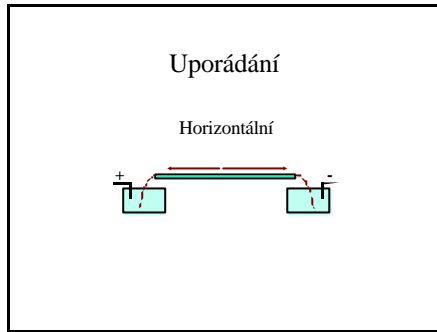
snímek 68



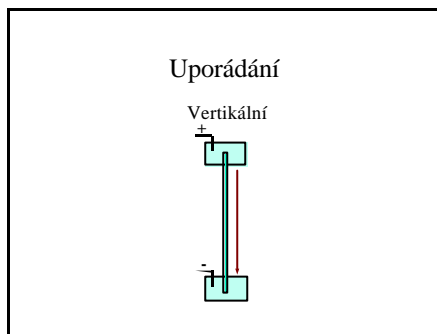
snímek 69



snímek 70



snímek 71



snímek 72

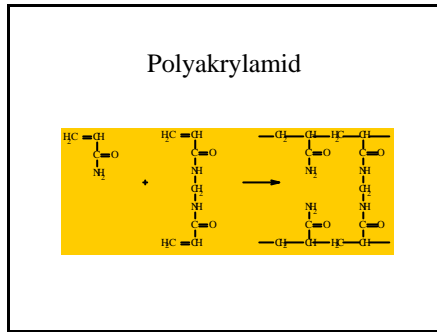
Polyakrylamid

Složení – kopolymer akrylamidu a
N,N, - methylenbisakrylamidu

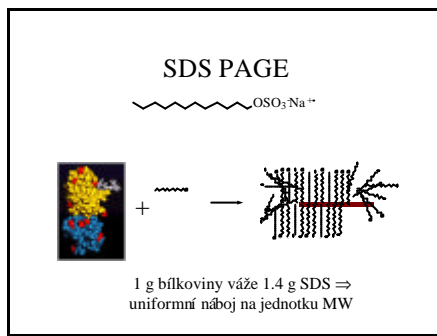
+ plně splňuje požadavky
- **Monomery jsou neurotoxiny !!!!!**

Použití : analýza bílkovin

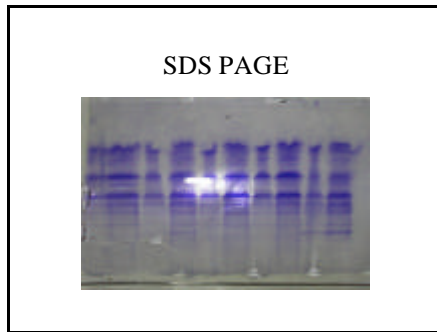
snímek 73



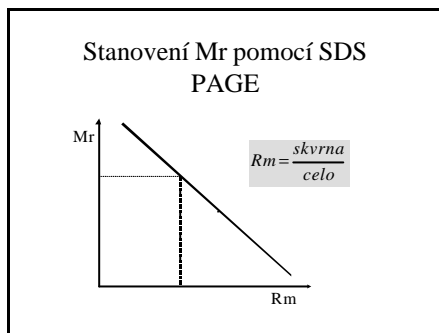
snímek 74



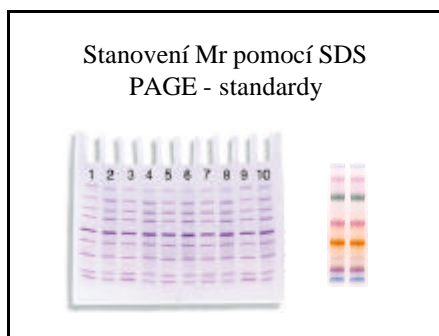
snímek 75



snímek 76



snímek 77

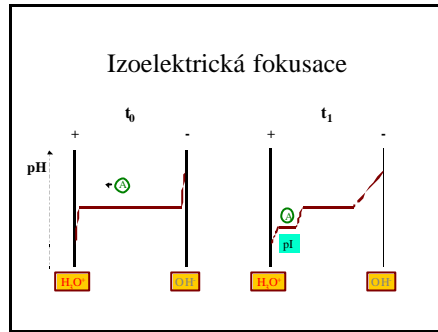


snímek 78

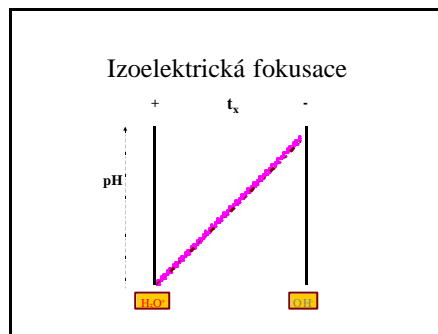
Izoelektrická fokusace

*„Elektroforéza v gradientu pH,
částice jsou separovány podle
svých pI“*

snímek 79



snímek 80



snímek 81

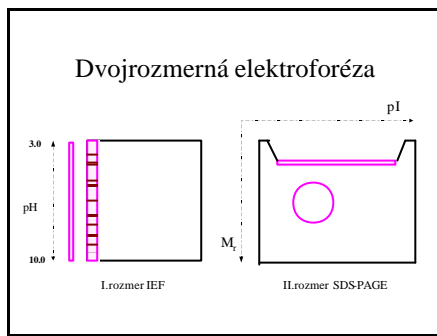
Izoelektrická fokusace analytická

- **Provedení** - v gelech – PAGE, agarosa
- **Použití** - sledování komplexních směsí
 - izoenzymové složení
 - stanovení pI – rozřezání a eluce
 - μ pH elektrody
 - pI standardy

snímek 82



snímek 83



snímek 84

