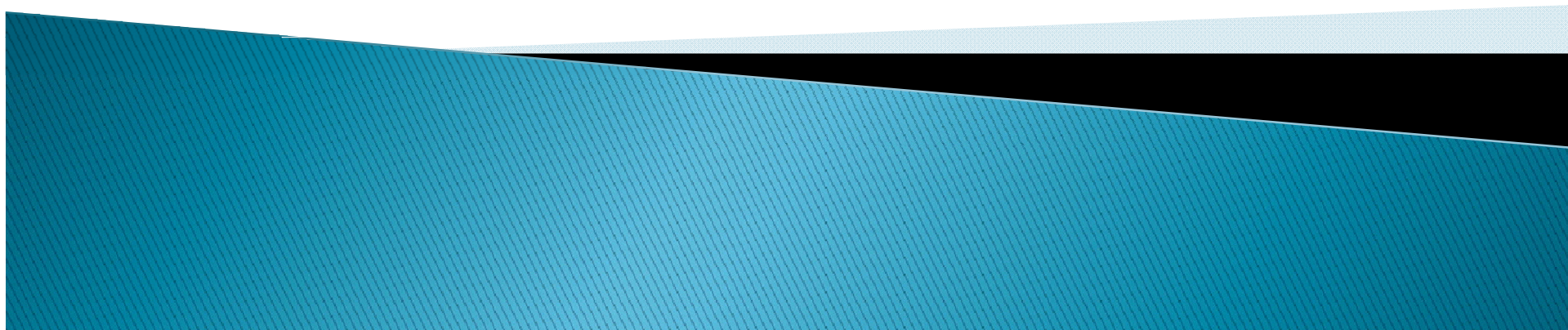


Studium proteinů v ekotoxikologii – II.

Pavel Babica



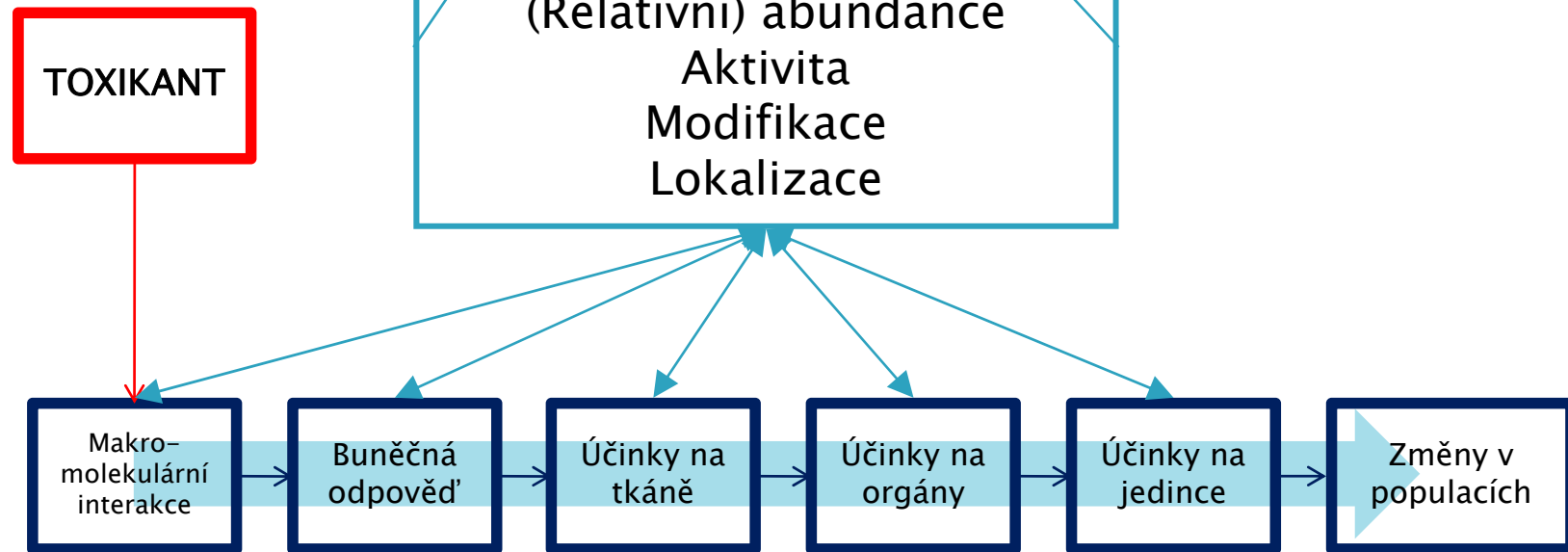
Detekce změn jednotlivých proteinů

- Metody cílené na konkrétní proteiny
- „*hypothesis-driven approach*“, *targeted analysis*
 - Stanovení aktivity specifických enzymů
 - Interakce ligand–receptor
 - Interakce antigen–protilátka
 - EIA / RIA / ELISA
 - Imunohistochemie /
Imunocytochemie (IHC/ICC)
 - Průtoková cytometrie (FCM)
 - Dot–blot, Western blot

- Identifikace a kvantifikace specifických změn napříč proteomem
- „*exploratory /discovery approach*“, „*omikový*“ přístup
 - Zpravidla separace zájmové frakce proteomu => snížení komplexity vzorku
 - Membránová, jaderná ...
 - Molekulová hmotnost, pI
 - Fosfoproteiny, glykoproteiny ...
 - Identifikace proteinů pomocí LC–MS metodou
Peptidové mapování nebo sekvenování

- Kombinace:
 - Imunokoprecipitace následovaná LC–MS identifikací
 - Vizualizace bandů nebo spotů v 1D/2D–gelu pomocí protilátek a následná identifikace pomocí LC–MS/MS
 - Proteinové microarrays

Metody studia proteinů

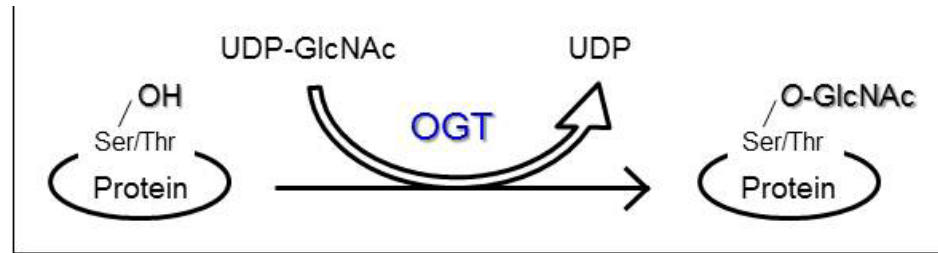


Enzymatická aktivita

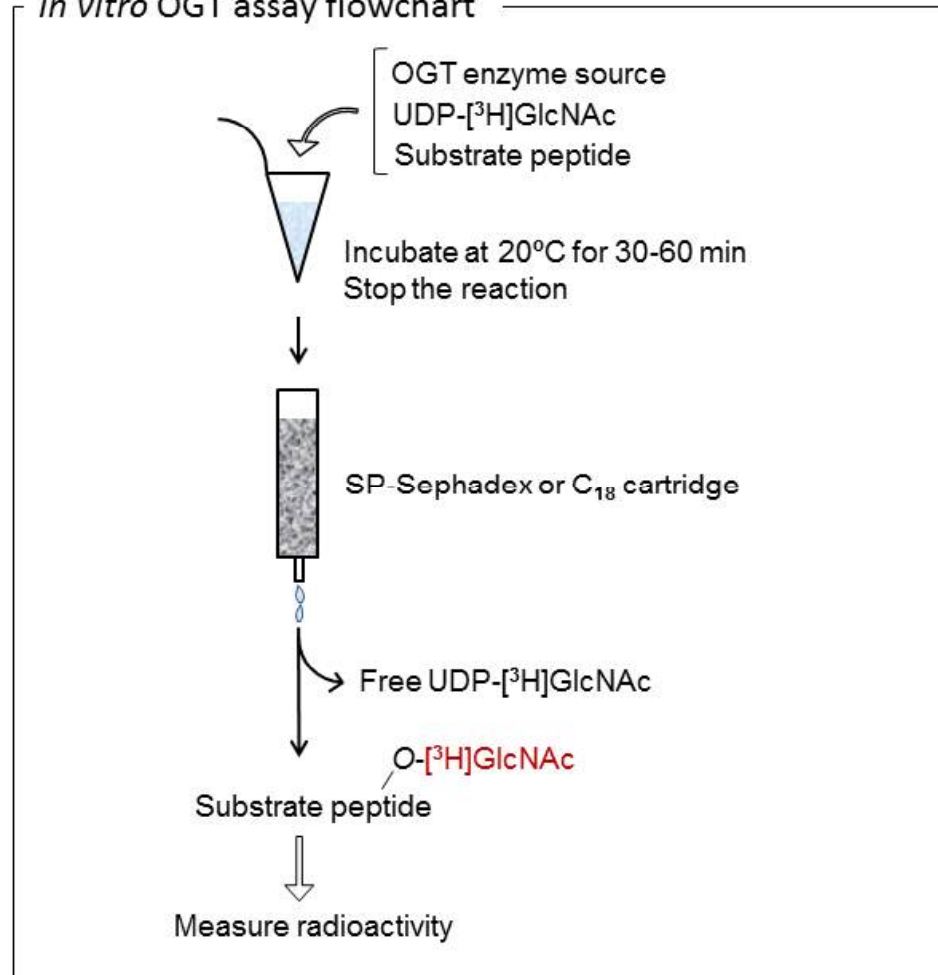
- ▶ Specifické interakce mezi enzymem a jeho substrátem
- ▶ Řada toxikantů působí **přímo nebo nepřímo** na aktivitu enzymů
- ▶ Typické uspořádání:
 - Tkáňová kultura *in vitro* nebo extrakt vzorku (tkáň, tkáňová kultura) obsahující **funkční enzym** ve vhodném reakčním pufru
 - Přídavek modelového „značeného“ substrátu
 - Enzymatickou konverzí substrátu činností zájmového enzymu (někdy několikastupňovou) dochází ke vzniku:
 - Barevného produktu => *spektrofotometr*
 - Fluorescenčního produktu (fluorogenní reakce) => *fluorimetr (fl. mikroskop)*
 - Chemi- nebo bio-luminiscenční reakce => *luminometr*
 - Radioaktivně značeného produktu => *scintilační počítač*
(B-zářiče ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , G-zářiče ^{125}I)
 - Měření – spektrofotometrické, fluorescence, luminiscence, radioaktivita

Studium účinku chemických látek na aktivitu :
Metabolických enzymů (GAPDH, oxidázy)
Signálních enzymů (fosfolipázy, kinázy, fosfatázy...)
Biotransformačních enzymů (CYP450, UGT)
Antioxidačních enzymů (SOD, CAT, GR, GPx ...)
Kaspázy

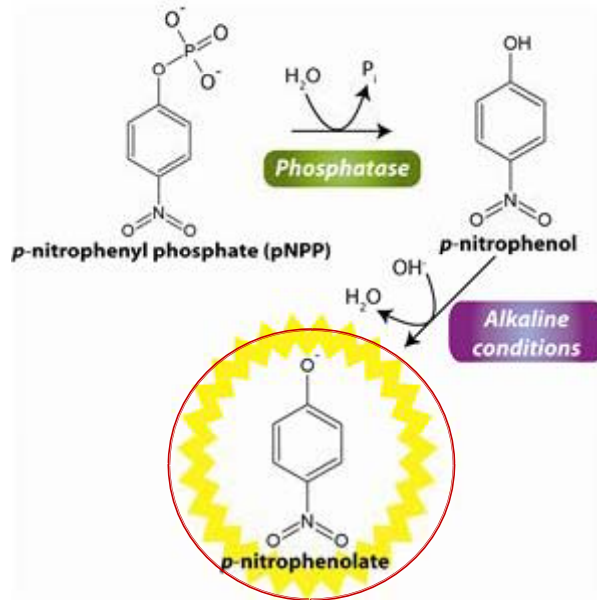
O-linked β -N-acetylglucosaminyltransferase



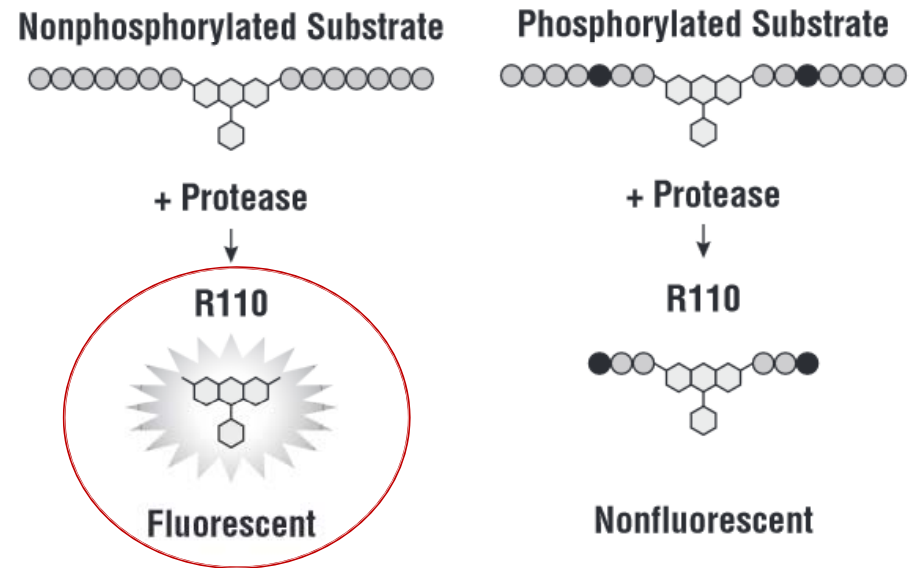
In vitro OGT assay flowchart



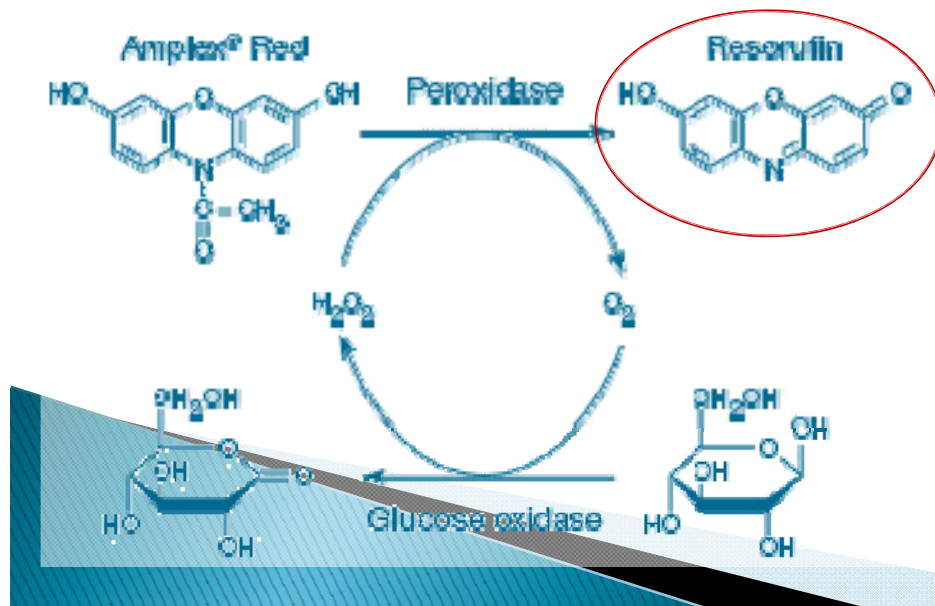
Proteinphosphatase



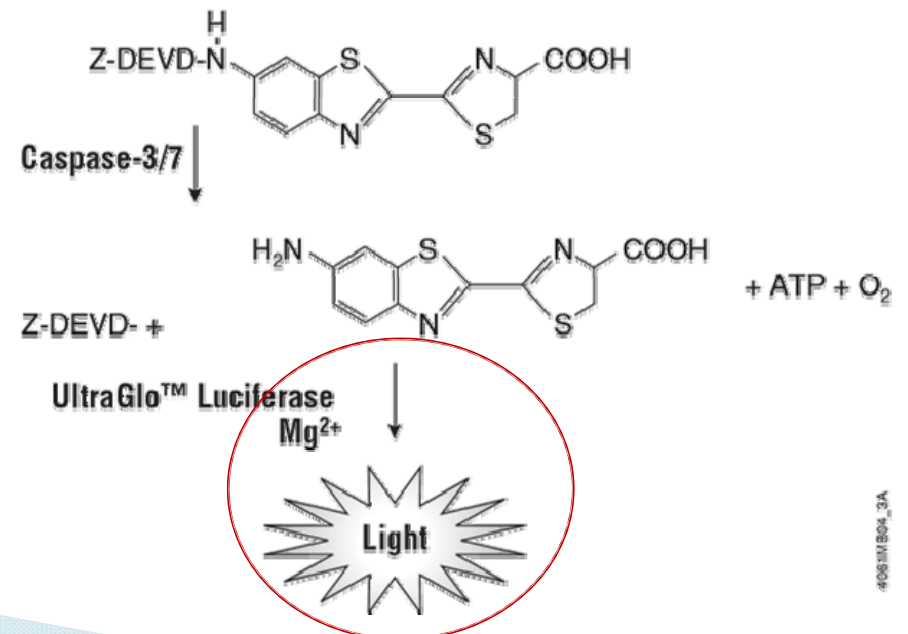
Proteinkinase A



Glucose oxidase

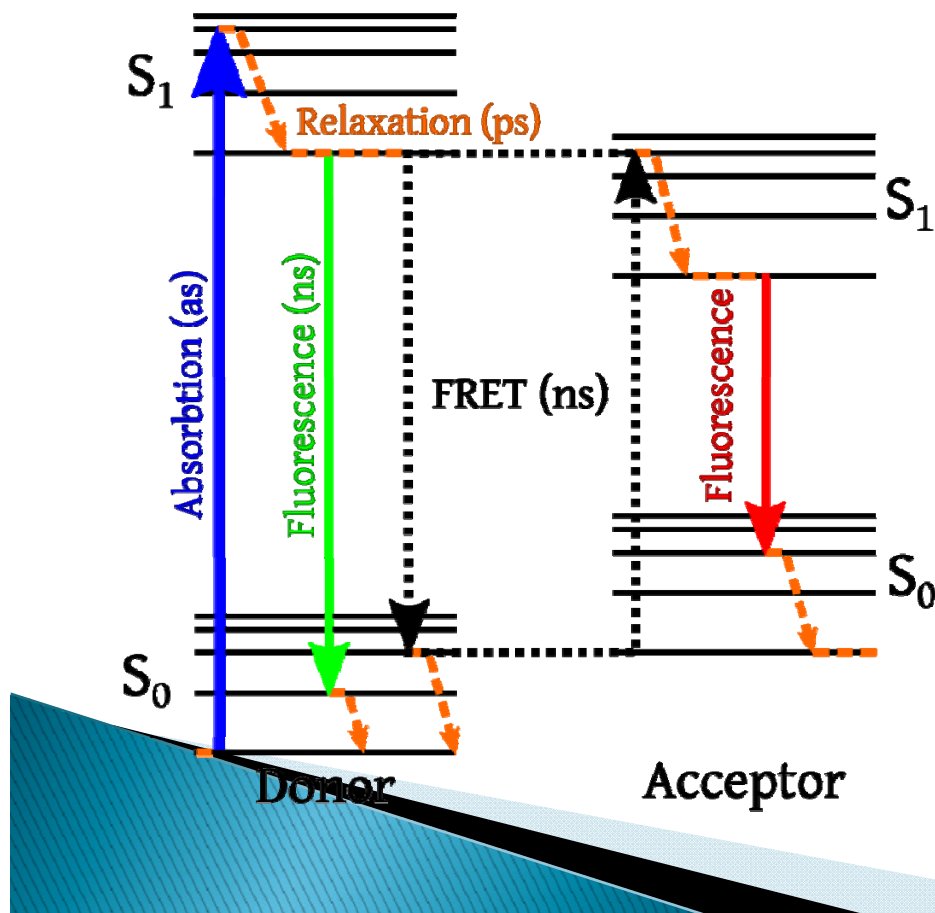


Caspase 3/7

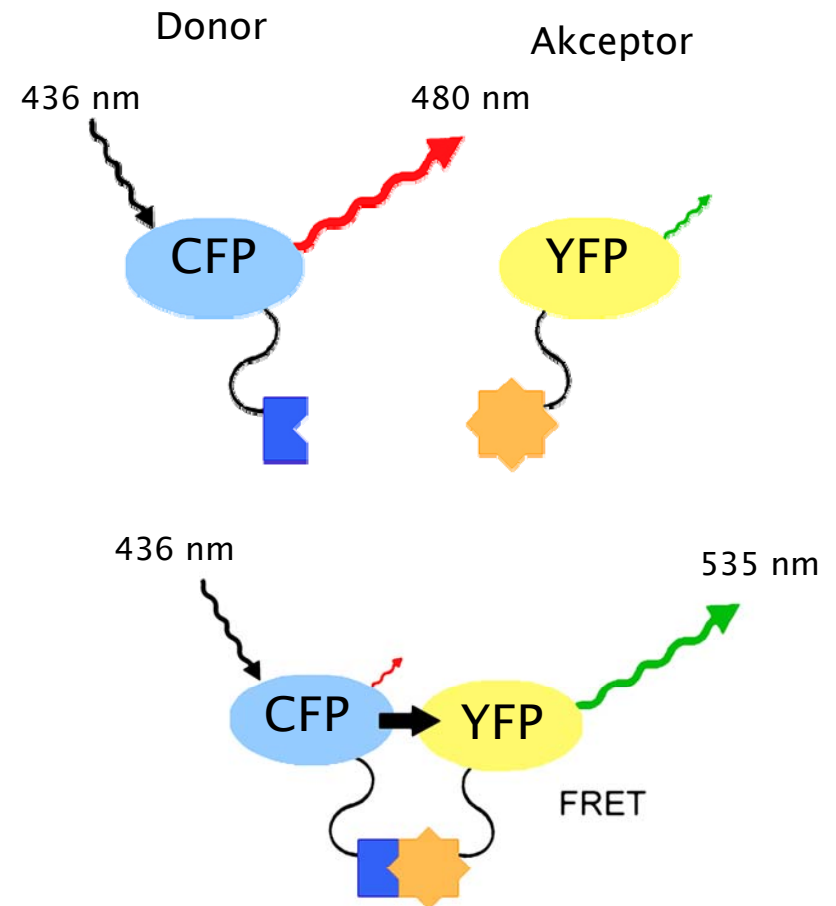


Fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET)

Foersterův přenos energie mezi dvěma fluorofory



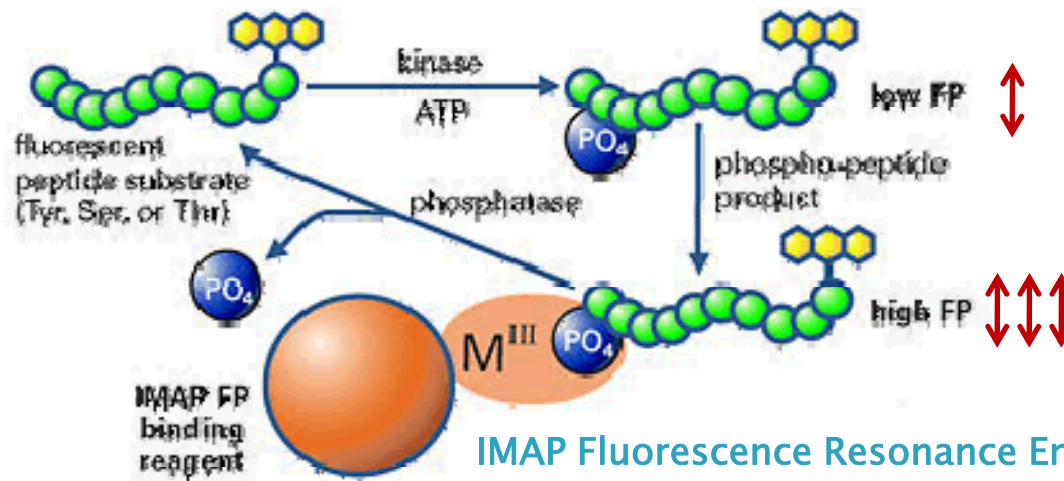
Příklad: FRET mezi Cyan Fluorescent Protein (CFP) a Yellow Fluorescent Protein (YFP)



Proteinkinázy a fosfatázy

- využití měření polarizace fluorescence (FP, fluorescence polarization) nebo **Fluorescenční (Foersterův) rezonančního přenosu energie (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer)**
- Příklad: IMAP (Immobilized Metal Ion Affinity-Based, Molecular Devices):
=> mikrodestičky se 107 substráty pro Ser/Thr kinázy a 57 substrátů pro Tyr-kinázy

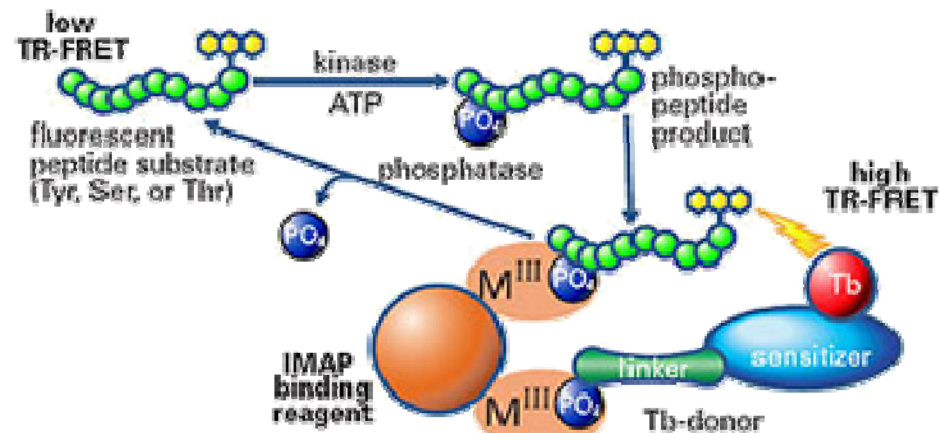
IMAP Fluorescence Polarization



Excitace polarizovaným světlem vede k emisi depolarizovaného světla v důsledku rychlé rotace volných molekul substrátu

Excitace polarizovaným světlem vede k emisi polarizovaného světla v důsledku zpomalení pohybu molekul substrátu vazbou na IMAP

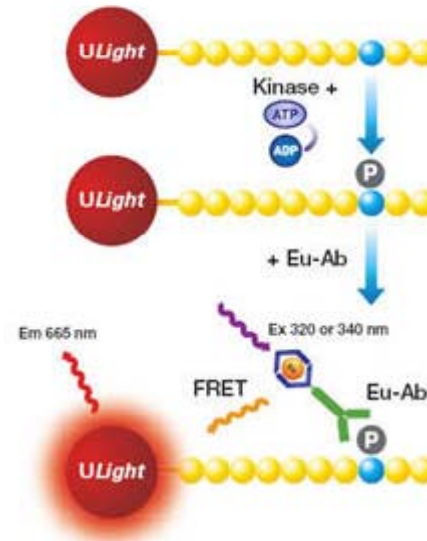
IMAP Fluorescence Resonance Energy Transfer



Kinázy

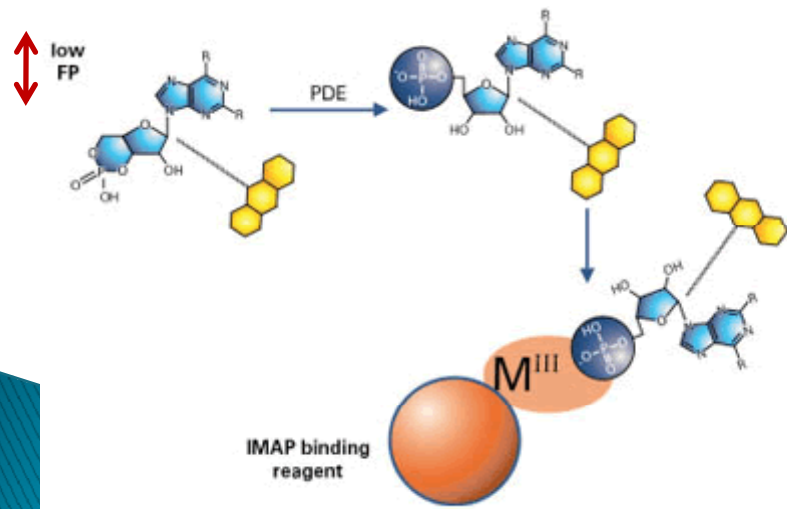
- Příklad: LANCE Ultra ULight (PerkinElmer) - sada substrátů specifických pro Ser/Thr kinázy a Tyr-kinázy

LANCE® Ultra ULight™-labeled

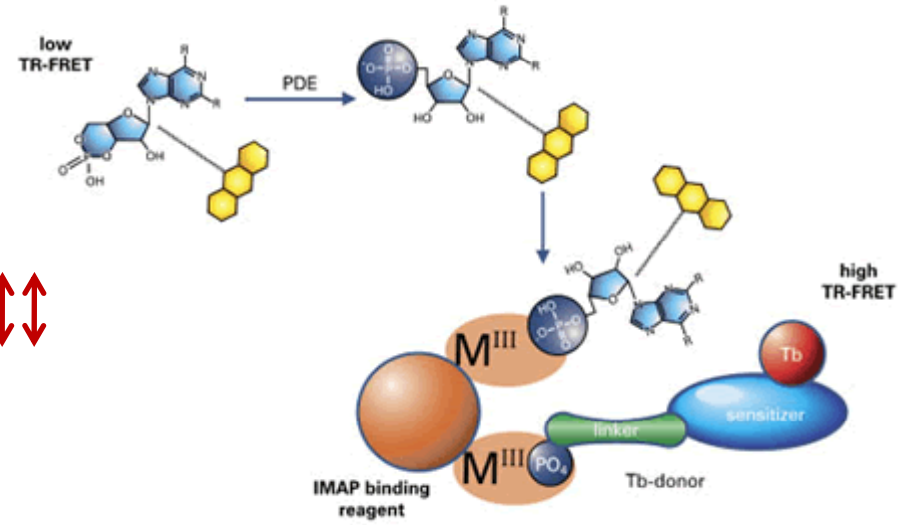


Fosfodiesterázy

IMAP Fluorescence Polarization



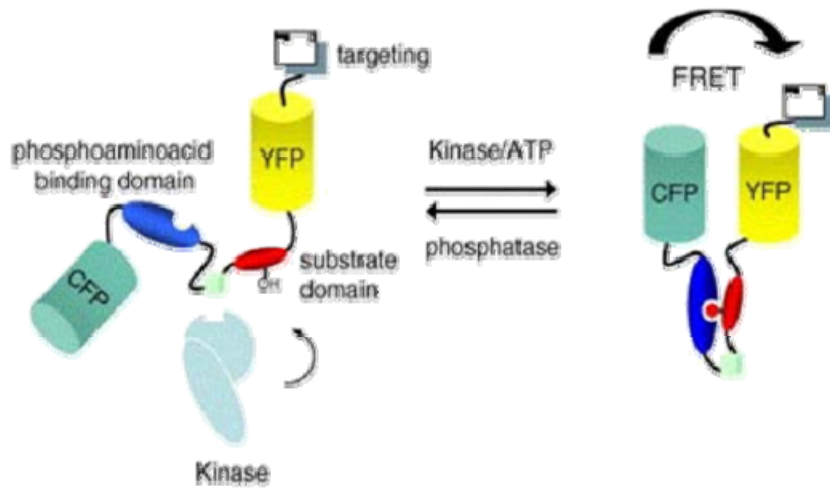
IMAP Fluorescence Resonance Energy Transfer



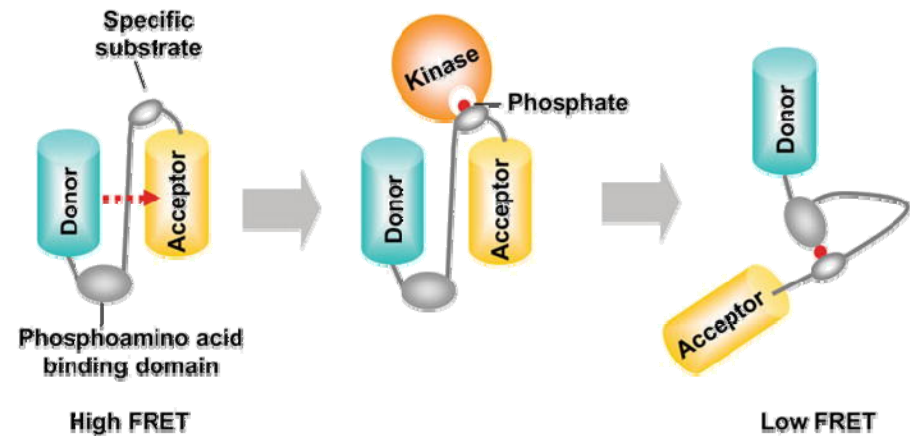
<http://www.perkinelmer.com/catalog/category/id/LANCE+Ultra>
<http://www.moleculardevices.com/reagents-supplies/assay-kits/enzymes/imap-assays>

FRET-sensory pro sledování aktivity kináz v živých buňkách

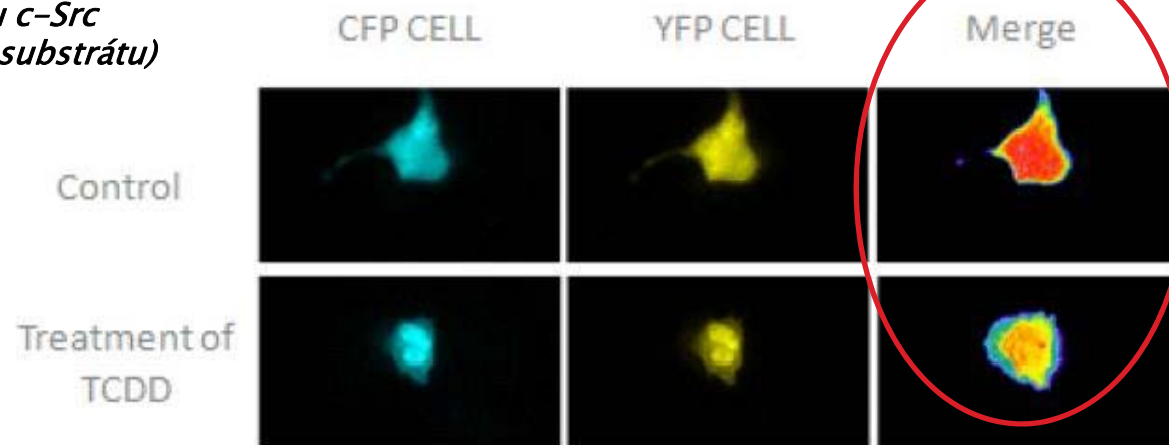
Příklad: Vznik FRET po fosforylaci



Příklad: Potlačení FRET po fosforylaci

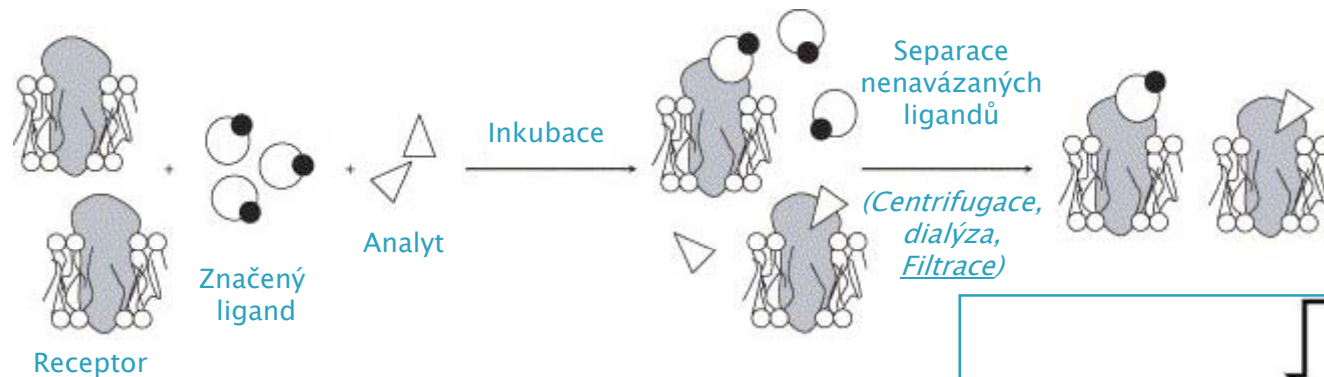


Příklad: Vliv TCDD na aktivitu c-Src (potlačení FRET modelového substrátu)

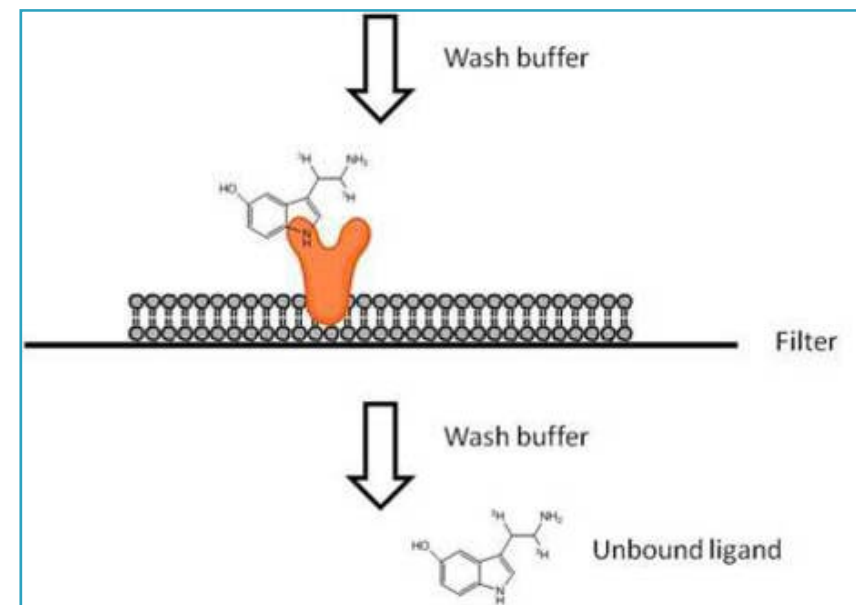


Ligand–vazebné testy

- ▶ Ligand–binding assay (LBA) – interakce mezi receptorem a ligandem
- ▶ Řada toxikantů působí jako agonisté nebo antagonisté receptorů (AhR, ER, AR, GR, PPAR, RXR/RAR...)
- ▶ **Radioaktivně značené ligandy:**



- ▶ Nejčastěji B–zářiče – detekováno v přítomnosti scintilačního koktejlu
- ▶ Nutná separace navázaných / volných ligandů (nejčastěji filtrace)
- ▶ Nebo receptor imobilizovaný na koloně (on–column), zrníčkách (on–beads), či přímo na filtru (Perkin Elmer)

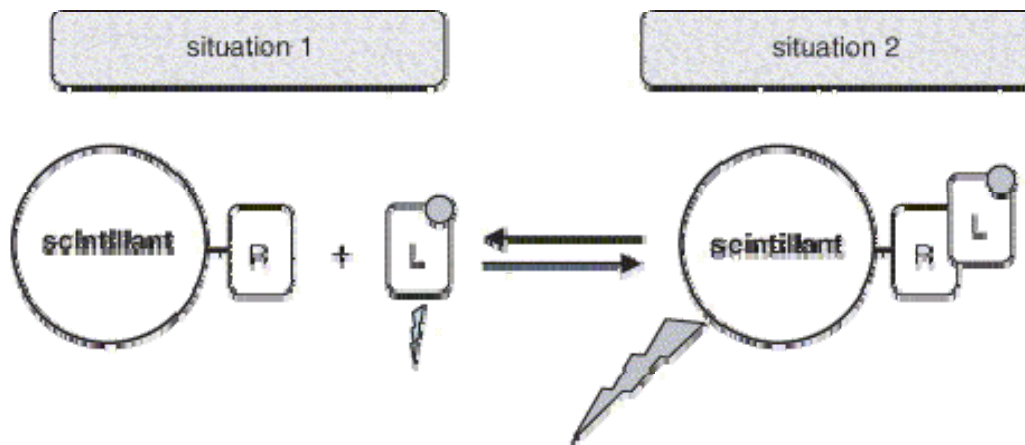


Ligand–vazebné testy

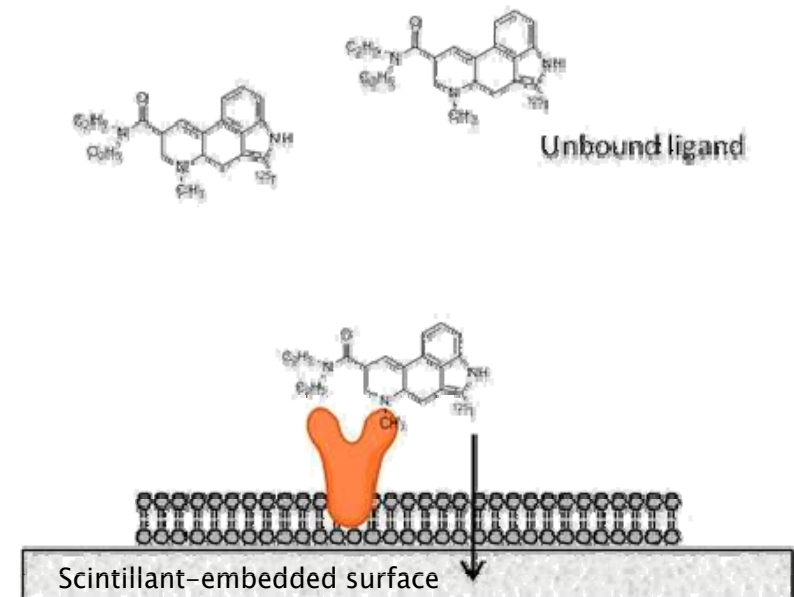
▶ Scintillation proximity assay

- ▶ Stimulace scintilantu po navázání radioaktivního ligandu
- ▶ Zvýšení citlivosti, odpadá nutnost separace nenavázných ligandů

Standard Assay

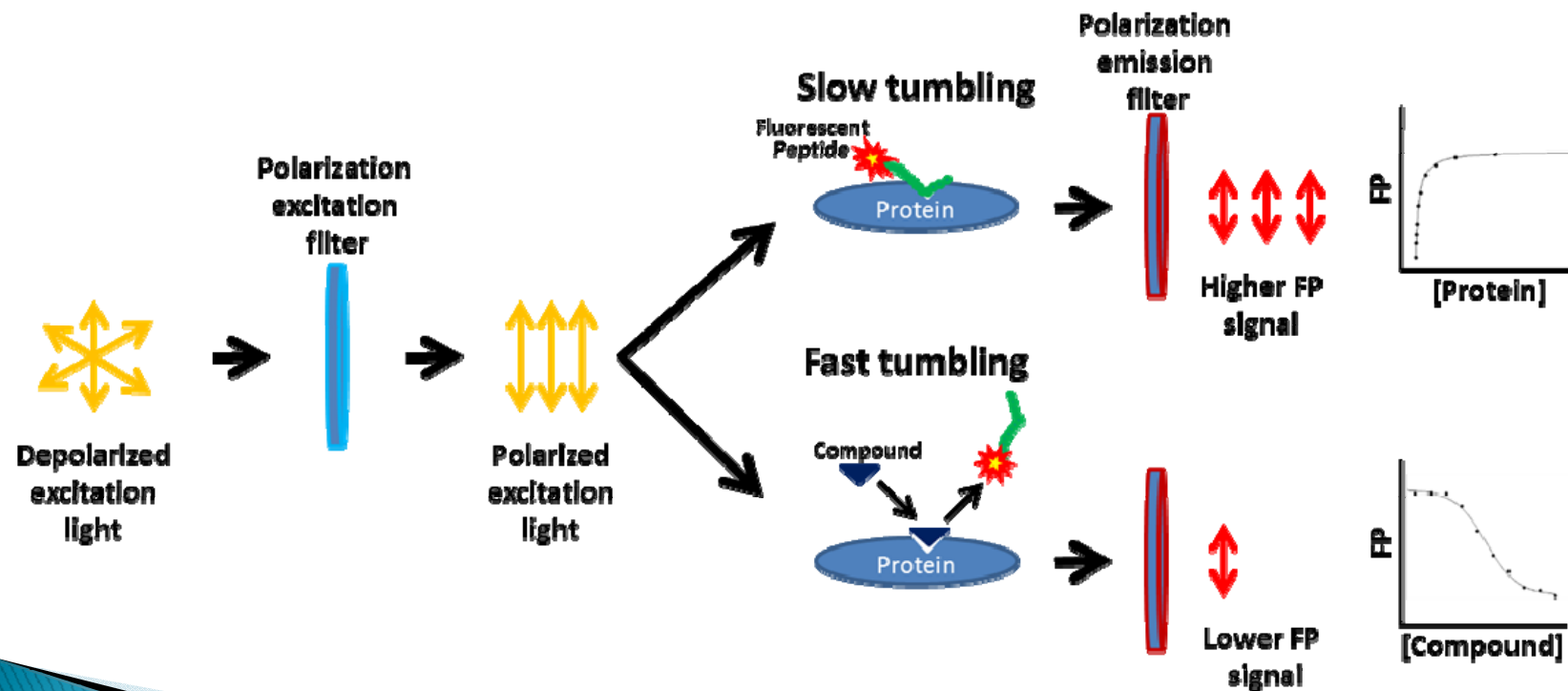


FlashPlate (PerkinElmer)



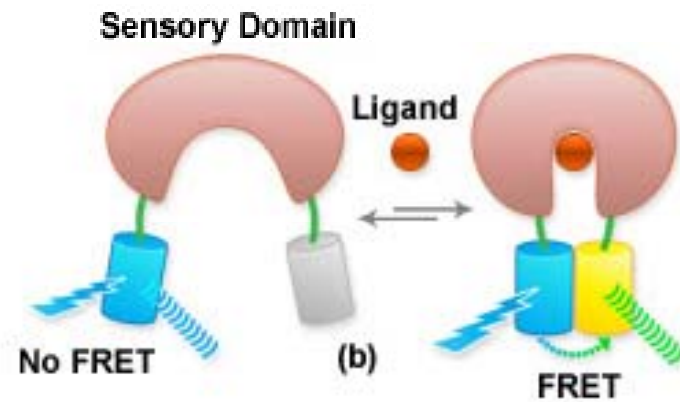
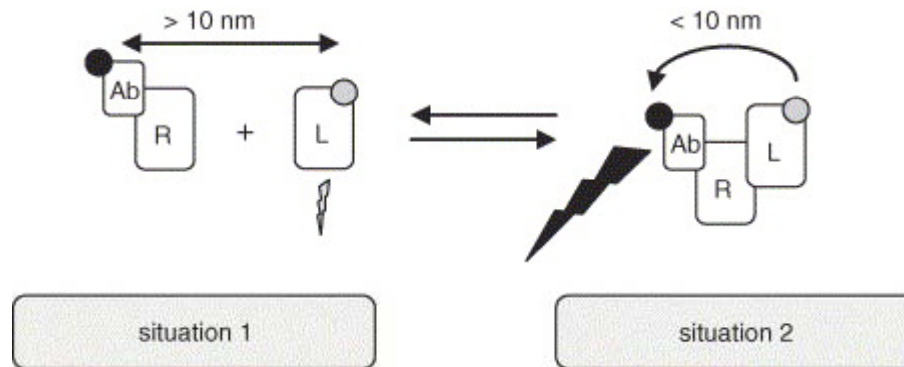
Ligand-vazebné testy

- ▶ Fluorescenčně značené ligandy
 - ▶ Nutná separace navázaných / volných ligandů
 - ▶ Odbourání tohoto kroku: využití FP nebo FRET
- ▶ Polarizace fluorescence (FP, fluorescence polarization)



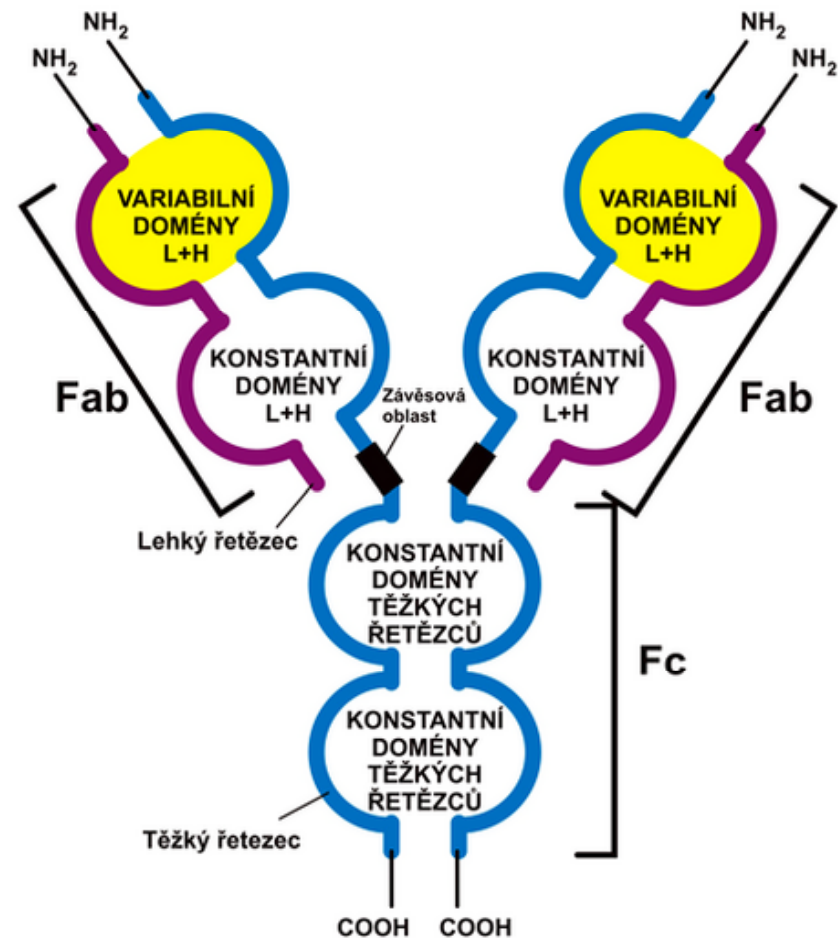
Ligand-vazebné testy

- ▶ Fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer)



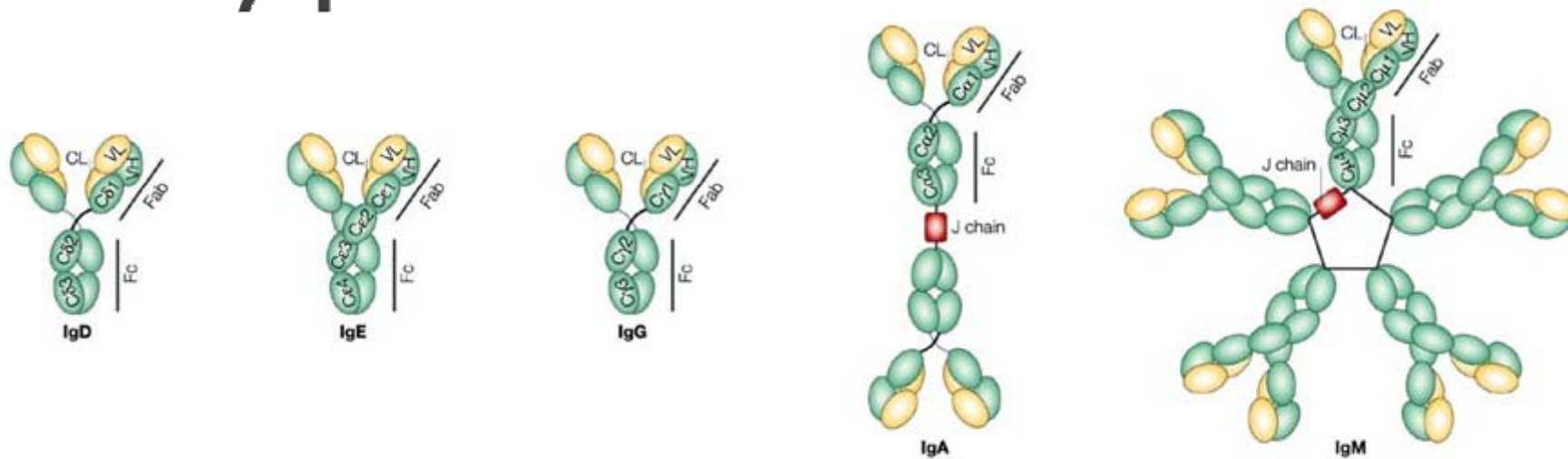
Metody založené na interakci protilátka–antigen

- Protilátky – imunoglobuliny
- Produkovány B–lymfocyty
- Třídy: IgA, IgD, IgG, IgE, IgM
- Lehký a těžký řetězec – Lc, Hc
- Variabilní doména = vazebné místo pro antigen
- **Antigen** = látka rozpoznávaná protilátkou (antibody generator)
- **Epitop** = specifický povrchový rys antigenu rozpoznávaný protilátkou
- **Hapten** = malá molekula, která vyvolá antigenní odpověď jen po navázání na makromolekulární (neimunogenní) nosič
- SPECIFICITA & AFINITA
- Produkci specifických protilátek lze vyvolat imunizací laboratorních zvířat příslušným antigenem (haptenem) – nejčastěji se používá *králík, myš, koza, ovce, ošel.*

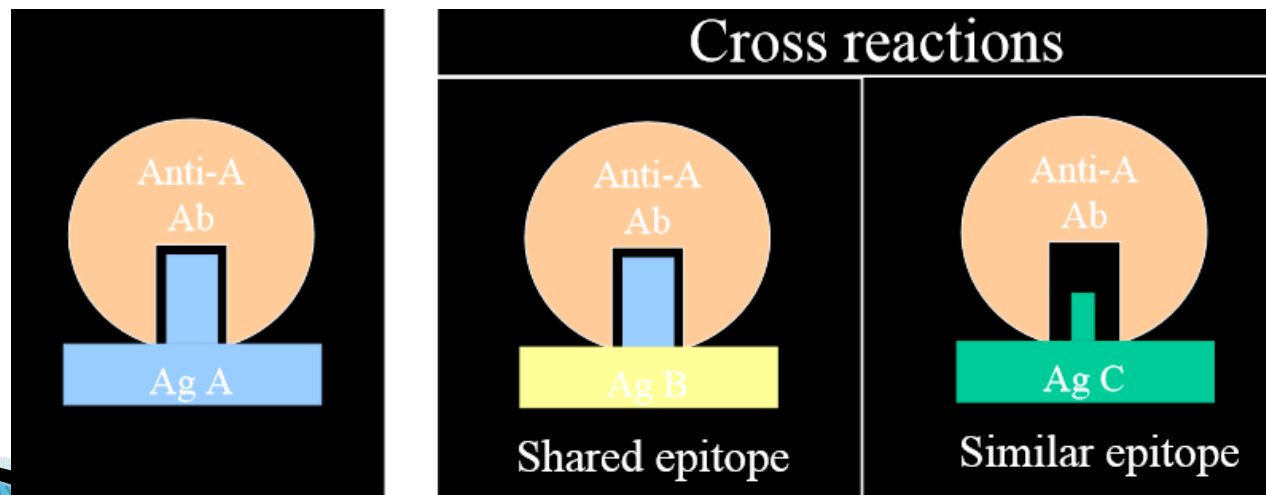


STRUKTURA MONOMERU IMUNOGLOBULINU

Třídy protilátek

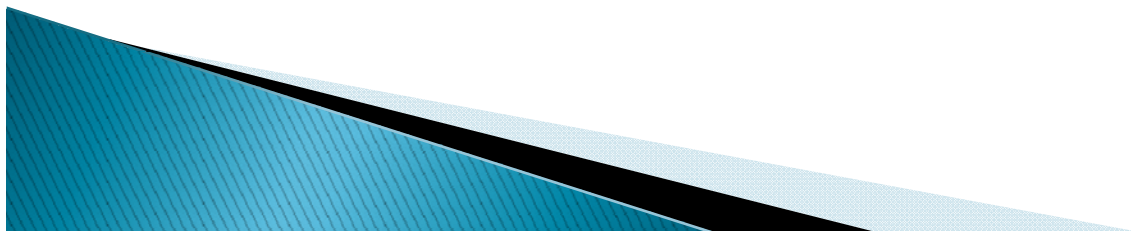


Křížová reaktivita



- ▶ **Proteiny jsou imunogeny => Lze vytvořit protilátky rozpoznávající specifické proteiny nebo specifické modifikace proteinů**

- ▶ **Lze vytvořit protilátky rozpoznávající malé sekundární metabolity**
=> nepřímé studium/hodnocení enzymatické aktivity (např. kvantifikace cAMP pro hodnocení aktivity proteinkinasy A)



Stanovení proteinů pomocí protilátek

➤ Polyklonální protilátky

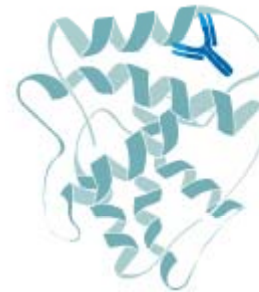
- Produkty různých klonů B-lymfocytů
- Směs protilátek rozpoznávajících **stejný antigen**, ale různé strukturní varianty (epitopy)
- Izolovány a purifikovány ze séra imunizovaných zvířat, levnější a rychlejší výroba, méně náročná technologie
- Tolerantnější k variabilitě antigenu, větší pravděpodobnost mezidruhové křížové reaktivity
- Vhodnější pro imunoprecipitace
- Robustnější odpověď
- Větší variabilita šarží

➤ Monoklonální protilátky

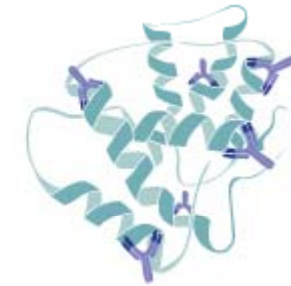
- Produkty stejného klonu B-lymfocytu
- Zcela identické vazebné místo, na antigenu rozpoznávají **tentýž epitop**
- Lze je produkovat *in vitro* hybridomovou metodou (-> nejčastěji myši), nákladné a náročné
- Menší pozadí a menší míra nespecifických reakcí a křížových reakcí
- Lepší reprodukovatelnost, menší variabilita
- Náchylné na nepatrné změny epitopu, mohou být druhově velmi specifické

Monoklonální vs. Polyklonální

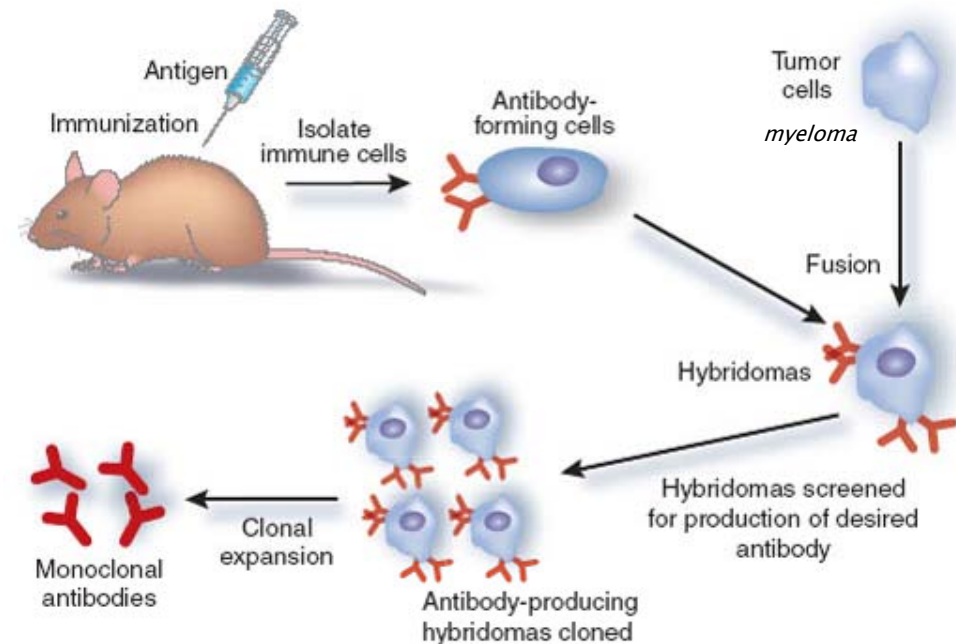
Monoclonal Antibody Binding



Polyclonal Antibody Binding



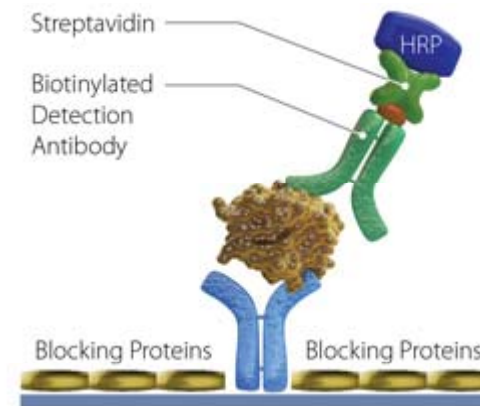
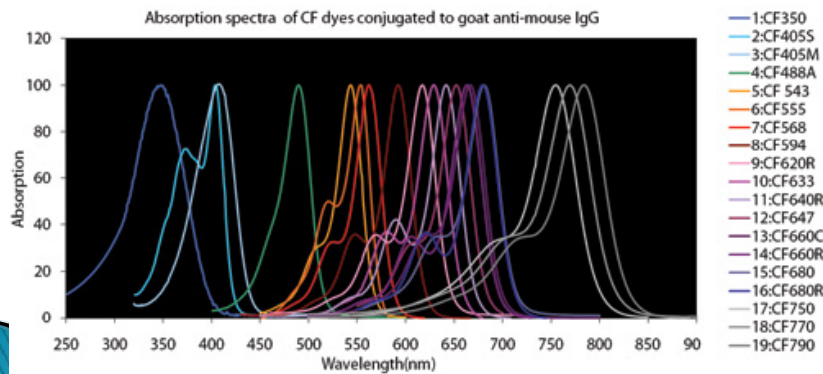
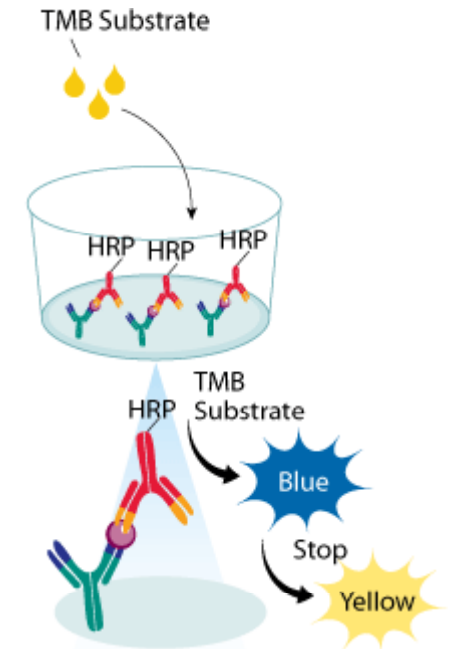
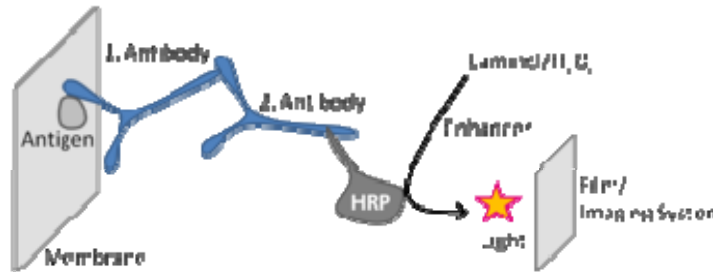
Produkce monoklonálních protilátek



Stanovení proteinů pomocí protilátek

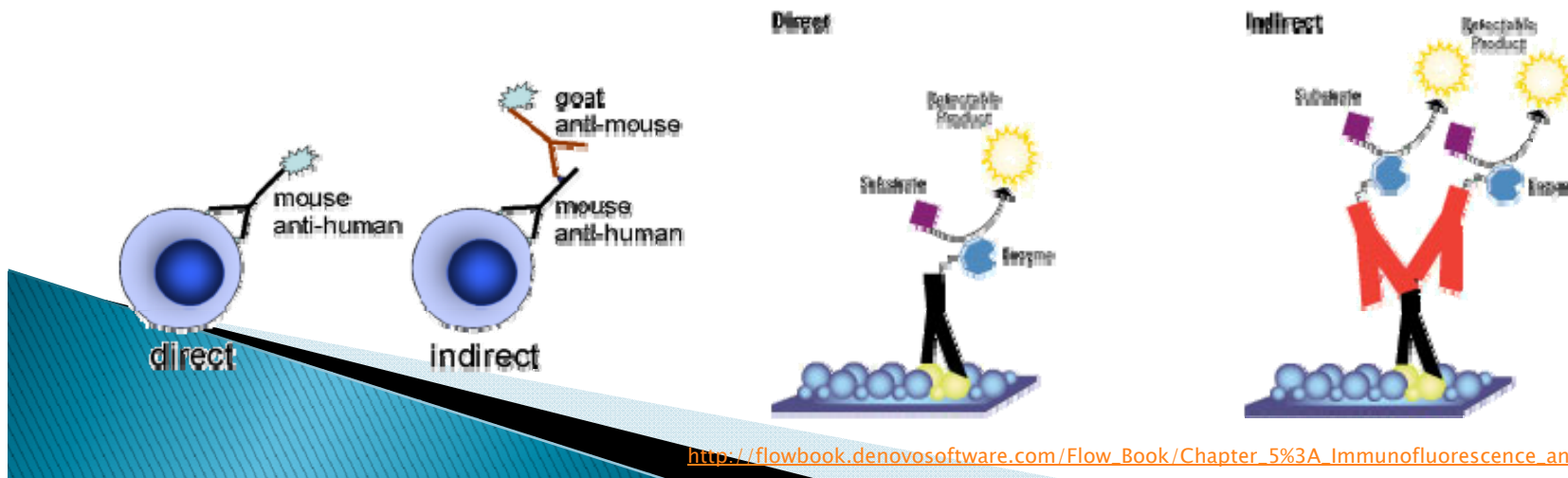
➤ Značení pro detekci / vizualizaci protilátek

- Radioaktivní
- Enzymatické
 - Křenová peroxidáza
 - Alkalická fosfatáza
- Fluorescenční
 - AlexaFluor, CF™, Fykoerythrin, Allo-phycocyanin, FITC, Cy3, Cy5 ...
- Biotinylace
 - Tvorba komplexů Strept-/Neutr-/Avidin & biotinu



Stanovení proteinů pomocí protilátek

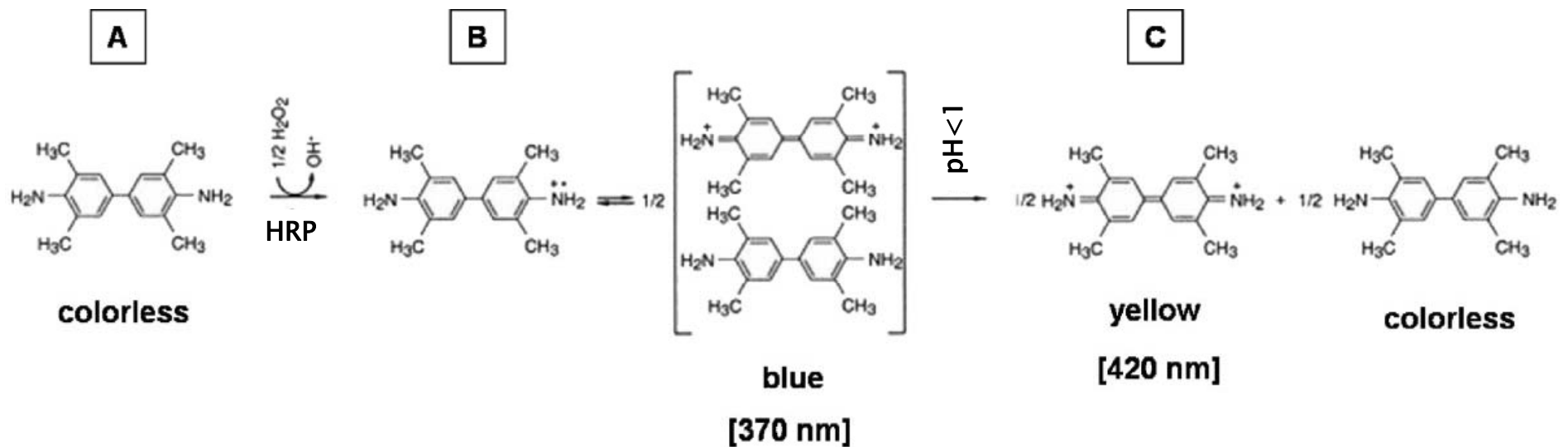
- **Přímá detekce** – značená primární protilátka
 - **Nepřímá detekce pomocí sekundární protilátky**
 - Primární neznačená protilátka rozpoznává požadovaný antigen
 - *Např. monoklonální myší IgG protilátka proti tubulinu*
 - Sekundární značená protilátka rozpoznává primární protilátku (zpravidla Fc fragment IgG daného druhu)
 - *Např. HRP konjugovaná polyklonální kozí IgG protilátka rozpoznávající myší Fc-IgG*
- ⇒ Amplifikace signálu, odpadá nutnost značit každou primární protilátku
- ⇒ Další amplifikace možné např. použitím komplexů avidin-biotin



▶ Křenová peroxidáza (horse-radish peroxidase, HRP)

Chromogenní substráty – rozpustné:

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

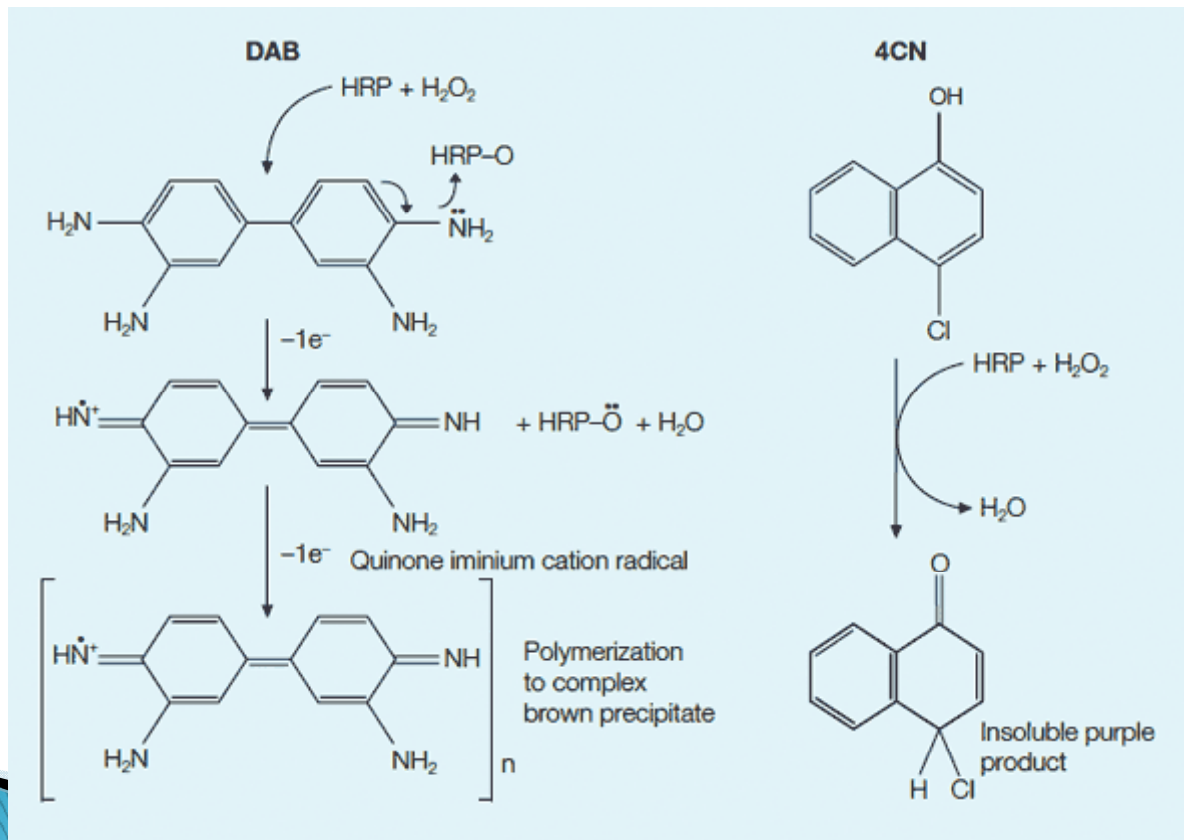


► Křenová peroxidáza (horse-radish peroxidase, HRP)

Chromogenní substráty – nerozpustné:

3,3'-Diaminobeznidin

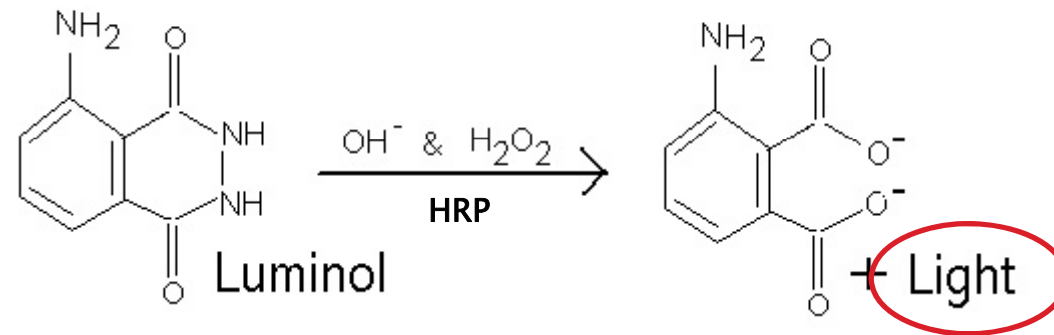
4-Chloro-1-naphthol



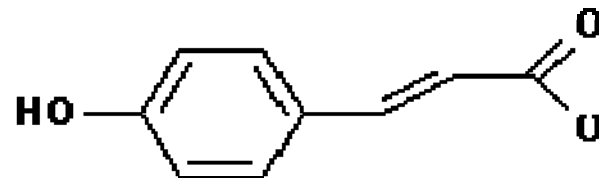
▶ Křenová peroxidáza (horse-radish peroxidase, HRP)

Chemiluminiscenční reakce:

Luminol



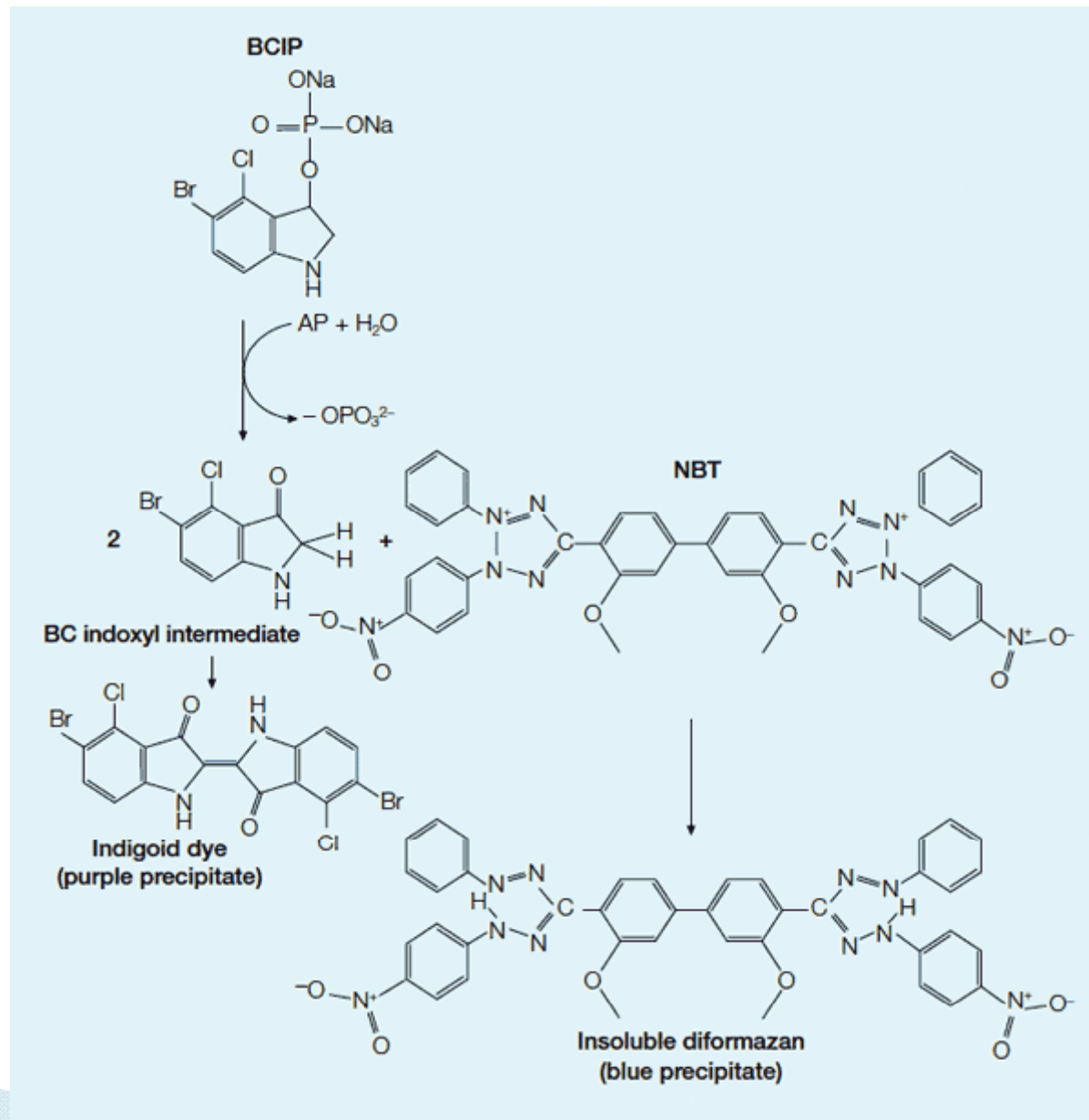
Intenzita a doba trvání luminiscence je znásobena v přítomnosti p-kumarátu => Enhanced ChemiLuminiscence, ECL



▶ Alkalická fosfatáza (AP, alkaline phosphatase)

Chromogenní reakce:

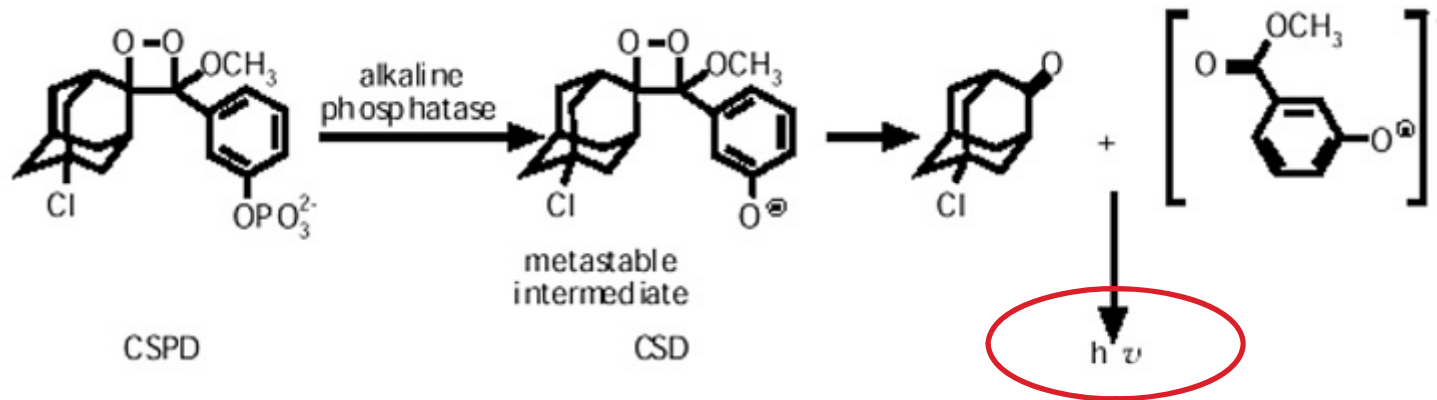
- *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)* a *nitroblue tetrazolium (NBT)* (NBT)



▶ Alkalická fosfatáza (AP, alkaline phosphatase)

Chemiluminiscenční reakce:

- CSPD®



► Fluorescenční značení

Dye	Excitation wavelength	Emission wavelength	Excitation laser lines (nm)	Fluorescence Channel
Methoxycoumarin	360	410		
DyLight® 405	400	420		
HiLyte Fluor™ 405	404	428		
DyLight® 350	353	432		
Aminocoumarin	350	445		
Pacific blue™	404	456	360,405,407	FL1,FL6
EviTag™ quantum dots-Lake Placid Blue	470	490		
Cy2®	489	506	488	
Chromeo™ 488	488	517		
DyLight® 488	493	518		
Alexa Fluor® 488	495	519	488	FL1,FL3,PM3
FAM	494	519		
Fluorescein Iso-thiocyanate (FITC)	495	519	488	FL1,FL3,PM3
EviTag™ quantum dots-Adirondack Green	505	520		
Chromeo™ 505	505	526		
HiLyte Fluor™ 488	501	527		
EviTag™ quantum dots-Catskill Green	525	540		
Alexa Fluor® 430	434	541		
Alexa Fluor® 532	532	554		
HEX	535	556		
EviTag™ quantum dots-Hops Yellow	545	560		
Chromeo™ 546	545	561		
Cy3®	548	561	488,514	FL2,FL4,PM1
Alexa Fluor® 555	555	565		
HiLyte Fluor™ 555	550	566		

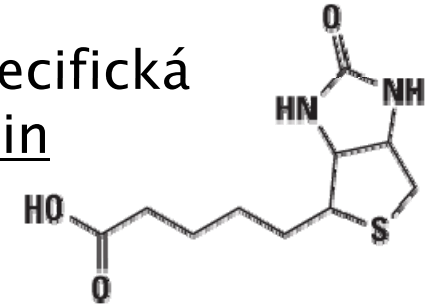
Dye	Excitation wavelength	Emission wavelength	Excitation laser lines (nm)	Fluorescence Channel
5-TAMRA	541	568		
Alexa Fluor® 546	556	573		
DyLight® 549	562	576		
Phycoerythrin (PE)	496,566	576	488	FL2,FL4,PM1
Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate (TRITC)	557	576		
EviTag™ quantum dots-Birch Yellow	560	580		
Cy3.5®	576	589	568,543	
Rhodamine Red-X	570	590		
PE-Dyomics® 590	488	599		
EviTag™ quantum dots-Fort Orange	585	600		
ROX	575	602		
Alexa Fluor® 568	578	603		
Red 613	480,565	613		
Texas Red®	595	613	568,543,514	
HiLyte Fluor™ 594	593	616		
PE-Texas Red®	566	616		
Alexa Fluor® 594	590	617		
DyLight® 594	593	618		
EviTag™ quantum dots-Maple-Red Orange	600	620		
Chromeo™ 494	494	628		
Alexa Fluor® 633	632	647		
SureLight® APC	652	657		
DyLight® 633	638	658		
Allophycocyanin (APC)	650	660	595,633,635,647	FL4,FL7,FL8
Chromeo™ 642	642	660		
Quantum Red	488	660		
SureLight® P3	614	662		
Alexa Fluor® 647	650	665	595,633,635,647	FL4,FL7,FL8

Dye	Excitation wavelength	Emission wavelength	Excitation laser lines (nm)	Fluorescence Channel
Alexa Fluor® 647	650	665	595,633,635,647	FL4,FL7,FL8
Cy5®	647	665	633,635	FL4,FL8
PE-Cy5®	565	666	488	FL3,FL4,FL6,PM2
SureLight® P1	545	666		
PE-Alexa Fluor® 647	567	669		
PE-Dyomics® 647	488	672		
DyLight® 649	654	673		
HiLyte Fluor™ 647	650	675		
Peridinin Chlorophyll (PerCP)	477	678	488	FL3,FL4,FL6,PM2
IRDye® 700DX	680	687		
Alexa Fluor® 660	663	690		
PE-Cy5.5®	565	693	488	FL3,FL4,FL6,PM2
APC-Cy5.5®	650	694	595,633,635,647	FL3,FL4,FL7
Cy5.5®	675	694	647	
TruRed	490,675	695		
HiLyte Fluor™ 680	678	699		
Alexa Fluor® 680	679	702		
DyLight® 680	692	712		
APC-Cy7®	650	774	595,633,635,647	FL5,FL8,FL9
Cy7®	753	775		
PE-Dyomics® 747	488	776		
DyLight® 750	752	778		
HiLyte Fluor™ 750	753	778		
PE-Cy7®	566	778	488	FL3,FL5,PM4
IRDye® 800RS	770	786		
DyLight® 800	777	794		
IRDye® 800CW	778	794		

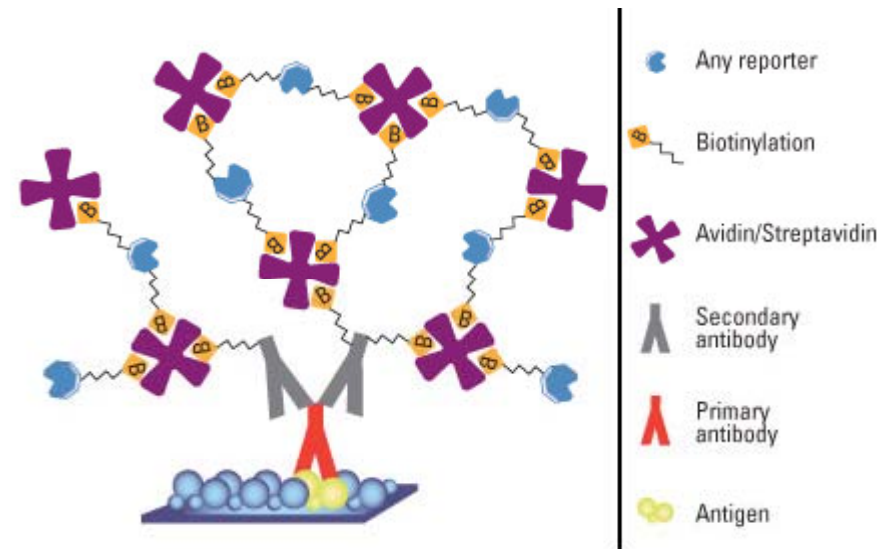
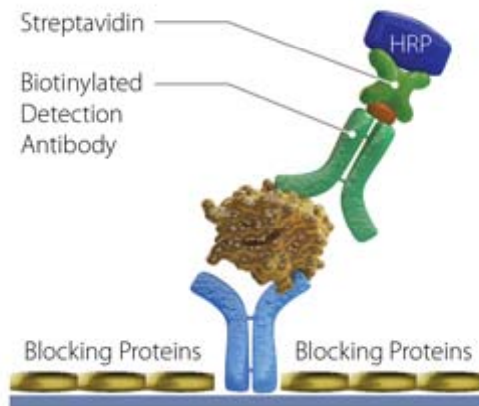
Avidin–Biotin Komplexy

- ▶ **Avidin**
(*ptáci, obojživelníci a plazi*)
- ▶ **NeutrAvidin**
(*deglykosylovaný avidin*)
- ▶ **Streptavidin**
(*Streptomyces*)

=> Silná a vysoce specifická vazba na biotin



- ⇒ Biotinylovaná sekundární protilátka + konjugát avidin–HRP
- ⇒ Biotinylovaná sekundární protilátka + biotinylovaná HRP + avidin



Zdroje protilátek:

Důležité charakteristiky

- ▶ Typ protilátky
- ▶ Značená / neznačená
- ▶ Zdrojový organismus
- ▶ Monoklonální vs. Polyklonální
- ▶ Typ (IgG, IgM...)
- ▶ Rozpoznávaný antigen (protein) a jeho MW
 - Nativní / denaturovaný protein
 - PTM? (detekce specifických fosfomíst)
- ▶ Aplikace
 - ELISA, IP, Western blot, ICC / IHC, FCM
- ▶ Mezydruhová křížová reaktivita
- ▶ Skladování! (4C nebo -20C)
- ▶ Množství & doporučená ředění

<http://www.abcam.com/>

<http://www.abnova.com/>

<http://www.bdbiosciences.com>

<http://www.cellsignal.com/>

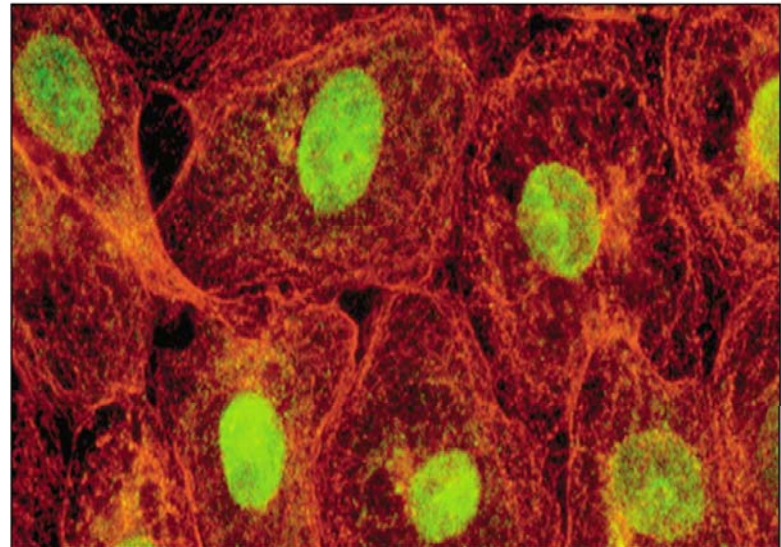
<http://www.lifetechnologies.com>

<http://www.merckmillipore.com>

<http://www.sigmaaldrich.com>

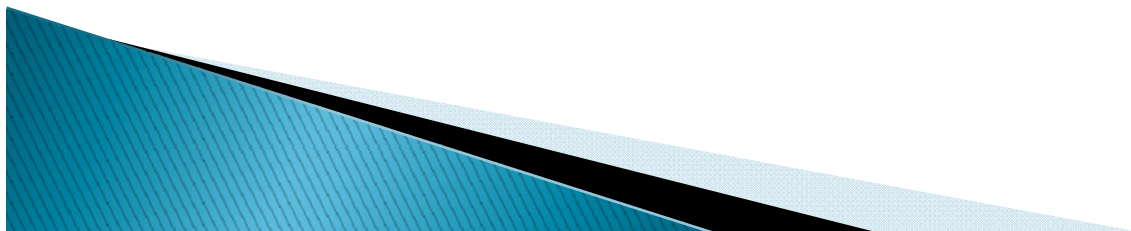
[http://www.scbt.com/...](http://www.scbt.com/)

<http://biocompare.com>



Detekce proteinů pomocí protilátek – reakce s v roztoku

- Radioimunoanalýza (RIA)
- Fluorescenční imunoanalýza (FIA)
- Enzyimoimunoanalýza EIA/ELISA



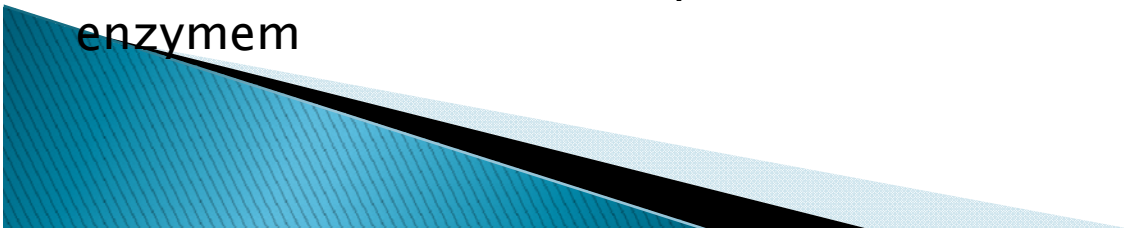
Různá uspořádání:

- Heterogenní vs. Homogenní – vyžadují vs. nevyžadují separaci komplexu Protilátka–Antigen
- Kompetitivní vs. Nekompetitivní
- Soupeření značeného a neznačeného antigenu (protilátky) o vazbu na protilátku (antigen) vs. Bez přídavku kompetujícího antigenu (protilátky)
- Přímá vs. Nepřímá
- Detekce značenou primární vs. Detekce značenou sekundární

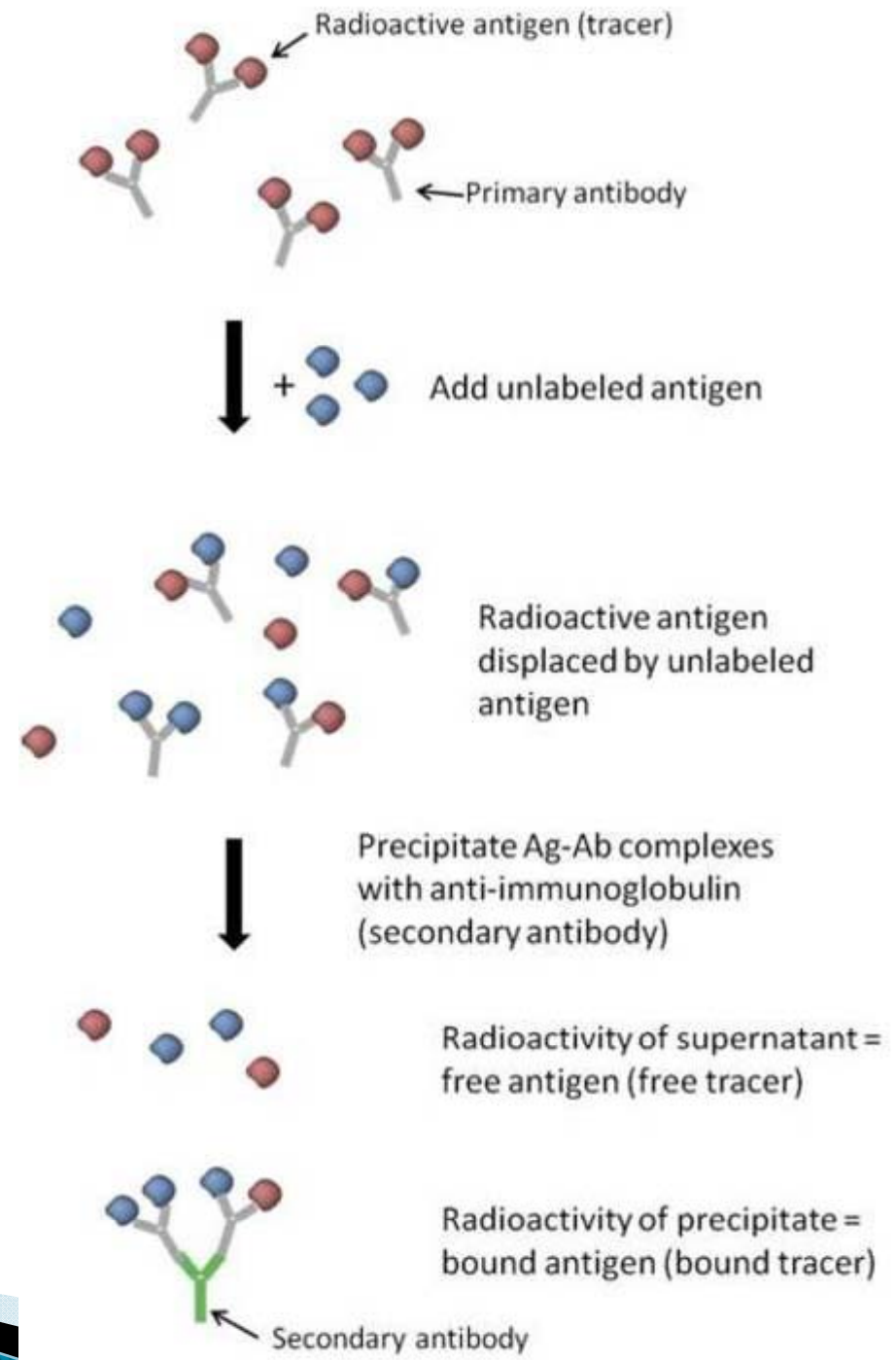
Immunostanovení (RIA, FIA, EIA ...) tradičně prováděny v roztoku

ELISA – Enzyme–Linked ImmunoSorbent Analysis

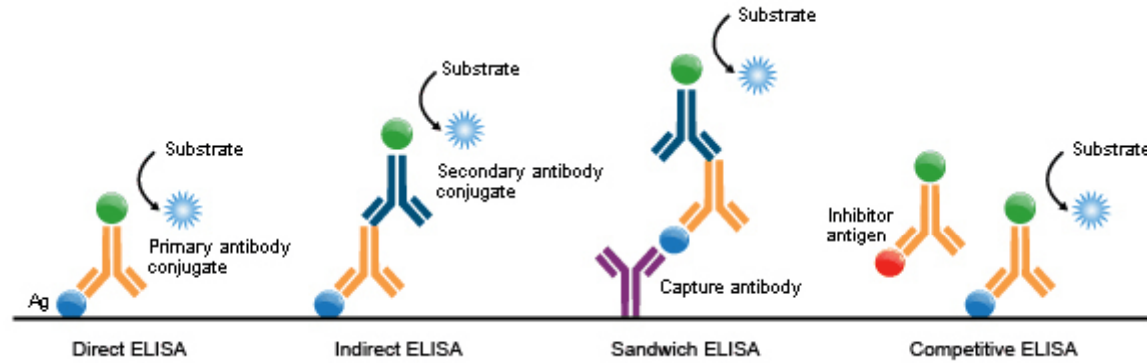
- Imobilizace protilátek nebo antigenu na pevný povrch
- Generalizace termínu – protilátka v ELISA nemusí být nutně značena enzymem



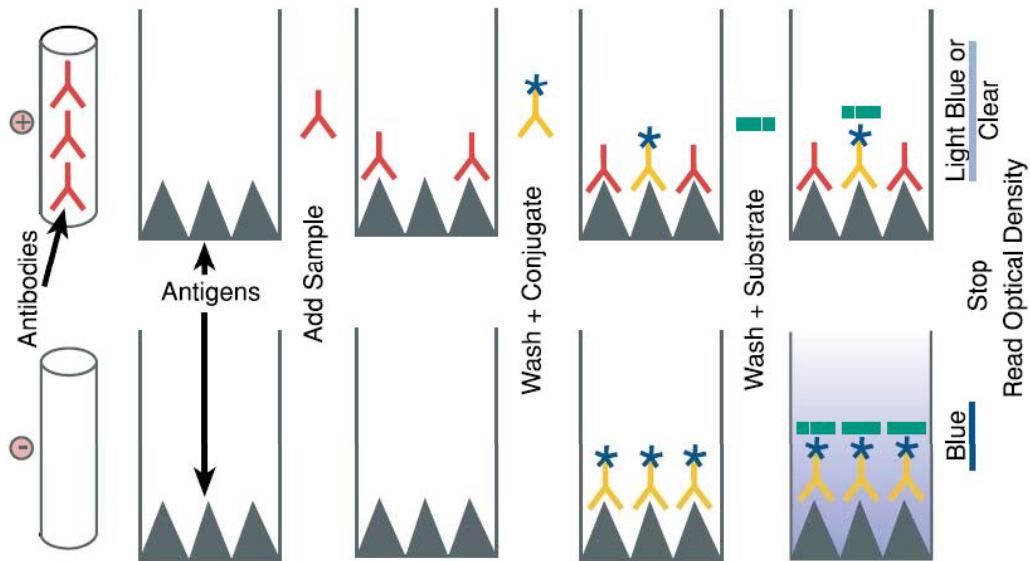
Kompetitivní radioimunoanalýza



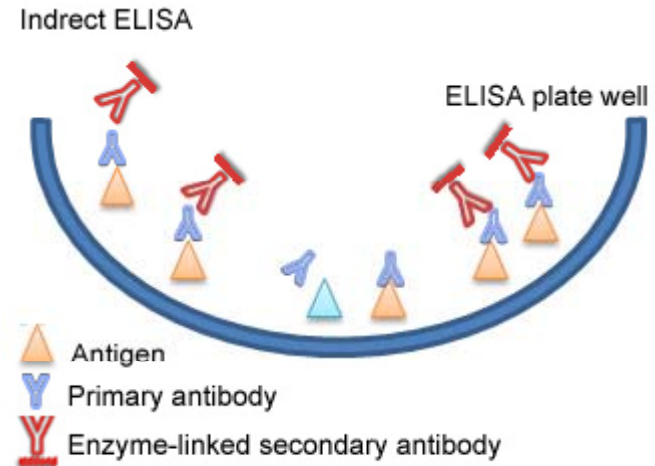
Formáty ELISA



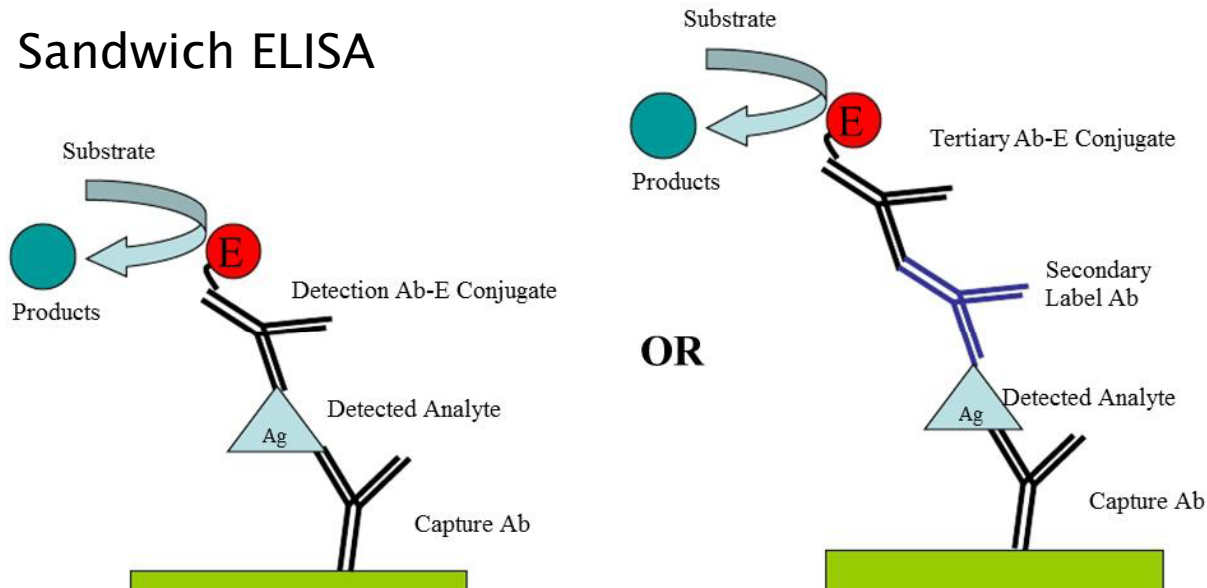
Direct ELISA



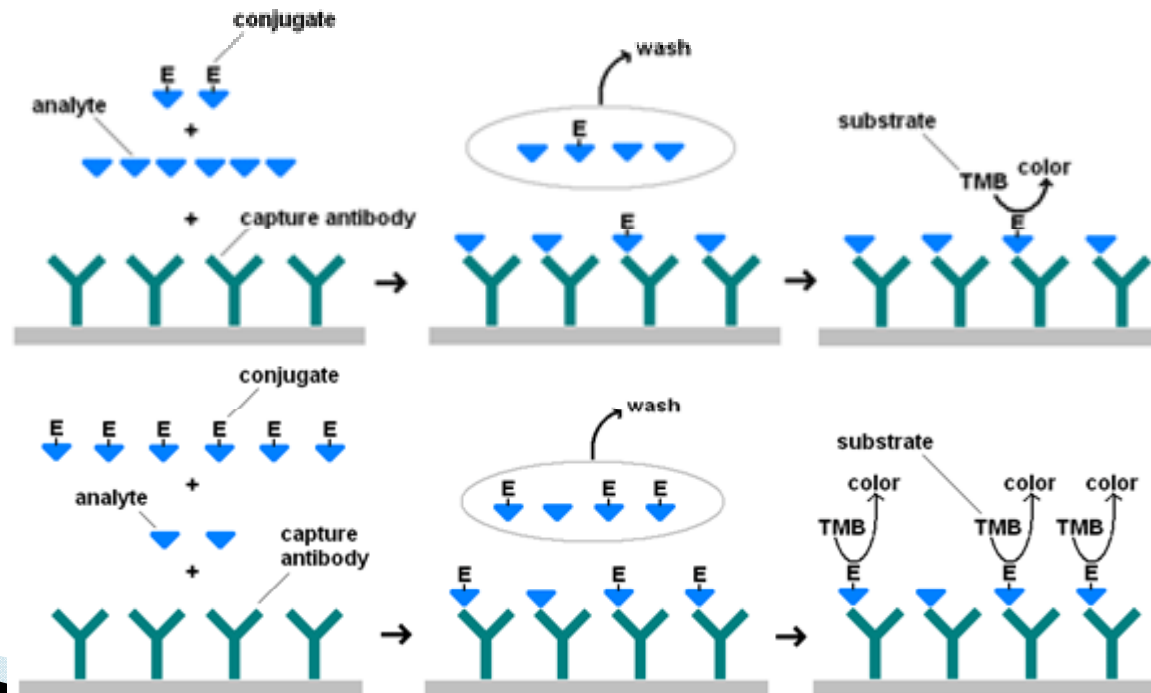
Indirect ELISA



Sandwich ELISA



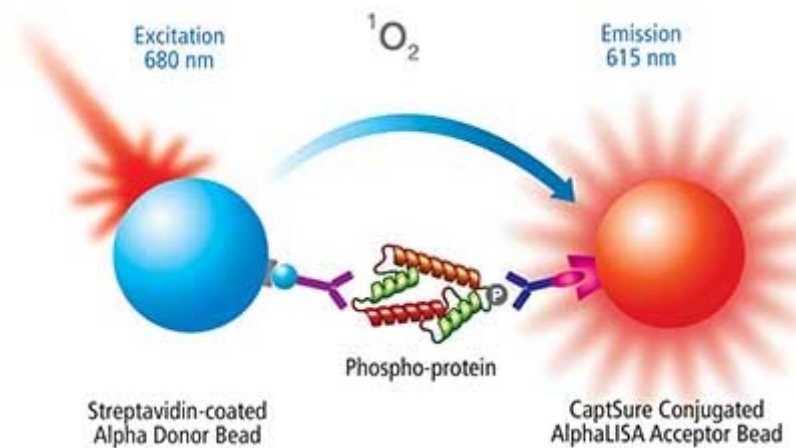
Kompetitivní ELISA



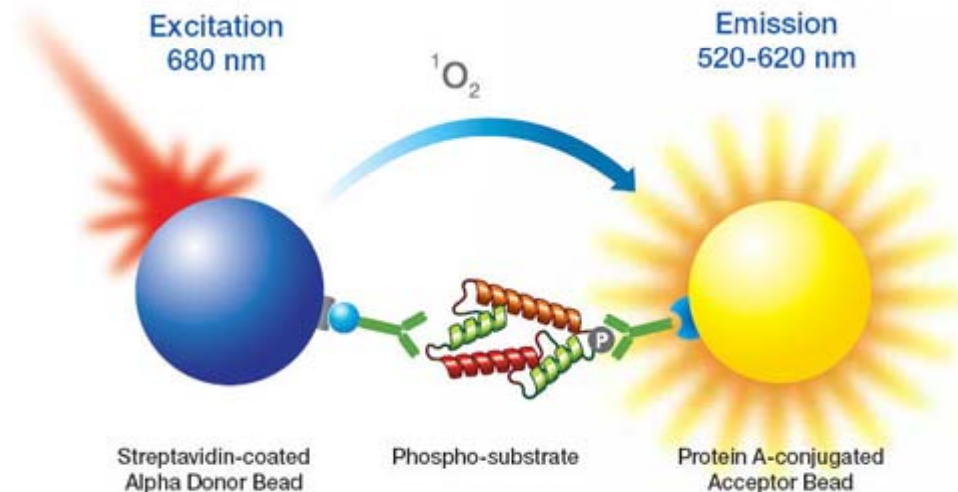
Využití principu FRET při značení protilátek:

PerkinElmer: AlphaLISA a AlphaScreen (liší se typem akceptorových zrníček)

AlphaLISA

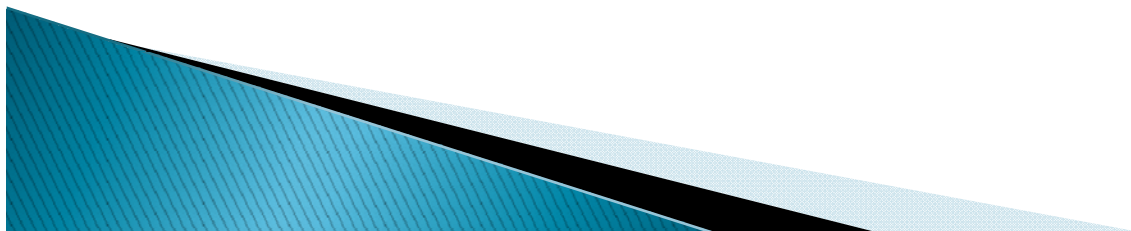


AlphaScreen



Komerčně dostupné pro detekci širokého spektra signálních molekul (cytokiny, receptory, transkripční faktory, markery karcinogeneze)

Detekce proteinů pomocí protilátek – reakce na membráně



Western Blot

- Analytická technika umožňující detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny pomocí protilátek
- Velká flexibilita & snadná a rychlá optimalizace pro různé proteiny

1.krok – separace proteinů podle molekulové hmotnosti

- Typicky SDS-PAGE (Laemmliho metoda)

2.krok – přenesení proteinů na membránu (blot)

= **Western transfer, elektroblotting, immunoblotting**

- nutné pro zpřístupnění proteinů pro detekci protilátkami
- imobilizace proteinů

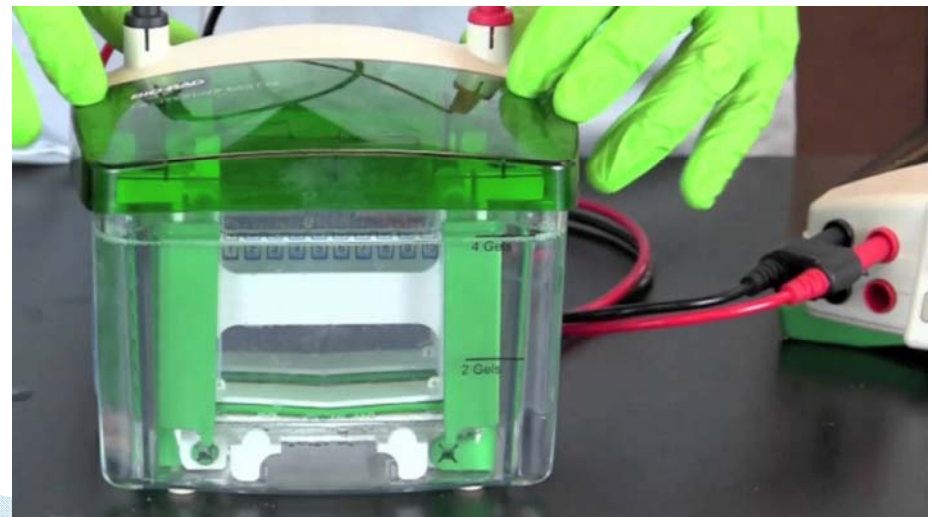
3. krok – imunodetekce

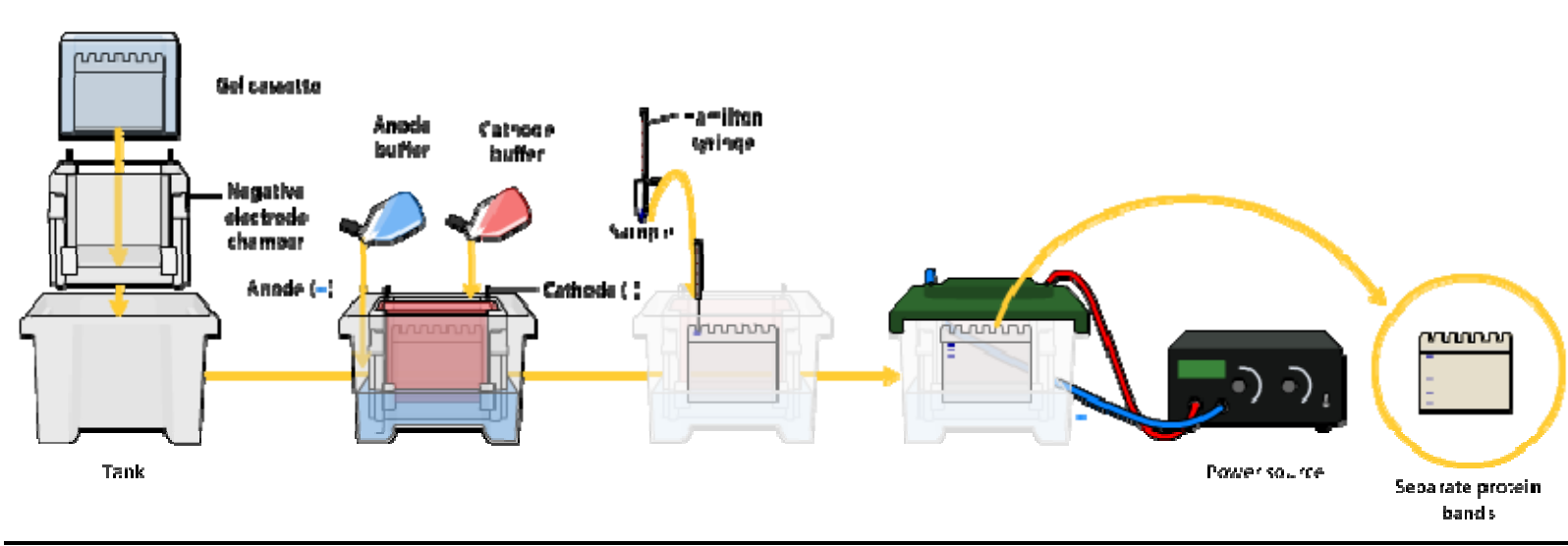
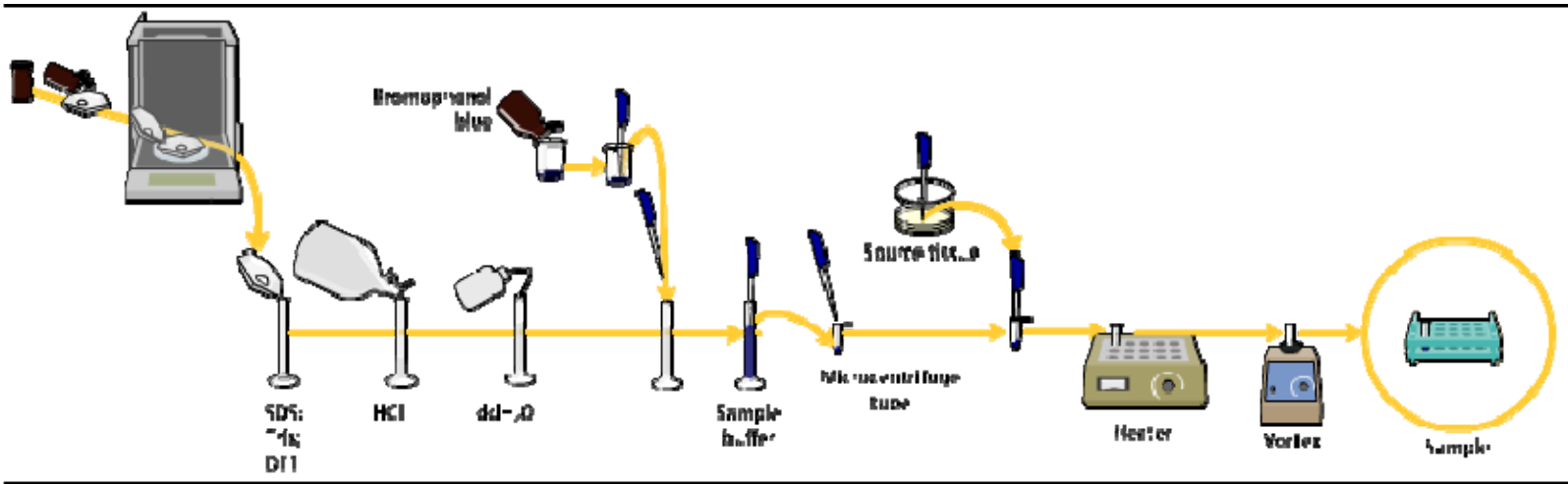
- detekce přímá (značená protilátka)
- detekce nepřímá – neznačená primární a značená sekundární



Western blot – 1. SDS-PAGE

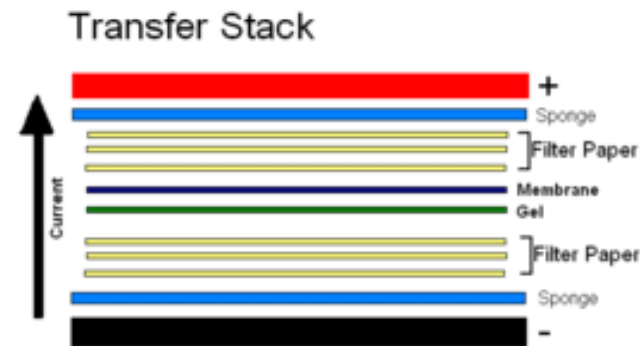
- ▶ viz. předchozí přednáška
- ▶ Nejčastěji SDS-PAGE dle Laemmliho
- ▶ Denaturované / redukované proteiny (vzorek v nanášecím pufru s SDS, DTT nebo B-merkaptanoethanolem, zahřátí před nanesením na gel)
- ▶ Diskontinuální polyakrylamidový gel (Tris-HCl)
- ▶ Porozita gelu (% akrylamidu) \leftrightarrow rozsah separovaných MW
- ▶ Pufr: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% SDS, pH 8.3-8.8
- ▶ Migrace proteinů (záporný náboj) směrem k anodě
- ▶ Migraci lze sledovat podle postupu čela vzorku zvýrazněného bromfenolovou modří (součást nanášecího pufru), případně podle postupu markeru MW
- ▶ Minigely: zpravidla 100-200V, 1-2 hodiny



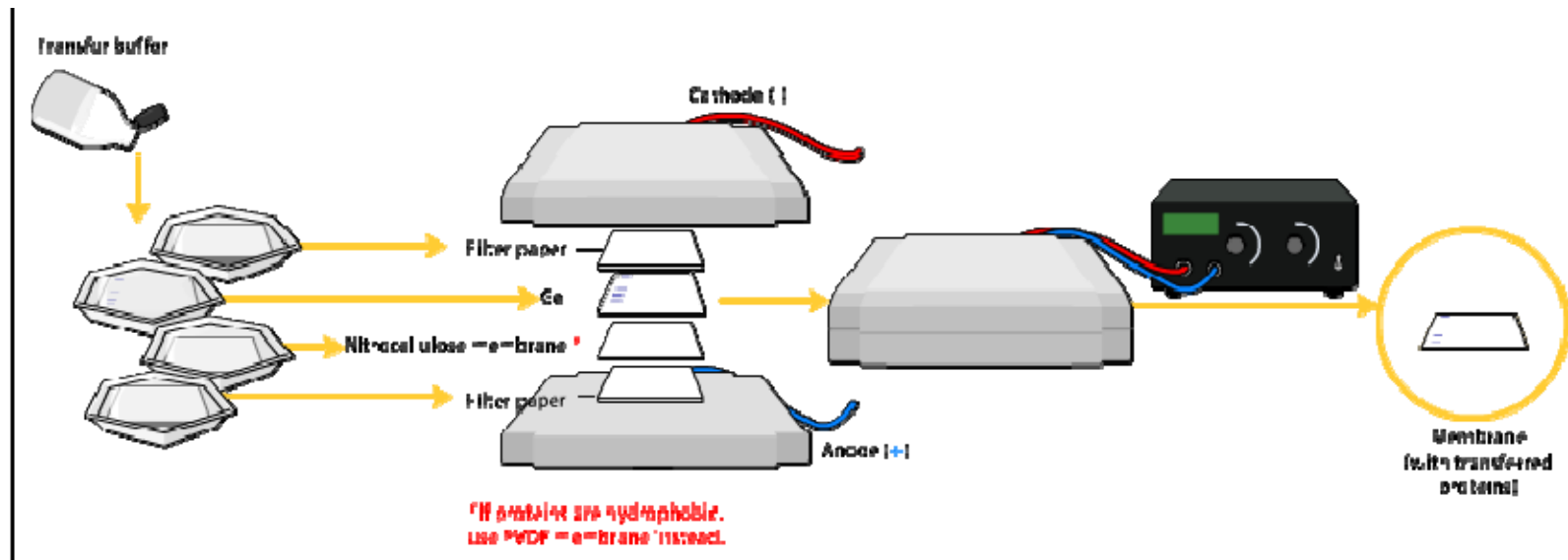


Western blot – 2. transfer

- ▶ Přenos gelu na membránu – PVDF, nitrocelulóza
- ▶ Gel vyjmut z kazety a ekvilibrován v transferovém pufru (max. 30 min):
25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.02% SDS, 20%MeOH
(obsah SDS a MeOH se může lišit podle cílového typu proteinu – nízkomolekulární / vysokomolekulární, hydrofilní / hydrofóbní)
- ▶ PVDF membrána
 - hydrofóbní, nutno aktivovat ponořením do MeOH (30 s) a opláchnout vodou
- ▶ Sestavení „sendviče“
 - (Porézní podložka)
 - filtrační (blotovací) papír
 - **Membrána**
 - **Gel**
 - Filtrační (blotovací) papír
 - (Porézní podložka)
- ▶ „Sendvič“ umístěn do blotteru
 - Membrána směrem k anodě
 - Gel směrem ke katodě
- ▶ Aplikace elektrického napětí
 - > migrace proteinů k anodě -> přenos z gelu na membránu
 - > zachování jejich pozice a relativních rozdílů v abundanci



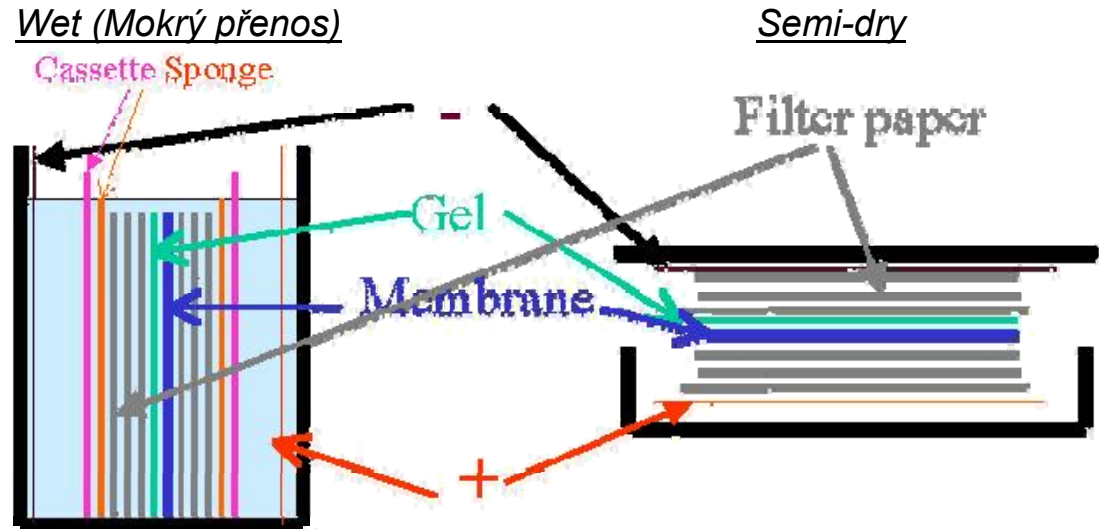
Western blot - 2. transfer



Western blot – 2. transfer

▶ Wet (Tank) Transfer

- ▶ Gel i membrána uzavřeny v kazetě a zcela ponořeny v přenosovém pufru mezi elektrodami
- ▶ Pomalejší (1–18 h), ale účinnější
- ▶ Nutnost chladit a míchat! (uniformita teploty a vodivosti)



▶ Semi-Dry Transfer

- ▶ „Sendvič“ (Gel, membrána a filtrační papíry) ovlhčen přenosovým pufrům a stlačen mezi plochými kovovými elektrodami semi-dry blotteru
- ▶ Rychlejší (15 min – 1 hod)
- ▶ Menší účinnost



Nutno optimalizovat (čas, mA / V, složení pufru – SDS, MeOH, typ membrány)

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Western_blot_wet_transfer_system_Criterion-06.jpg

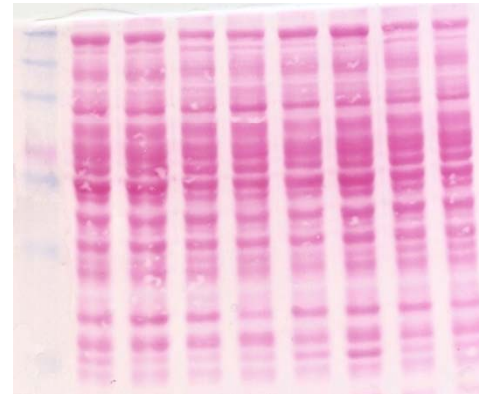
<http://www.sciencegateway.org/protocols/cellbio/protein/wt.htm> <http://www.bio-rad.com/en-us/product/trans-blot-sd-semi-dry-transfer-cell>

Western blot – 2. transfer

- ▶ Kontrola kvality transferu – barvení proteinů na membráně:

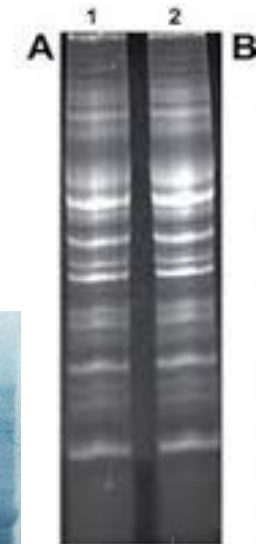
- Ponceau-S

- reverzibilní, snadné odmytí v alkalickém pH

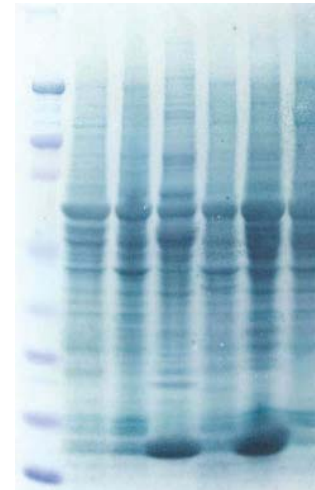


- Transiluminace

- pro PVDF membrány
- rozdílná propustnost světla v místech s proteiny v 20% MeOH



- Swift Stain etc.



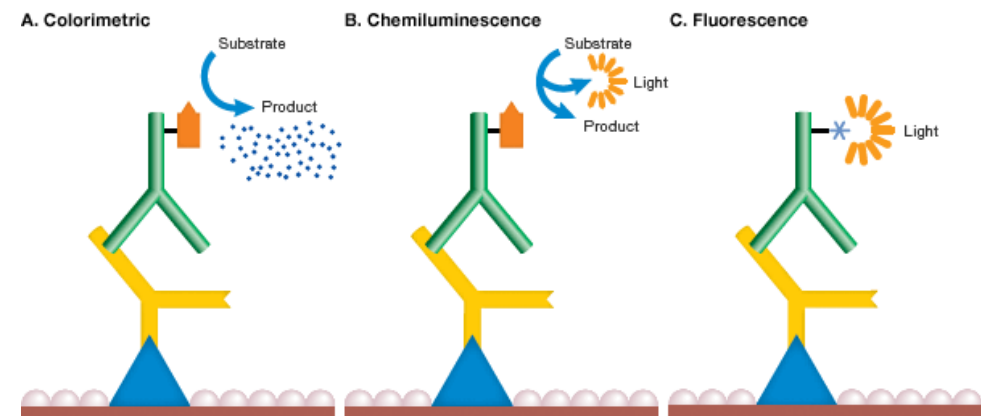
Western blot – 3. imunodetekce

▶ Blokování

- Obsazení volných míst na membráně blokujícím proteinem => omezení nespecifické vazby / sorpce protilátek
- Inkubace membrány v blokačním roztoku
 - 3–5% (w/v) odtučněné práškové mléko
 - nebo 1–5% (w/v) bovinní sérový albumin aj.
 - Rozpuštěné v PBS nebo Tris–buffered–saline, pH 7.4 s 0.05–0.1% Tween20 => tzv. PBST nebo TBST
 - Nutno optimalizovat (typ, koncentrace, doba blokování, teplota)

Western blot – 3. imunodetekce

- ▶ Inkubace s primární protilátkou
 - Specifická pro zájmový protein a organismus
 - Mono/polyklonální, hostitelský druh
 - Značená/neznačená
 - Obvykle rozpuštěná v blokačním roztoku, inkubace 2h (RT) – přes noc (lednice)
- ▶ Oplach membrány (PBST nebo TBST)
- ▶ Inkubace se sekundární protilátkou
 - Specifická pro hostitelský druh primární
 - Značená
 - Enzymaticky (HRP, AP)
 - Fluorescenčně
 - Avidin–biotin komplexy
- ▶ Oplach membrány
- ▶ Detekce signálu



Western blot – 3. imunodetekce

▶ Enzymatické značení – HRP:

◦ Chromogenní reakce

- 3,3´-Diaminobeznidin, 4-Chloro-1-naphthol
- Vznik barevných proužků
- Fotodokumentace (skener, CCD – gel-doc)

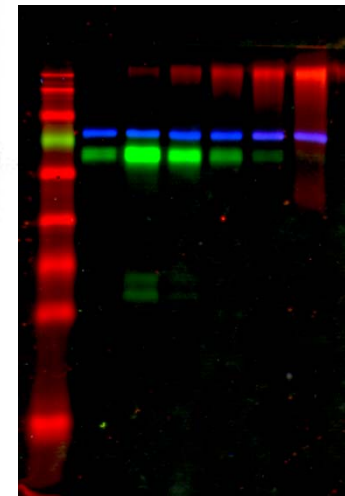
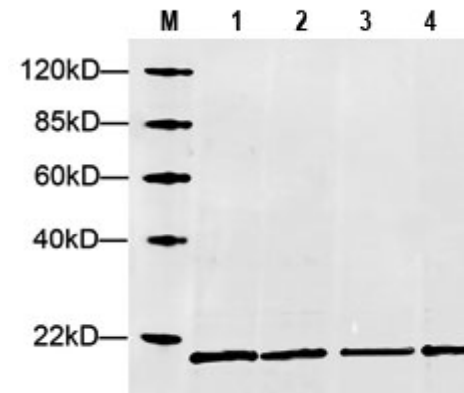
◦ Chemiluminiscenční reakce

- Luminol
- => světelný signál
- Dokumentace na fotografický film
(expozice v temné komoře, vývojka, ustalovač)
nebo dokumentační systém pro gely

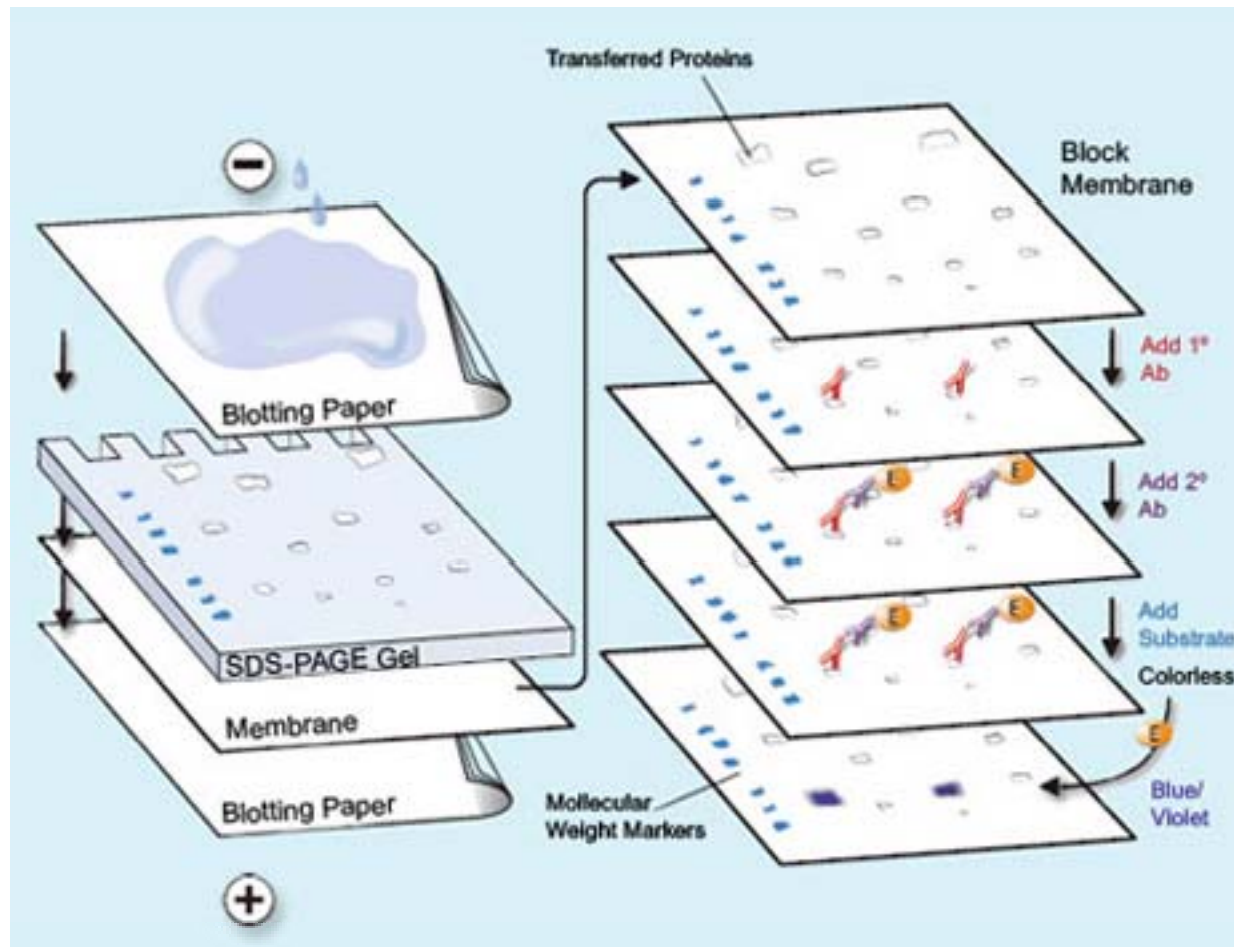
▶ Alternativně i alkalická fosfatáza

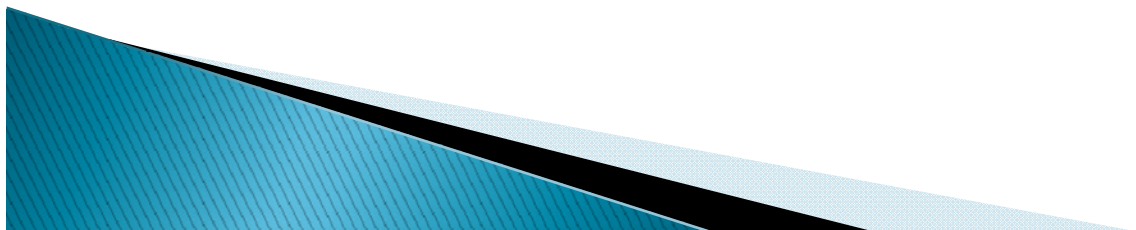
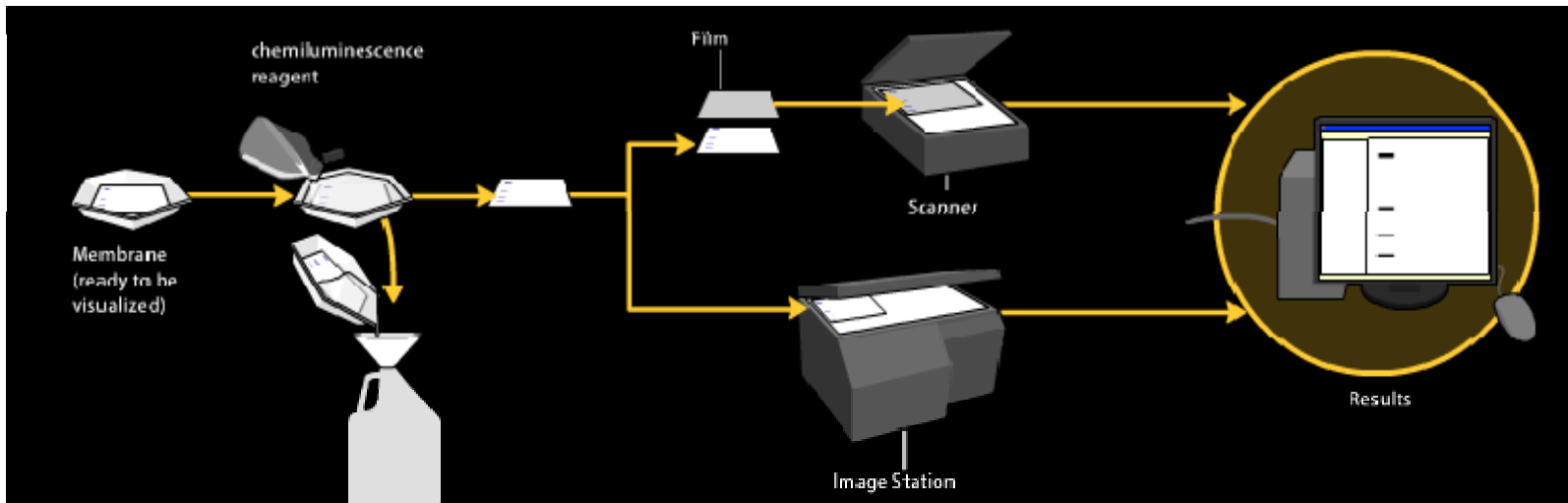
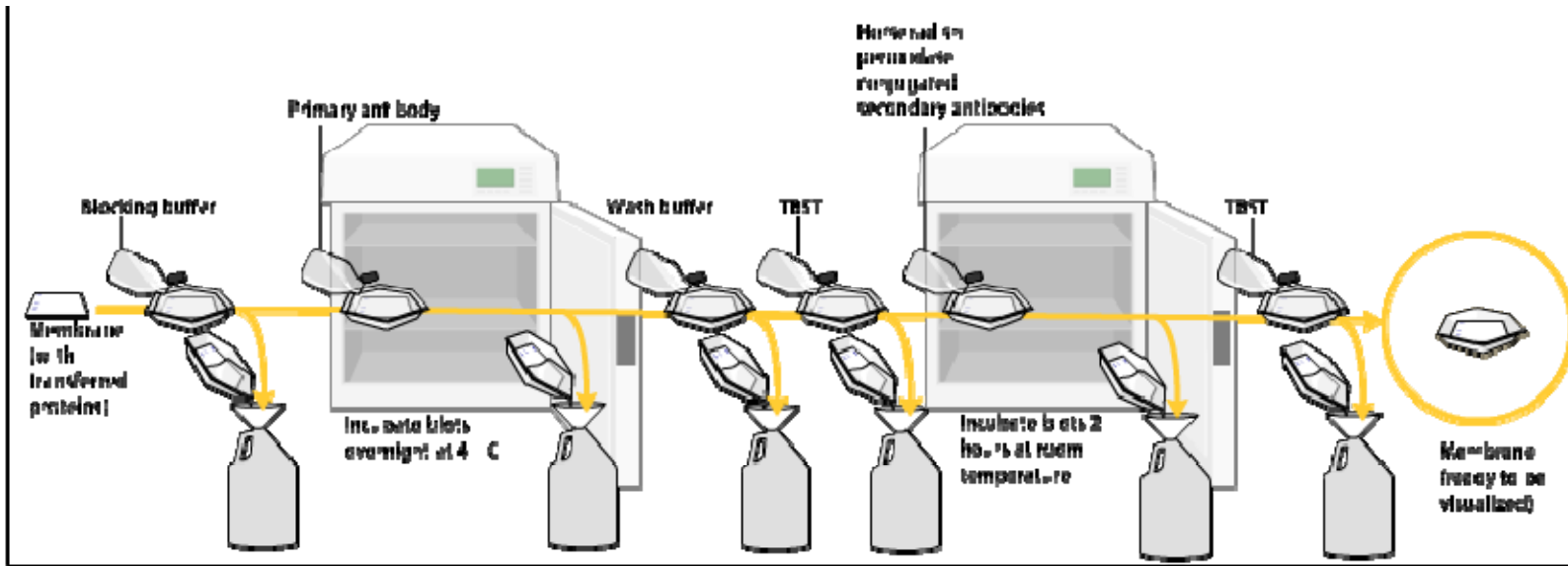
▶ Fluorescenční značení

- Dokumentační systém pro gely
- Excitace a emise příslušné značené protilátky
- Umožňuje multiplexing



Western blot - 3. imunodetekce



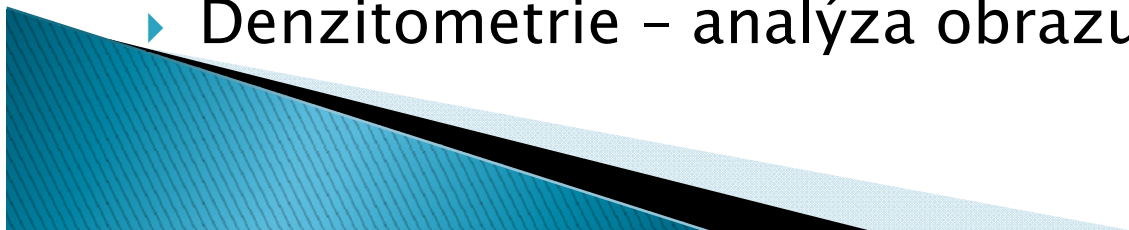


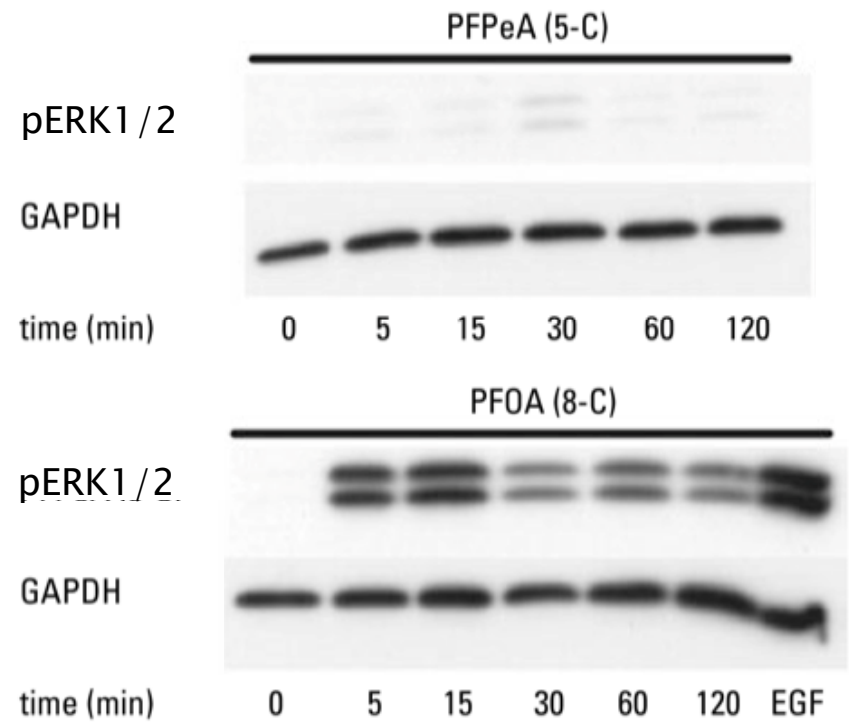
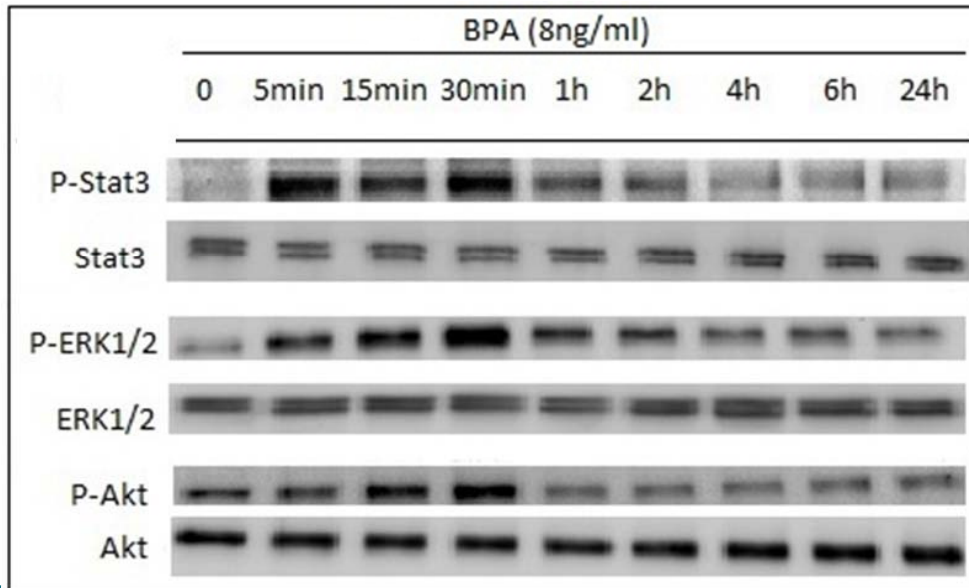
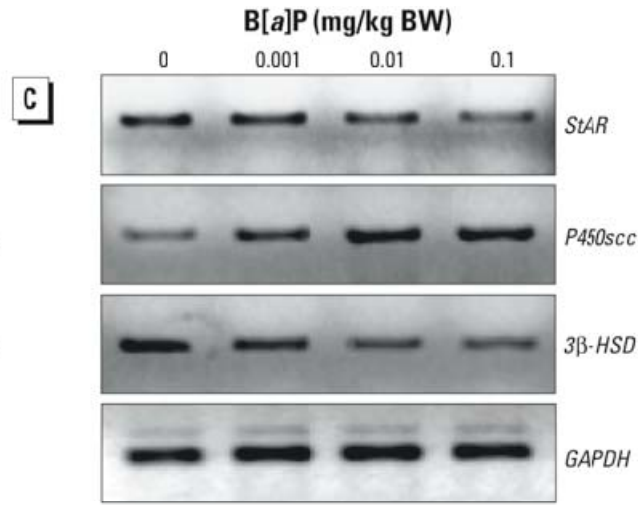
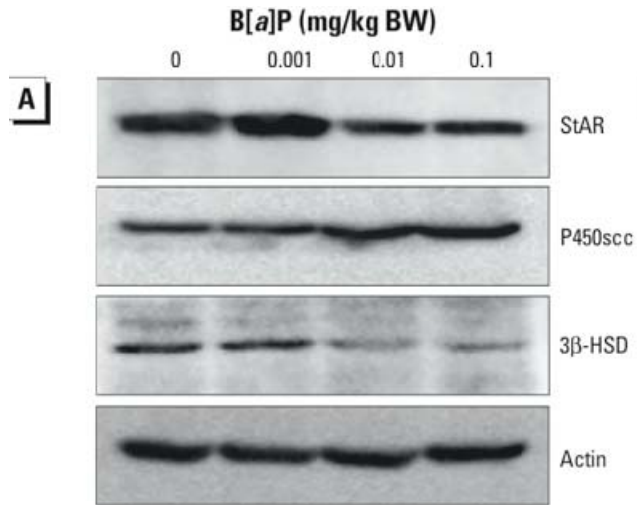
Western blot – 3. imunodetekce

- ▶ Re-probing
 - Opakované použití blotu pro detekci různých proteinů
 - Ideálně odlišná MW & primární protilátka z jiného organismu
 - Alternativně stříhání membrány a paralelní inkubace různých částí (oblastí MW) s různými protilátkami
 - S opakovanými detekcemi může klesat kvalita výsledku („přeblokování“, poškození membrány, ztráta antigenních vlastností)
- ▶ Stripping
 - Odstranění navázaných protilátek před další imunodetekcí
 - Působením pH, detergentu, teploty => odmytí navázaných protilátek
 - Možnost poškození antigenu

Western blot – vyhodnocení

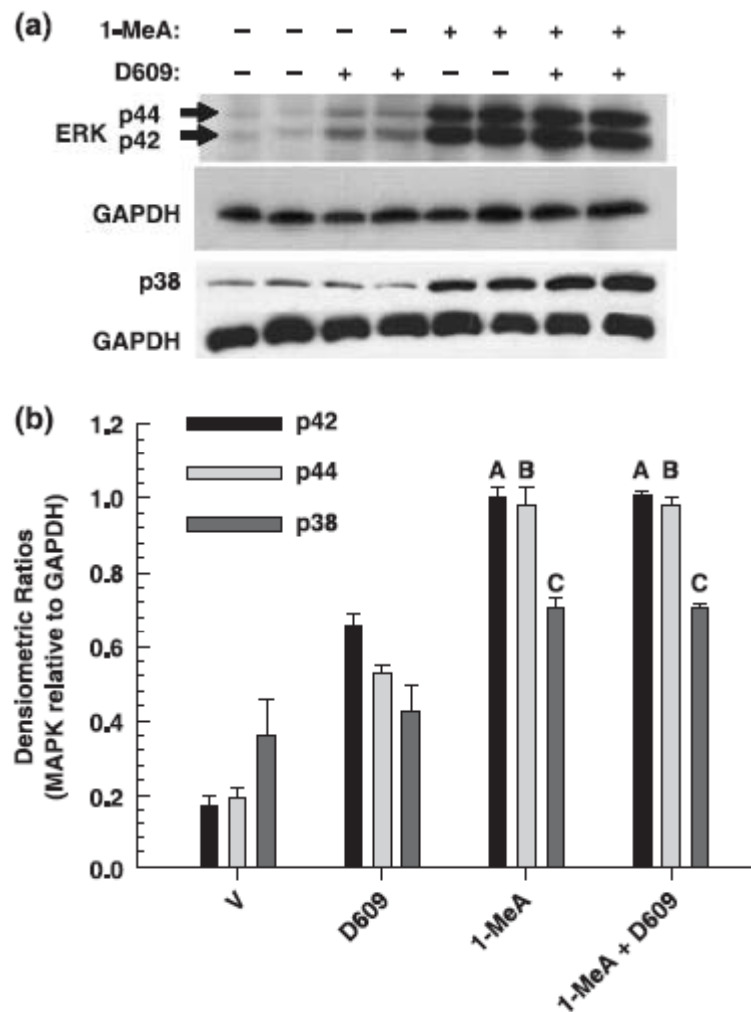
- ▶ Umožňuje relativní srovnání s kontrolou (negativní, pozitivní, rozpouštědlová)
- ▶ Nutná kontrola nanášení
 - **House-keeping protein** – abundantní protein, nepředpokládá se jeho ovlivnění v souvislosti s experimentálním zásahem (expozice látkou)
 - B-actin, α -tubulin, GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
 - **Barvení celkových proteinů** – Ponceau S, Coomassie (ireverzibilní, až po ukončení imunodetekce)
 - Fosforylace – množství fosforylovaného vs. celkového množství daného proteinu
- ▶ Jednoduché vizuální porovnání
- ▶ Denzitometrie – analýza obrazu, kvantitativní údaj





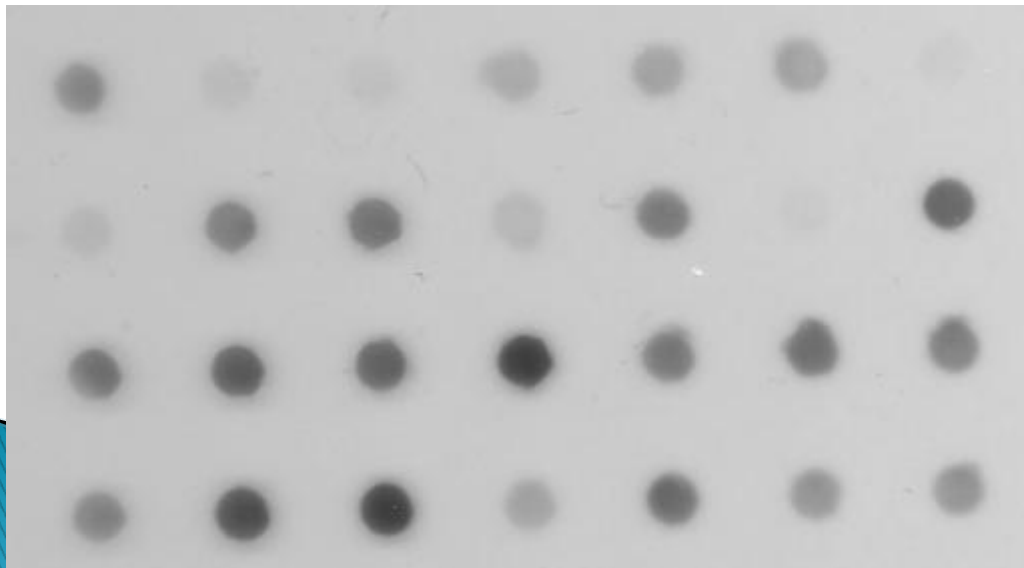
Denzitometrie

- ▶ Analýza digitálního obrazu
- ▶ Velikost a intenzita proužků převedena na číselné hodnoty
- ▶ Normalizace na signál bandů nanášecí kontroly pro příslušný vzorek
- ▶ Výsledky zpravidla vyjádřeny relativně jako podíl relevantní kontroly (negativní, rozpouštědlová)
- ▶ ImageJ, Image Studio Lite, SW příslušného dokumentačního systému

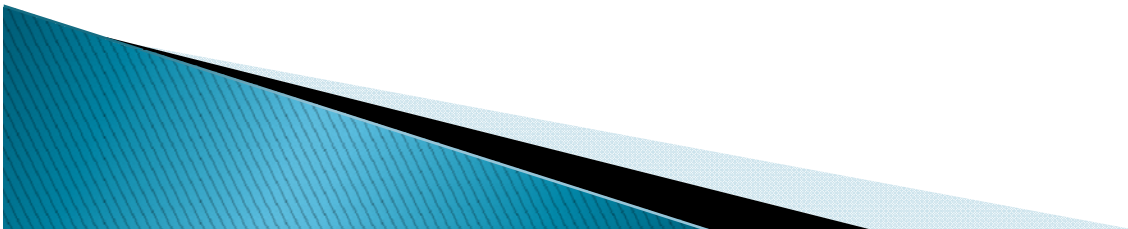


Dot-blot

- ▶ Jednoduchá a rychlá detekční technika
- ▶ Nanesení proteinového vzorku přímo na PVDF nebo nitrocelulózovou membránu (není SDS-PAGE / transfer)
- ▶ Další postup stejný jako u imunodetekce při Western blottingu
- ▶ Semikvantitativní

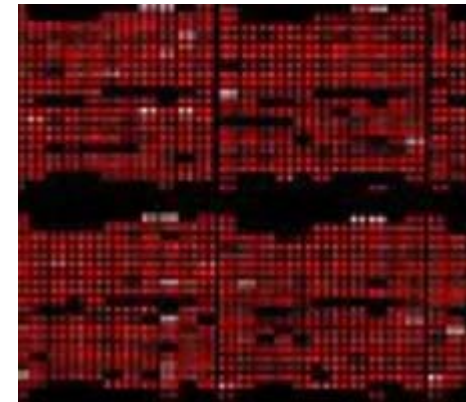
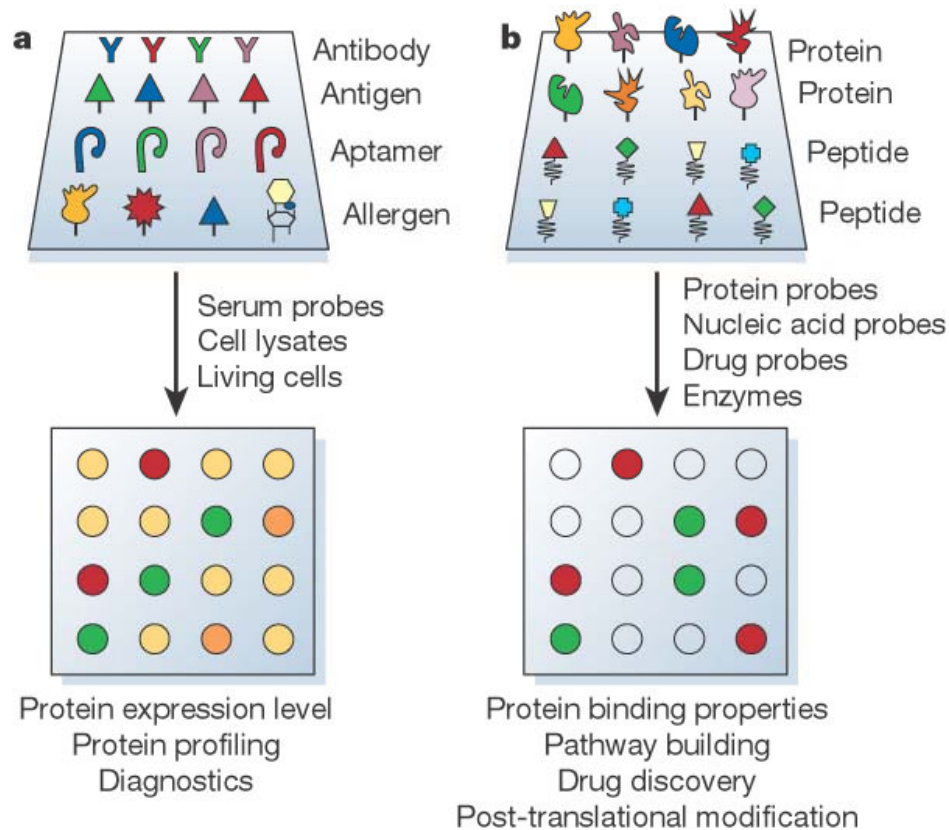


Protein microarrays



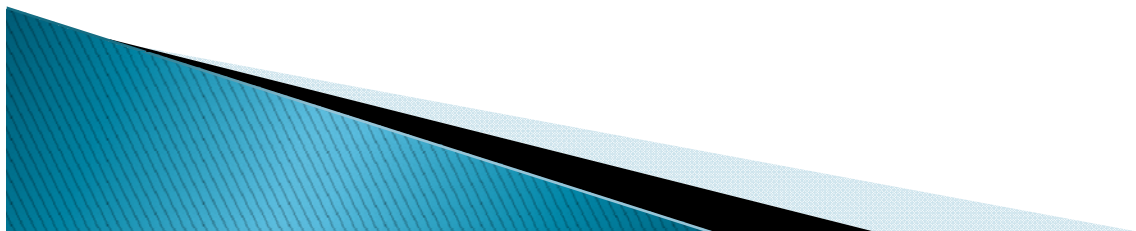
Protein Microarrays

Interakce receptor–ligand nebo protilátka–antigen
 Formát chipu – stovky až tisíce interakcí



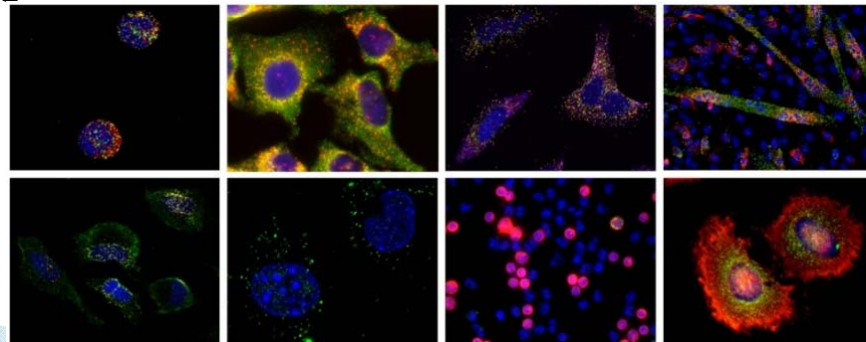
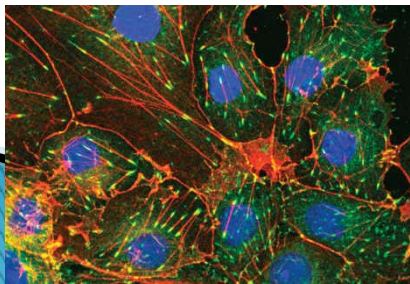
ProtoArray®
 Kinázy, fosfatázy, GPCR,
 jaderné receptory,
 proteázy
 (> 9000 cílů)

Detekce proteinů pomocí protilátek – přímo v buňkách



Imunobarvení

- ▶ Detekce proteinů pomocí protilátek přímo ve vzorcích tkání nebo tkáňových kultur při zachování buněčných struktur / architektury tkáně
- ▶ Informace o lokalizaci proteinů vzhledem k morfologii buněk
- ▶ Fixace – zachování struktury buněk / tkáně
- ▶ Permeabilizace – přístup protilátky k antigenu
- ▶ (Antigen-Retrieval – „odblokování“ antigenu pro protilátku)
- ▶ Imunodetekce – blokování, primární, sekundární protilátka
- ▶ Counterstaining – vizualizace známých struktur (jádro, cytoskelet)
- ▶ Mikroskopická dokumentace

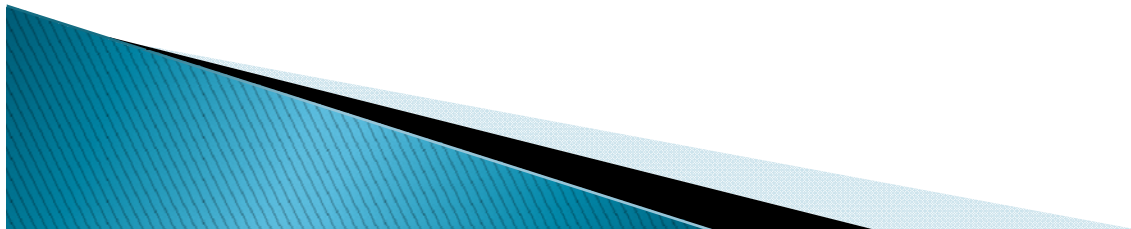


Imunohistochemie (IHC)

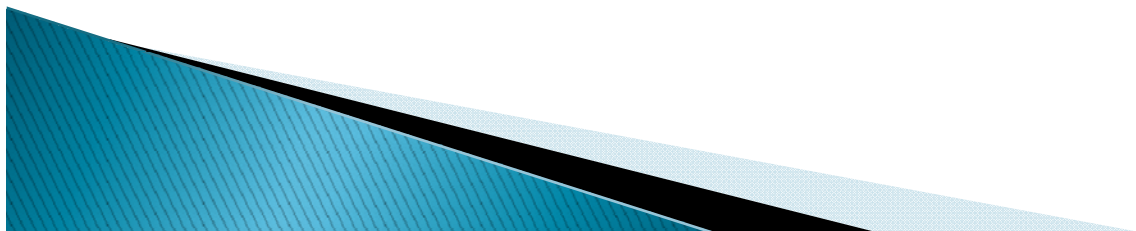
- ▶ Tkáňové preparáty
- ▶ Zpravidla v parafinu -> parafinové bločky
- ▶ Příprava řezů -> mikrotom
- ▶ Detekce - protilátky zpravidla značené enzymaticky, chromogenní detekce (autofluorescence zbytků parafínu) => mikroskopie při viditelném světle

Imunocytochemie (ICC)

- ▶ Preparáty tkáňových kultur
- ▶ Detekce - zpravidla fluorescenčně značené protilátky a fluorescenční mikroskopie



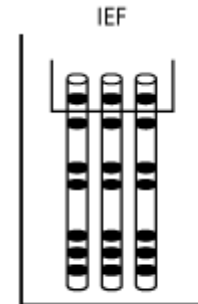
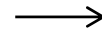
Detekce proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS)



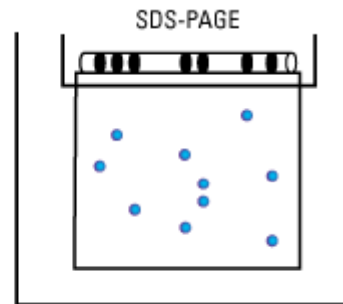
2D-PAGE & Peptidové mapování

2D-PAGE

Izolace proteinů



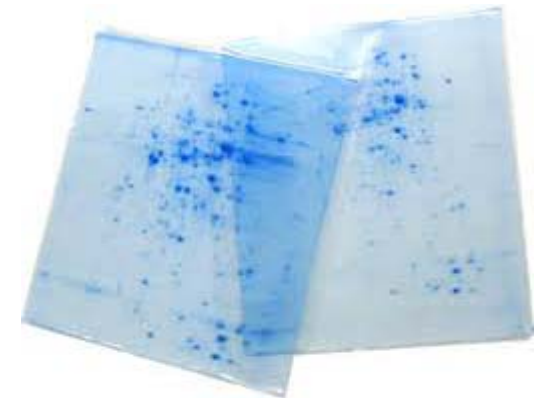
First dimension,
tube gel or strip gel



Second dimension,
slab gel



Vizualizace
proteinů a
dokumentace gelu



Coomassie, stříbro,
Krypton, SYPRO
Ruby...

1. dimenze: Izoelektrická fokusace



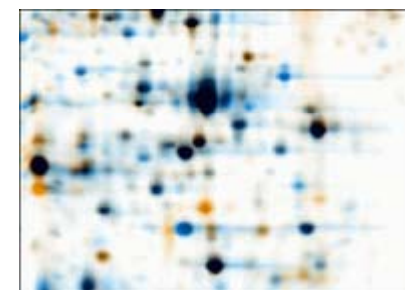
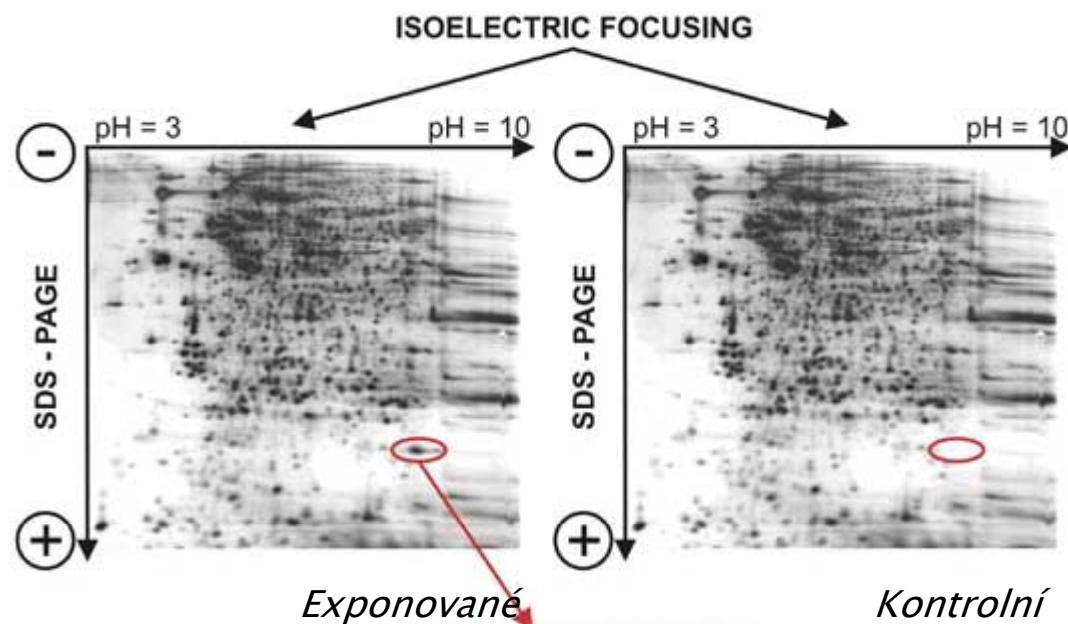
2. dimenze: SDS-PAGE



2D-PAGE & Peptidové mapování

Analýza spotů

- identifikace ovlivněných proteinů na základě analýzy obrazu
- - specializovaný software (PDQuest, Progenesis, BioNumerics 2D ...) pro virtuální překládání digitalizovaných obrazů gelů
- srovnávání polohy (pI / MW), velikosti a intenzity spotů => změny v expresi proteinů, jejich postranslačních modifikacích spojených se změnou pI / MW

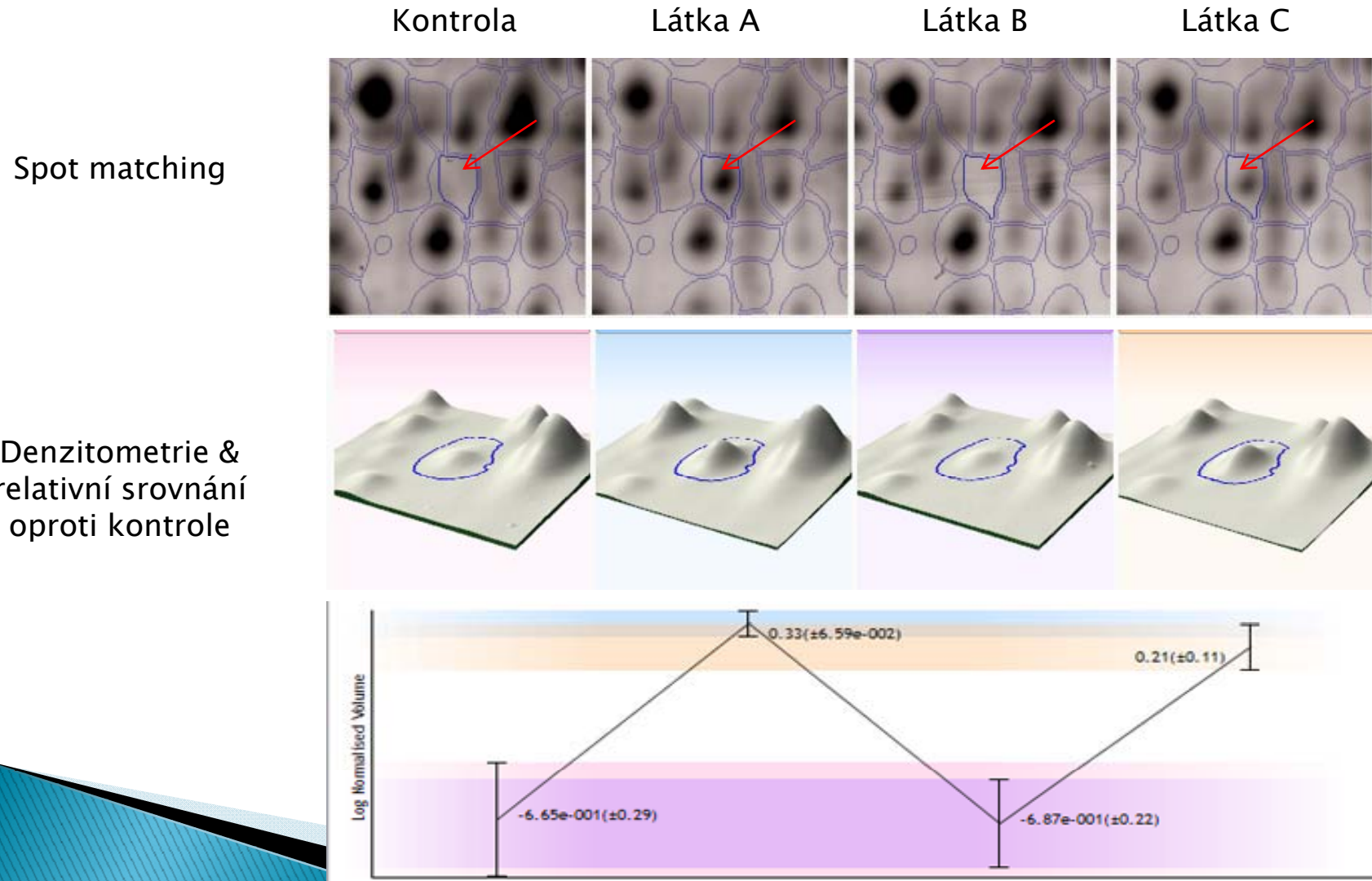


Přeložený obraz –
zvýraznění rozdílných
spotů

Excize spotu se zájmovými proteiny
Štěpení proteinu v gelu
LC-MS/MS analýza štěpů (peptidů)

2D-PAGE & Peptidové mapování

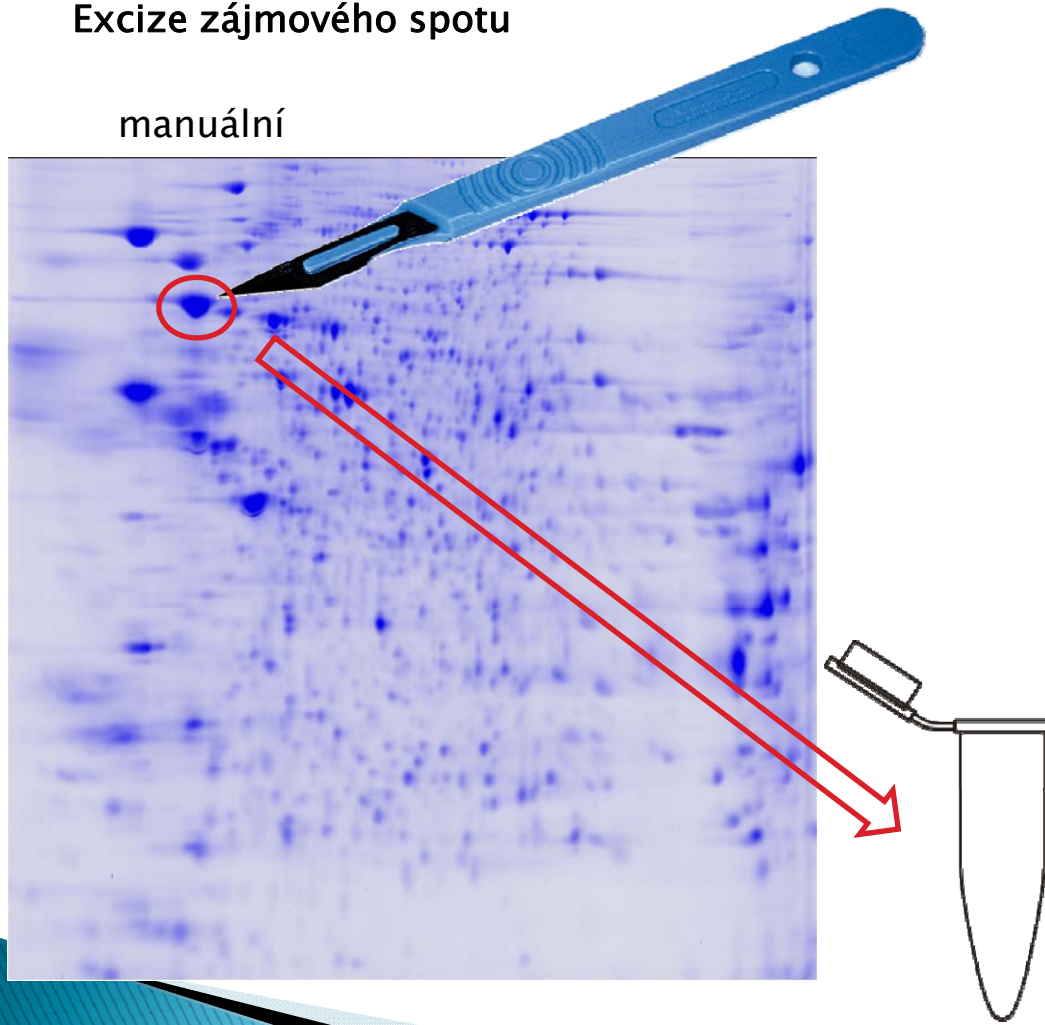
Příklad analýzy spotů (SW Progenesis SameSpots)



2D-PAGE & Peptidové mapování

Excize zájmového spotu

manuální



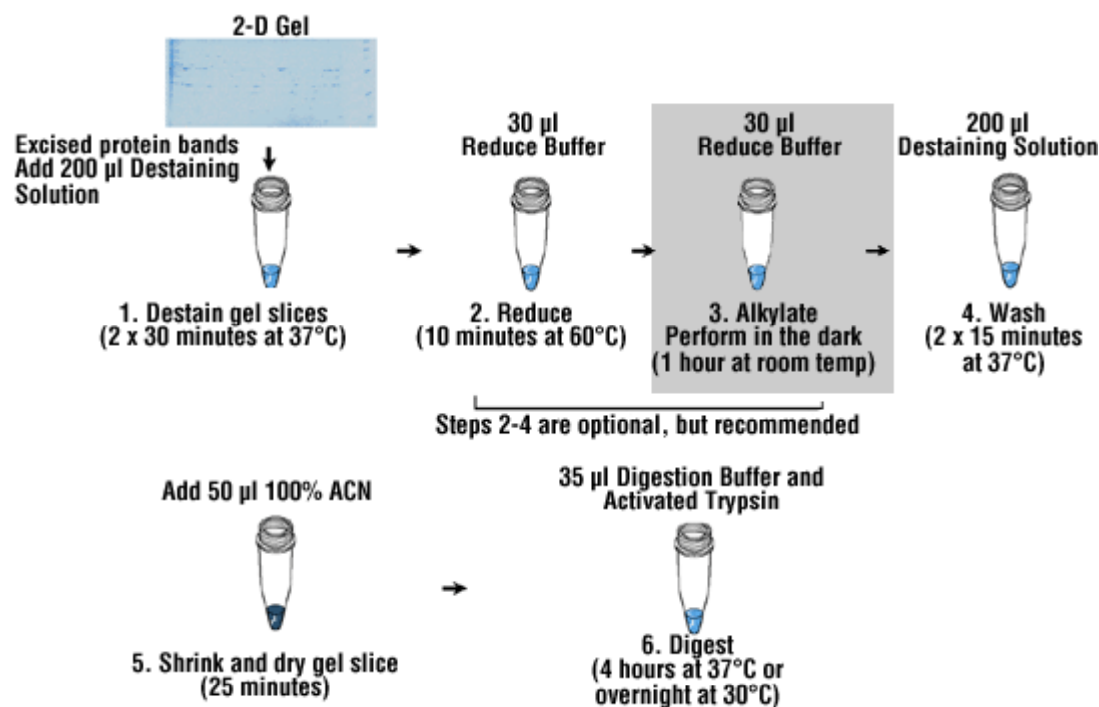
robotická



2D-PAGE & Peptidové mapování

Štěpení proteinu v gelu

- odbarvení gelu (pokud nutno - např. Coomassie Blue)
- redukce a alkylace proteinů (zablokování tvorby S-S můstků)
- štěpení proteinů proteázami - nejčastěji trypsin
 - dehydratace gelu v organickém rozpouštědle
 - rehydratace v přítomnosti štěpícího pufru obsahujícího trypsin => štěpení v gelu



2D-PAGE & Peptidové mapování

Štěpení v gelu – proteázy

Trypsin

(C konec -R, -K)

Chymotrypsin

(C-konec -W, -Y, -F)

Lys-C

Lys-N

Arg-C

Glu-C

Asp-N

CNBr



Volbou proteázy a jejich kombinacemi lze dosáhnout menšího počtu delších fragmentů nebo většího počtu krátkých fragmentů

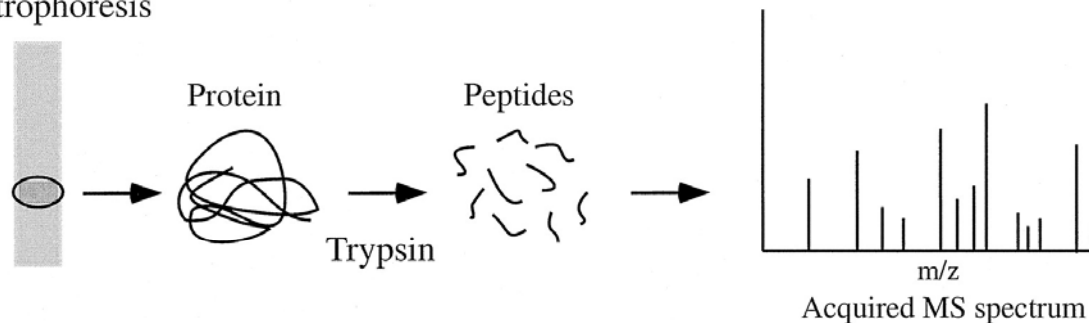
Peptidové mapování = PMF

- ▶ Hmotnostně spektroskopická (MS, mass spectroscopy) analýza peptidů
- ▶ Peptide Mass Fingerprinting, Protein Fingerprinting

Princip peptidového mapování

- unikátní protein (sekvence aminokyselinových zbytků) => vznikne unikátní sada peptidů po naštěpení => ty budou mít unikátní molekulovou hmotnost

A. Electrophoresis

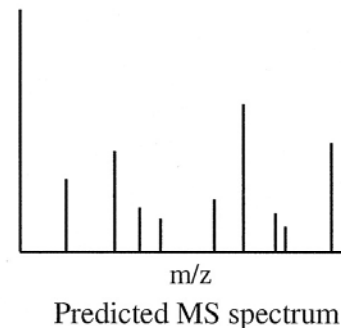


B. MAAVFLTGNWPIHGCG
GICK**GLYSTTVFLAKQ**
HK**MNPTYNQFR**MHSNL
CAHPFTR**LVSDEGDKC**
GILNFPPS

Protein in
database

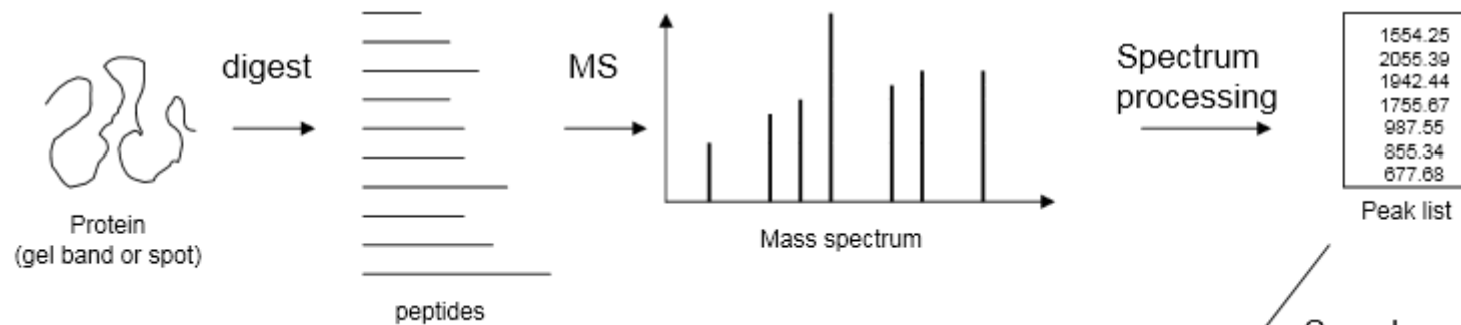
GLYSTTVFLAK
MNPTYNQFR
LVSDEGDK

Predicted peptides
from hypothetical
trypsin treatment



Srovnání přesně
změřené hmoty
peptidu s hodnotou
predikovanou z
databáze známých
proteinů (nebo DNA
sekvencí) a *in silico*
štěpení

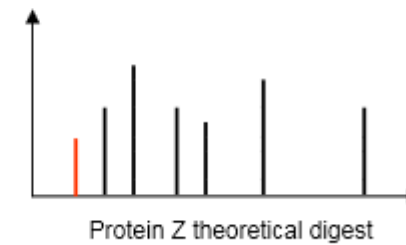
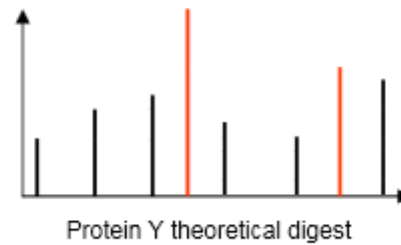
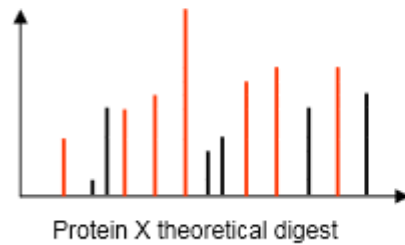
Peptidové mapování (PMF)



1554.25
2056.39
1942.44
1756.67
987.55
855.34
677.68

Peak list

Search



Report

HIT	SCORE
Protein X	1000
Protein Y	50
Protein Z	5

Vyhledávací programy:

- MASCOT
- ProFound
- MS-Fit
- MOWSE
- Pepldent, MultIdent

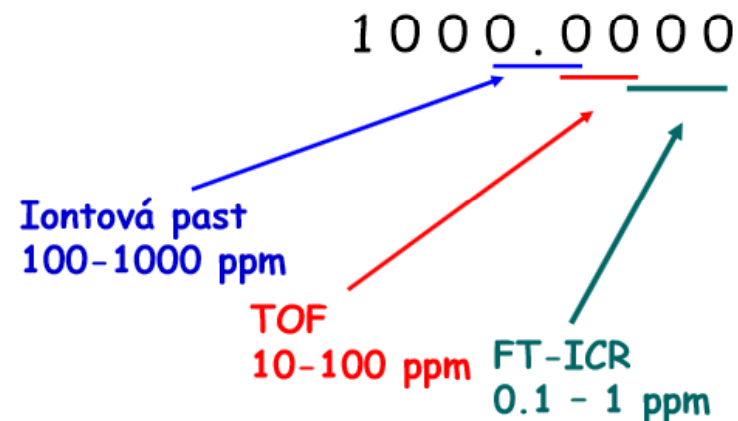
...

Peptidové mapování (PMF)

▶ MS instrumentace

- vysoká přesnost určení hmoty (m/z)
 - Analyzátoři doby letu (TOF)
 - Lineární iontová past (LTQ)
 - Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)
- Měkká ionizace
 - MALDI (matrix-assisted laser desorption & ionization)
 - Elektrosprej (ESI)

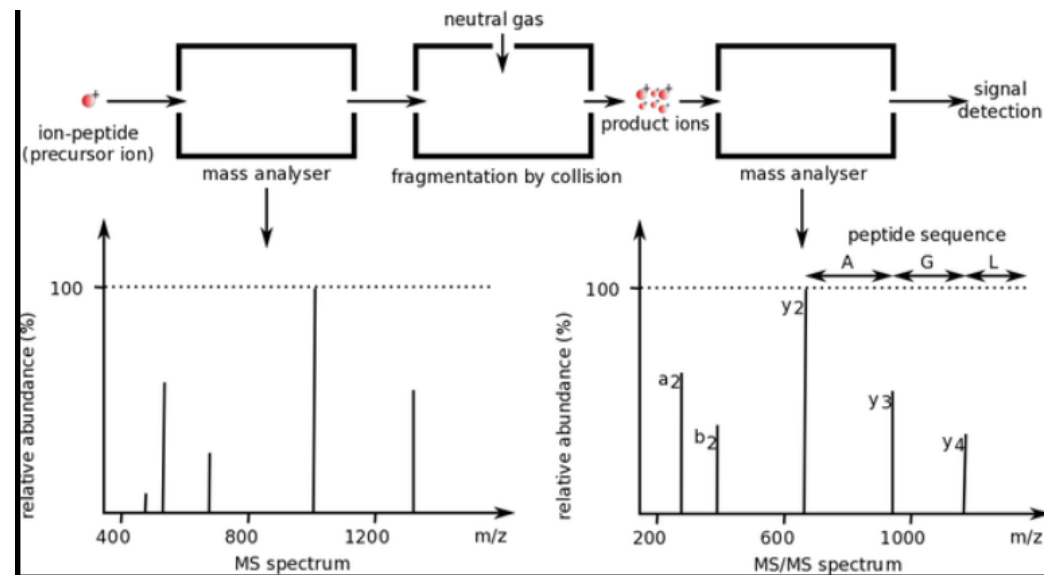
Čím vyšší přesnost měření, tím méně peptidů potřebujeme pro bezchybnou identifikaci



Peptidové sekvenování (Peptide de novo sequencing)

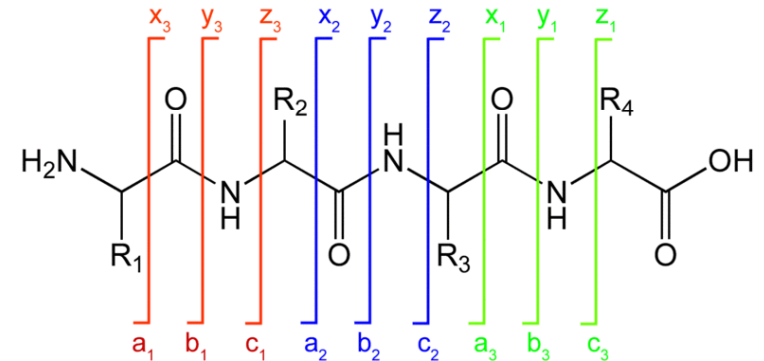
Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

– Peptid o určité m/z (prekursorový iont) je v hmotnostním spektrometru podroben fragmentaci => m/z produktů fragmentace (produktových iontů)



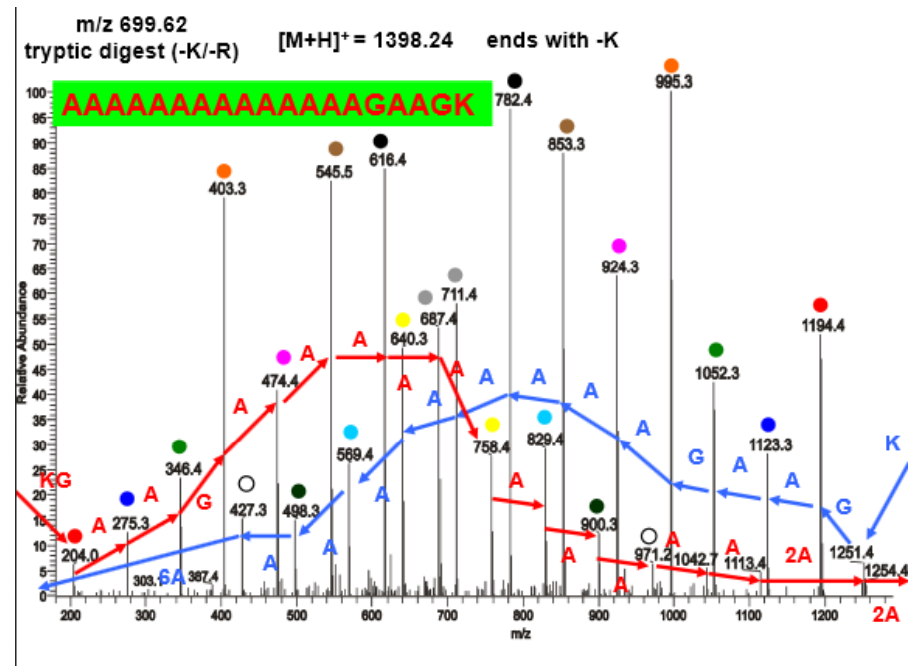
Peptidové sekvenování (Peptide de novo sequencing)

- ▶ K fragmentaci dochází v místě peptidové vazby
- ▶ Při fragmentaci s nízkou kolizní energií:
=> fragmenty (a), b, y



S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K $MH^+ = 1410.6$

b-ions⁺			y-ions⁺	
88.1	S	PAFDSIMAETLK	1323.6	
185.2	SP	AFDSIMAETLK	1226.4	
256.3	SPA	FDSIMAETLK	1155.4	
403.5	SPAF	DSIMAETLK	1008.2	
518.5	SPAFD	SIMAETLK	893.1	
605.6	SPAFDS	IMAETLK	806.0	
718.8	SPAFDSI	MAETLK	692.3	
850.0	SPAFDSIM	AETLK	561.7	
921.1	SPAFDSIMA	ETLK	490.6	
1050.2	SPAFDSIMAE	TLK	361.5	
1151.3	SPAFDSIMAET	LK	260.4	
1264.4	SPAFDSIMAETL	K	147.2	



Peptidové sekvenování (Peptide de novo sequencing)

▶ Vyhledávací programy

- MS/MS MASCOT
- SeQuest
- MS/MS SONAR
- PepFrag...

Databáze sekvencí

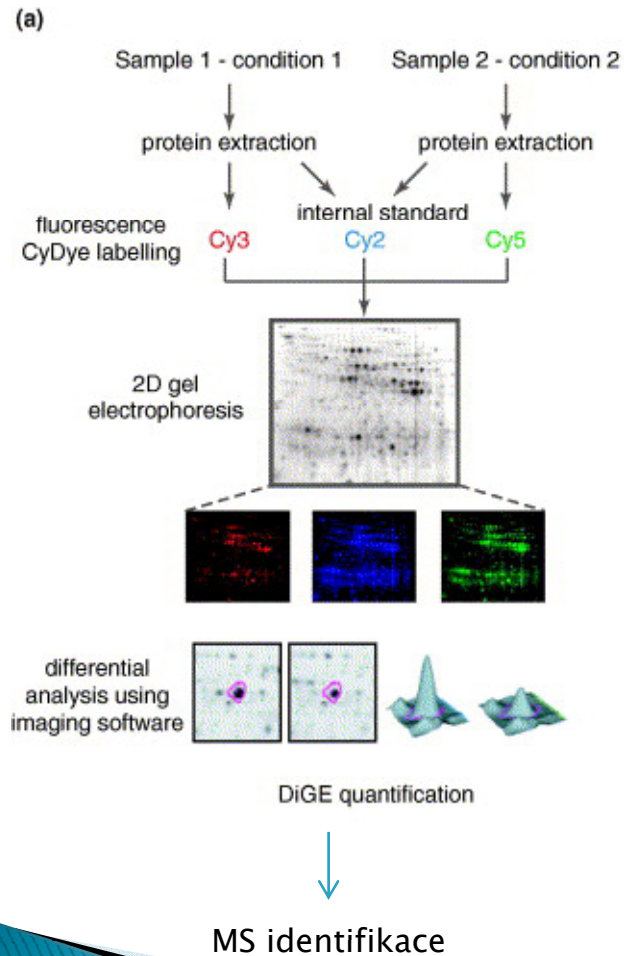
<http://www.uniprot.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

▶ Peptidové sekvenování

- Spolehlivější a specifitější identifikace než PMF
 - Stačí menší počet peptidů / pokrytí sekvence => lze identifikovat i málo abundantní proteiny
 - GAFF <> DFAG (x PMF)
 - Funguje lépe pro méně charakterizované / sekvenované genomy
- Nákladnější
Nižší throughput

2D-DIGE: 2D-fluorescence difference gel electrophoresis



- ▶ Extrahované proteiny z kontrolního a experimentálního vzorku jsou označeny pomocí různých fluorescenčních značek (nejčastěji CyDye, např. Cy3 a Cy5)
- ▶ Interní standard – směs kontroly a exp. vzorku 1:1 (obvykle označená pomocí Cy2)
- ▶ Smíchání Cy3, Cy5 a Cy2 značených proteinů => jejich další úprava a separace pomocí 2D-PAGE probíhá na stejném gelu
- ▶ Fluorescenční značení umožňuje nasnímat z téhož gelu odděleně proteiny z kontrolní a experimentální varianty (+ interní standard pro normalizaci)
=> Odbourání rozdílů spojených s variabilitou mezi gely

Využití LC-MS/MS v proteomice

Chromatografická separace naštěpených peptidů v kombinaci s MS nebo MS/MS

⇒ Umožňuje analyzovat komplexnější vzorky

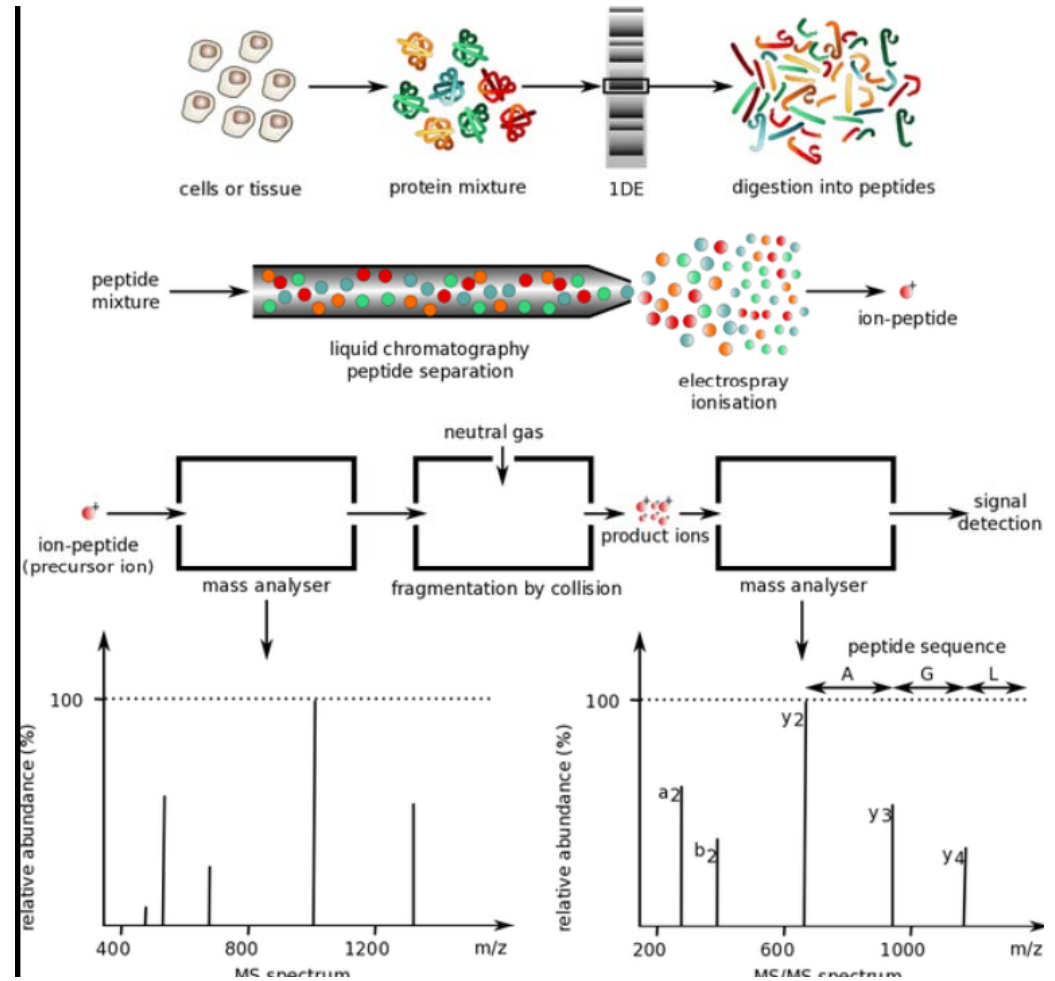
⇒ Až tisíce proteinů v jednom vzorku

⇒ Není nezbytné před MS-identifikací rozdělit jednotlivé proteiny a určit ty, které chceme analyzovat (jako v 2D-PAGE) – možno štěpit proteiny přímo v roztoku

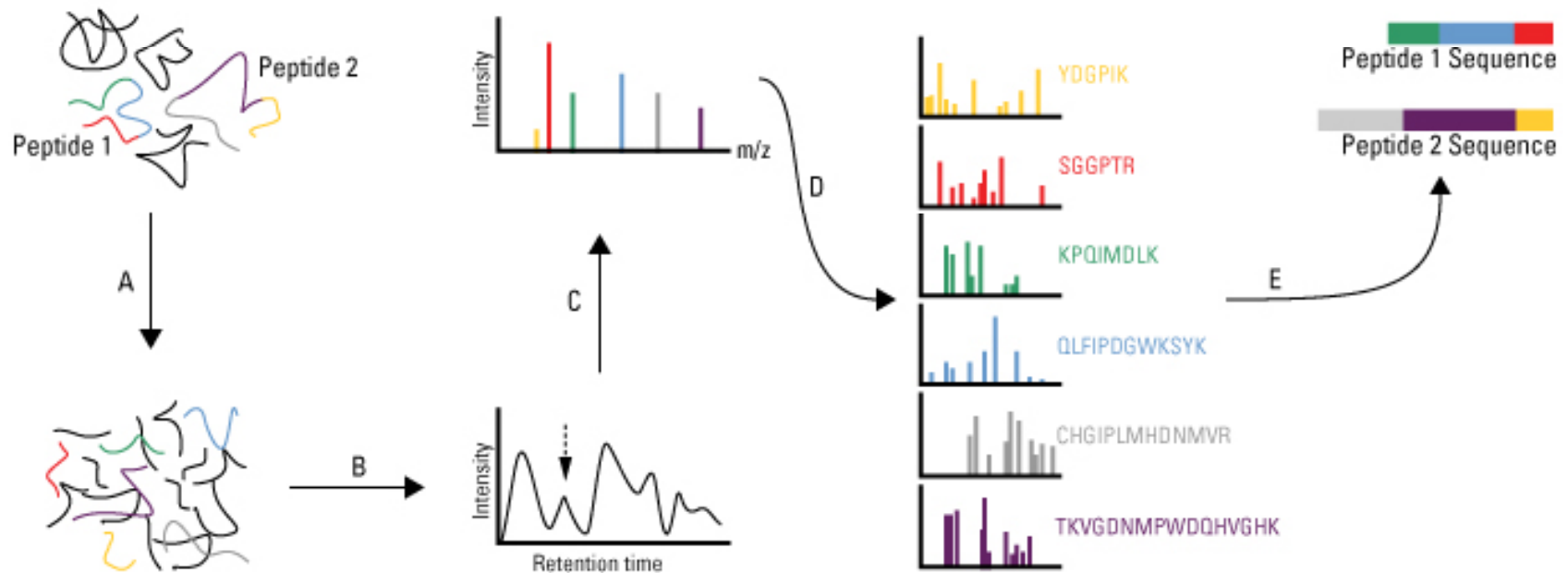
⇒ Příklady postupů:

• 1D-PAGE-LC: Extrakce & 1D-PAGE & štěpení v gelu & LC-MS/MS

• 2D-LC: Extrakce & štěpení v roztoku & 2D-LC-MS/MS (separace peptidů na dvou typech stacionární fáze, např. silný katex v kombinaci s reverzní fází, SCX-RP) => tzv. **MudPIT (multidimensional protein identification technology)**

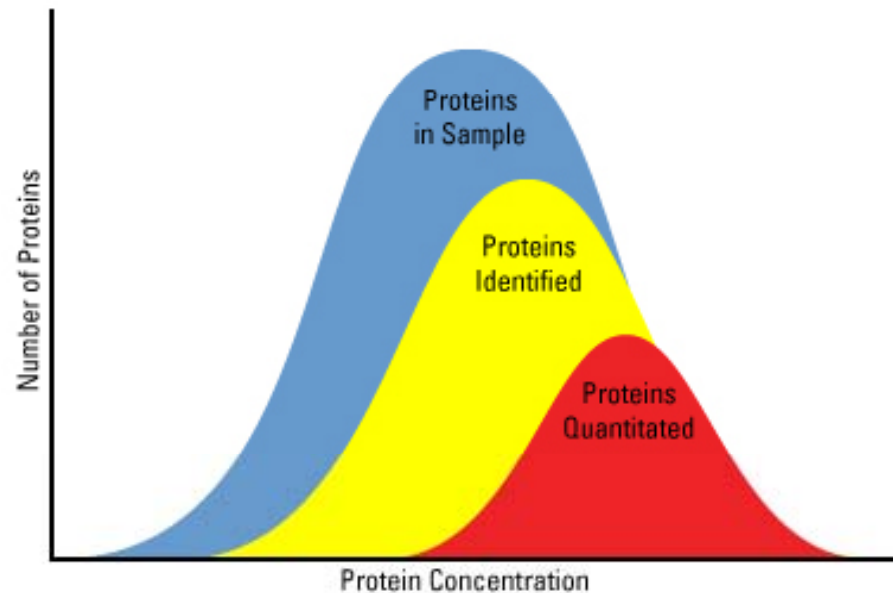


Využití LC-MS/MS v proteomice



Overview of proteomic analysis by MS/MS. Sample proteins are extracted and digested into peptides (A). The sample complexity may then be reduced prior to chemical separation by LC (B). Fractions (indicated by dotted arrow) are then analyzed by MS (C), during which the peptides are ionized and their mass-to-charge ratio (m/z) measured to yield a precursor ion spectrum. Selected ions are then fragmented by collision-induced dissociation (CID) and the individual fragment ions measured by MS (D). The fragment ion spectra are then assigned peptide sequences based on database comparison and protein sequences are predicted (E).

Velké množství proteinů ve vzorku
=> jen část bude identifikována
=> jen část bude kvantifikována

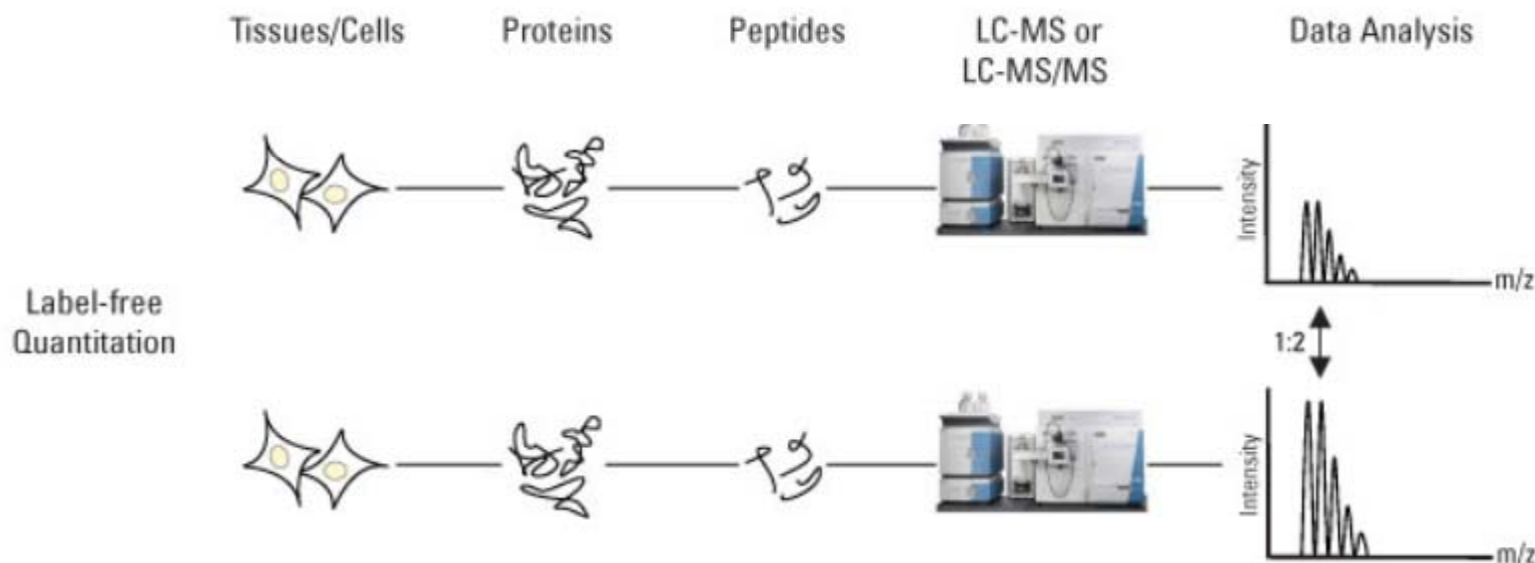


V závislosti na typu aplikace je redukce komplexity vzorku nebo obohacení zájmových proteinů žádoucí:

- organelové proteiny
- fosfoproteiny
- IEF frakce
- frakce dle MW (výseky z 1D-PAGE gelu)
- imunokoprecipitace

Kvantitativní proteomika

- **Relativní** – srovnání s kontrolou
- **Label-free** aplikace

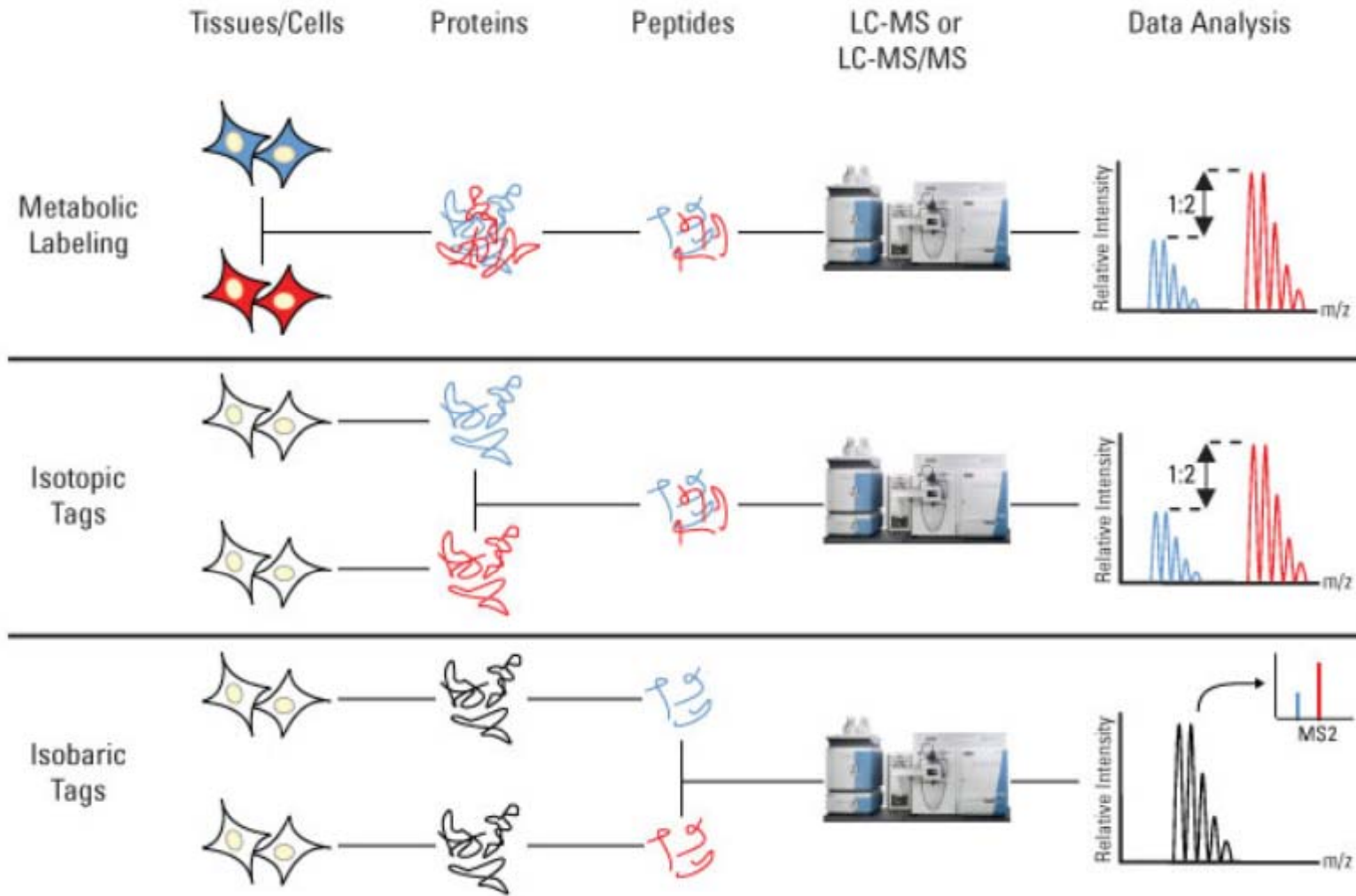


- Individuální příprava a analýza kontrolních a experimentálních vzorků
- Vliv variability v úpravě a přípravě vzorků (izolace subcelulárních frakcí proteinů, při purifikaci, obohacování, elektroforéze, štěpení proteázami) a především mezi jednotlivými LC-MS/MS analýzami => rozdíly mezi vzorky
=> snaha minimalizovat tyto vlivy pomocí izotopového značení

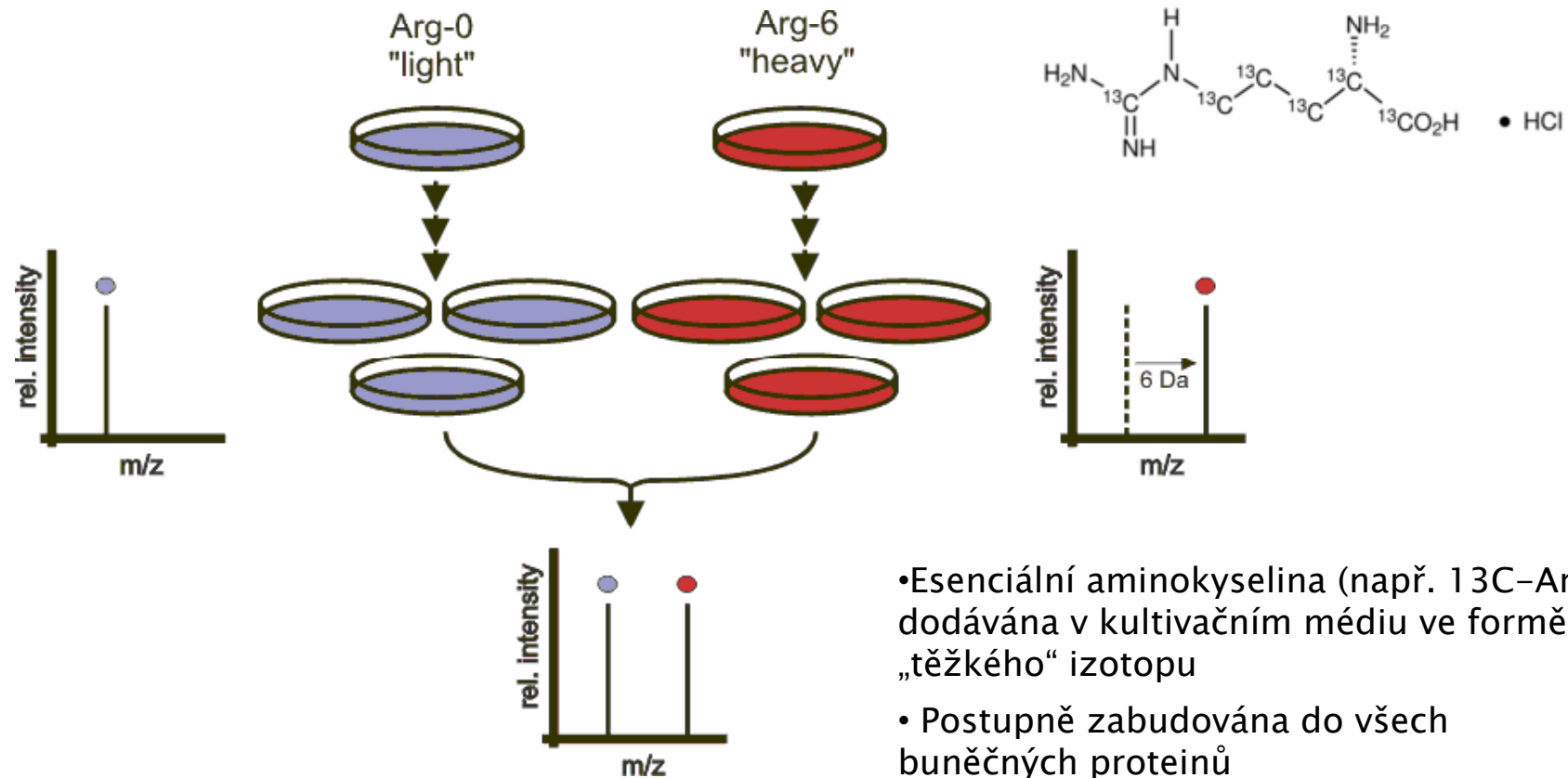
Kvantitativní proteomika

- Izotopové značení

- stabilními izotopy – neradioaktivní!: $^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_4$, ^{18}O
- rozdílně Kontrola vs. Experimentální vzorek
- smíchání kontrolních a experimentálních vzorků / proteinů / peptidů před MS analýzou
- rozdílně značené proteiny / peptidy ze srovnávaných vzorků mají stejné chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti => procesní a analytické postupy ovlivňují stejně kontrolní i experimentální proteiny / peptidy
- rozdíly ve kvantitě kontrolních a experimentálních peptidů budou detekovány až pomocí MS resp. MS/MS



SILAC – Stable isotope labeling by amino acids in cell culture

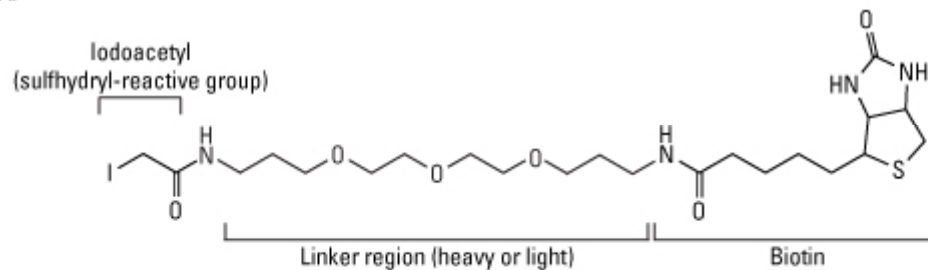


- Esenciální aminokyselina (např. ^{13}C -Arg) dodávána v kultivačním médiu ve formě „těžkého“ izotopu
- Postupně zabudována do všech buněčných proteinů
- Všechny peptidy obsahující -R budou mít m/z větší o 6Da

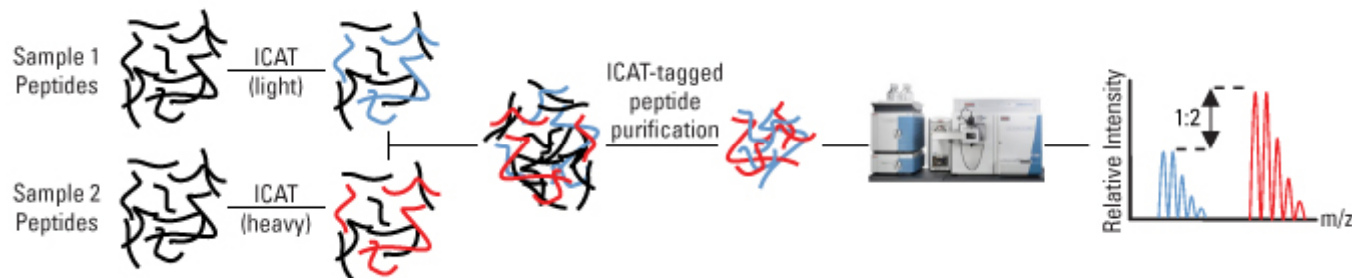
Izotopické značení

- Trypsin
 - Inkorporuje H₂O na C-konec peptidu
 - Štěpení vzorku v přítomnosti značené H₂¹⁸O => označení peptidů
- GIST – Acylace aminoskupin naštěpených peptidů ²H-začleným N-acetoxysukcimidem
- Dimethylace formaldehydem v přítomnosti ²H₂O => deuterované metylskupiny
- ICAT – isotope-coded affinity tag
 - deuterovaný (d8) iodoacetyl

A.

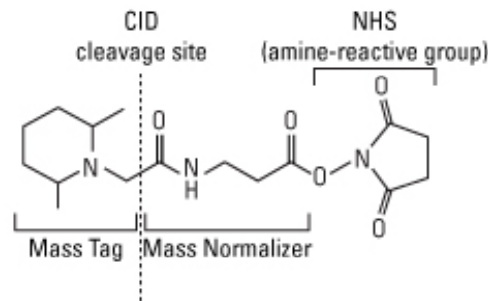


B.



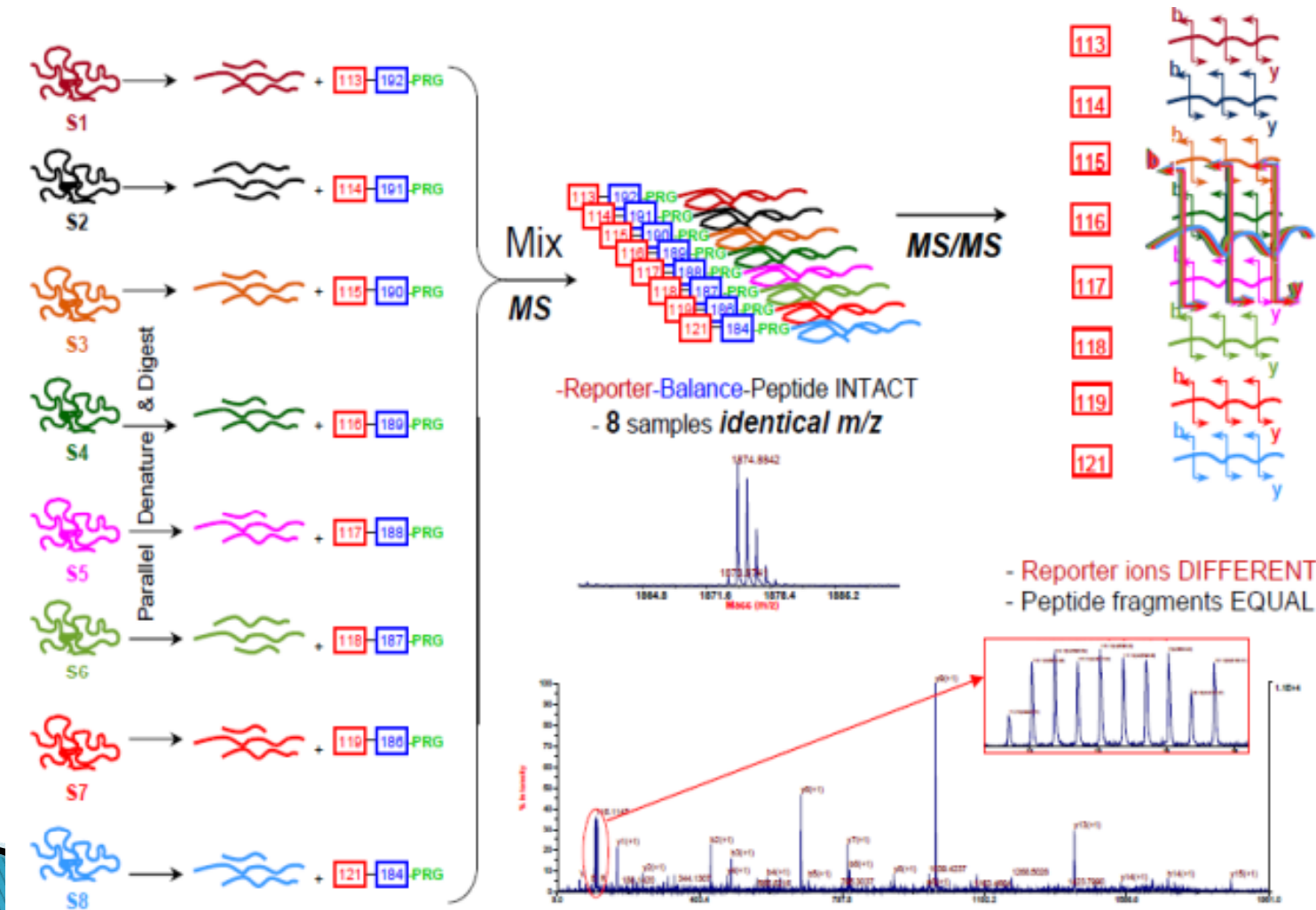
Izobarické značení

- na peptidy po štěpení je navázána značka o stejné hmotě => nedochází k ovlivnění LC separace, ionizace
- Tandem Mass Tags – TMT – systém kombinující tzv. Mass Tag a Mass Normalizer
 - Mass Tag – unikátní kombinace ^{13}C and ^{15}N zaručuje unikátní hmotnost pro daný Tag
 - Mass Normalizer – komplementární kombinace izotopů ^{13}C and ^{15}N vyvažuje hmotnost Mass Normalizeru vůči Mass Tag tak, aby součet jejich hmotností byl stejný napříč různými TMT => peptidy z různých vzorků lze označit různými TMT a pak zkombinovat a analyzovat v jednom LC-MS/MS běhu



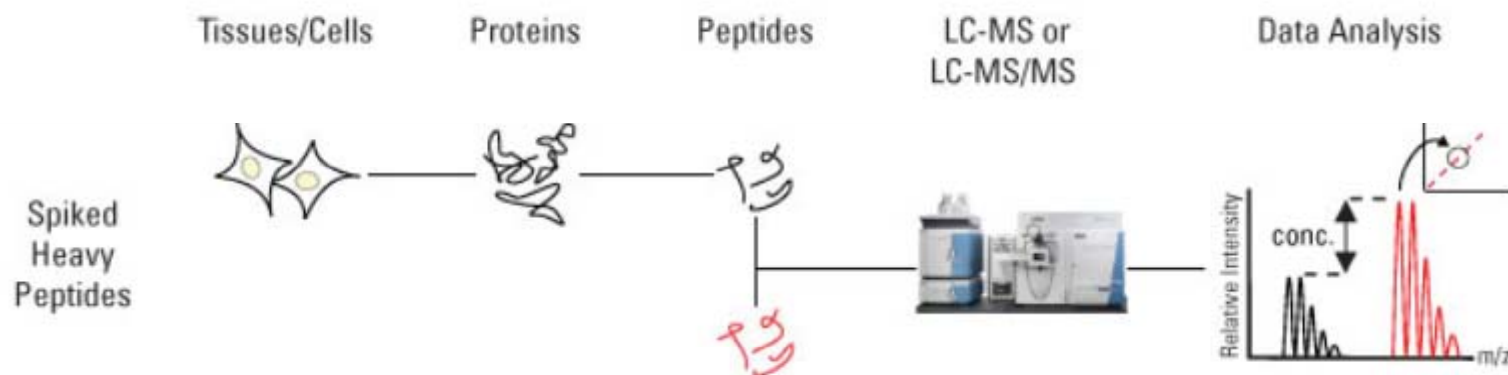
- k odštěpení Mass Normalizeru dochází až během CID (kolizí indukovaná disociace) v MS/MS
- iTRAQ – obdobný princip, značení pomocí Reporter/Balance Peptide

iTRAQ – Isobaric tag for relative and absolute quantitation

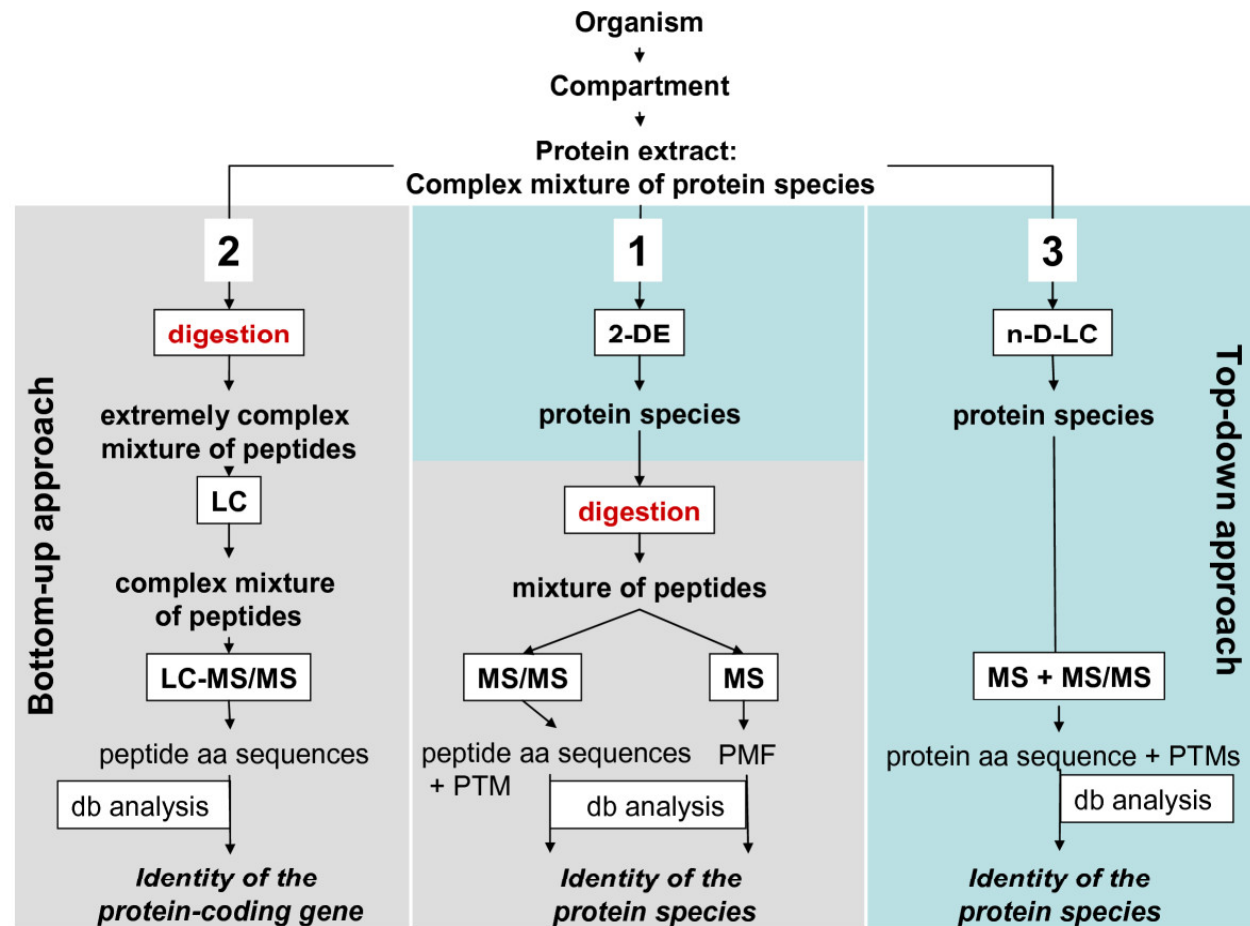


Kvantitativní proteomika

- ▶ **Absolutní**
- ▶ Použití známých koncentrací syntetických těžkých izotopologů cílových peptidů => přídavek do vzorku
- ▶ Po LC-MS analýze umožní výpočet absolutní koncentrace cílového peptidu



Přehled strategií v proteomice



Top-down: ionizace intaktních proteinů nebo velkých fragmentů (<50 kDa) a separace pomocí n-dimenzionální kapalinové chromatografie (LC)

Bottom-up: štěpení proteinů na peptidy a jejich LC případně 2D-LC separace