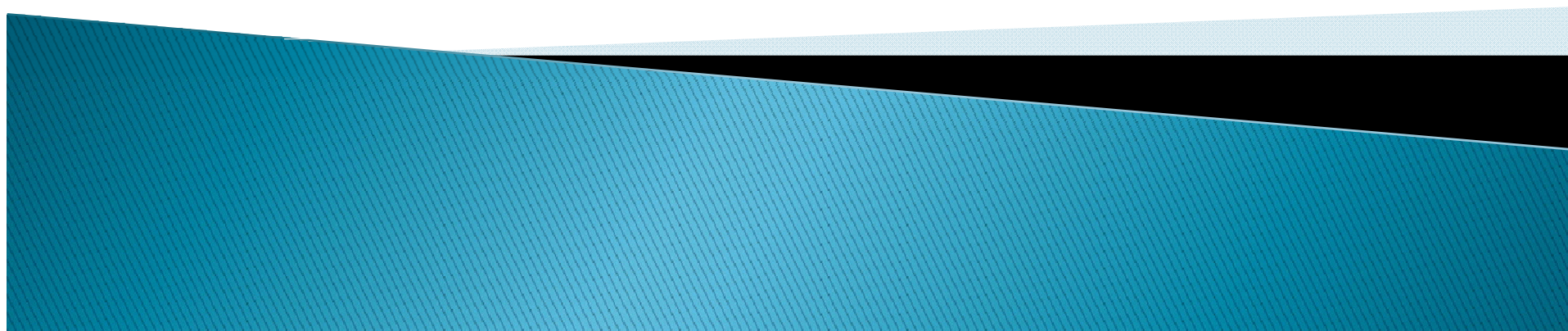


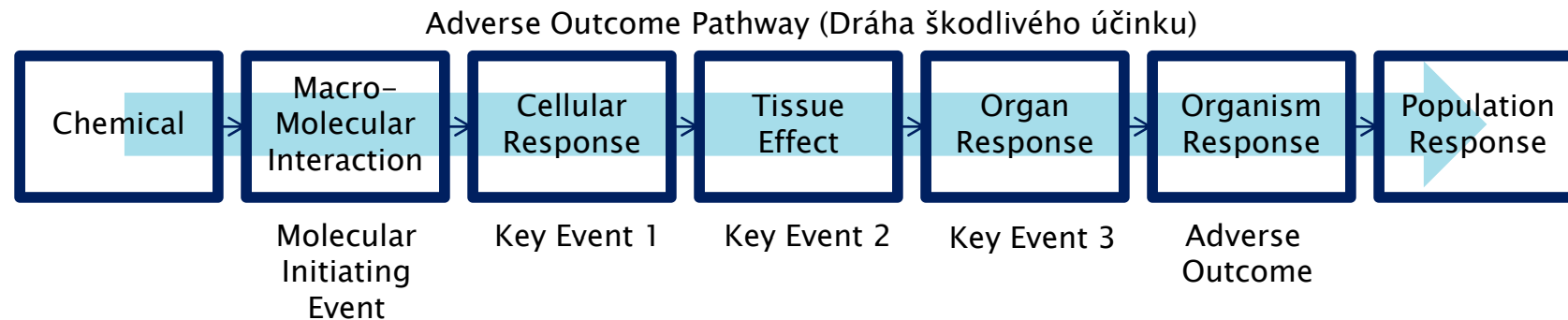
Studium proteinů v ekotoxikologii

Pavel Babica



Studium proteinů v (eko)toxikologii

- (Eko)toxikologie: studium a predikce škodlivých účinků chemických látek na organismy
- Účinky na vyšších úrovních biologické organizace (jedinec, populace, společenstvo) jsou zprostředkovány změnami na nižších úrovních (orgány, tkáně, buňky, makromolekuly)



• Proteiny

- klíčové biomakromolekuly
- jsou přímým cílem působení řady toxikantů (strukturní proteiny, receptory, enzymy)
- jsou nepřímo ovlivněny působením toxikantů (poškození DNA → změny aktivity proteinů, signálních a regulačních drah)
- jakékoli změny (vč. škodlivých účinků) v organismu (fenotypu) jsou dány/doprovázeny změnami v genové expresi

Studium proteinů v (eko)toxikologii

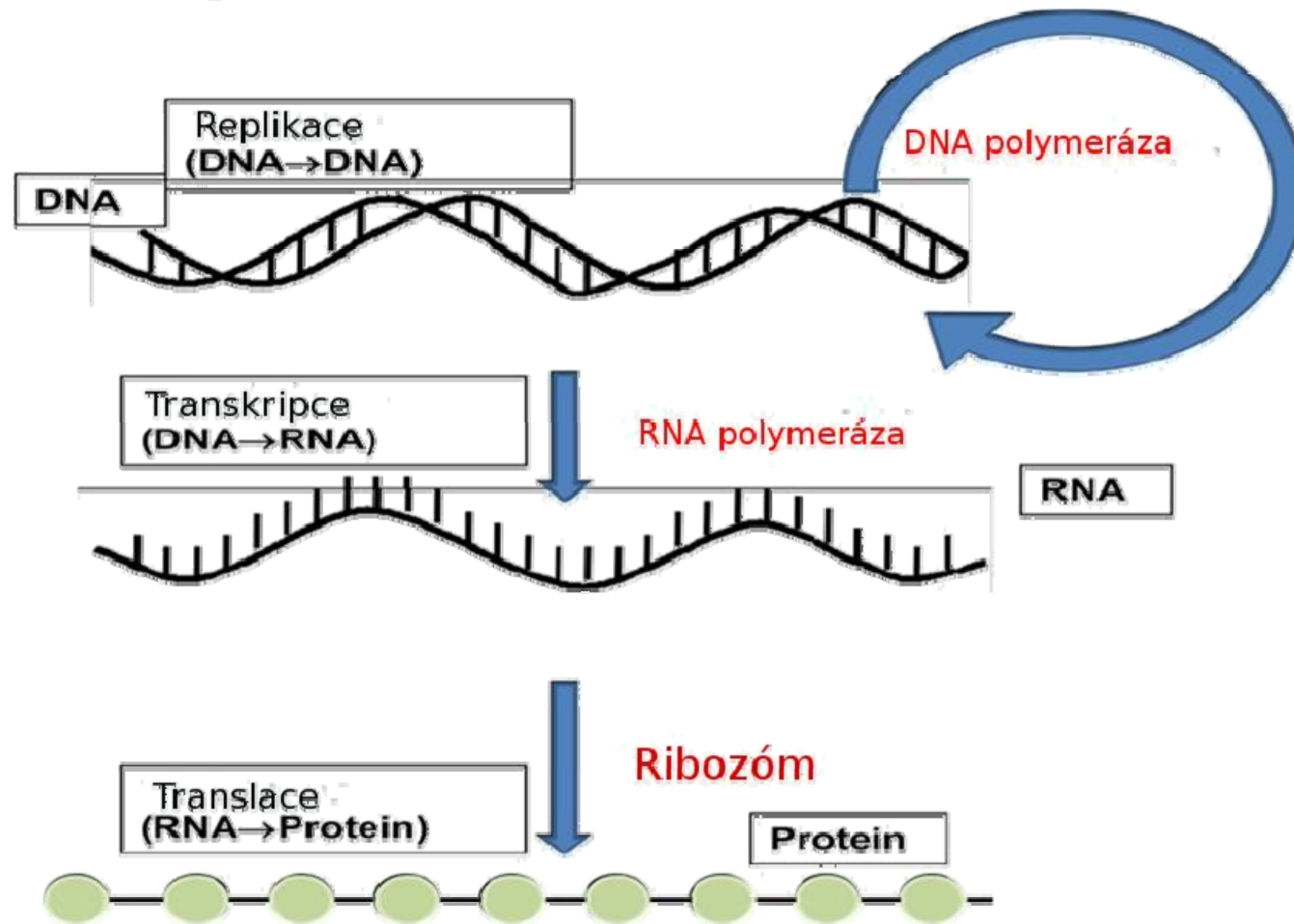
Proteiny

- Vlastnosti – struktura, fyzikálně–chemické vlastnosti
- Funkce
- Metody studia
 - Izolace, separace, denaturace, purifikace/frakcionace
 - Kvantifikace
 - Identifikace
 - Konkrétních zájmových proteinů (**hypothesis–based**)
 - Sledování globálních změn v proteomu (**exploratory approach: proteomika**)



Proteiny (Bílkoviny)

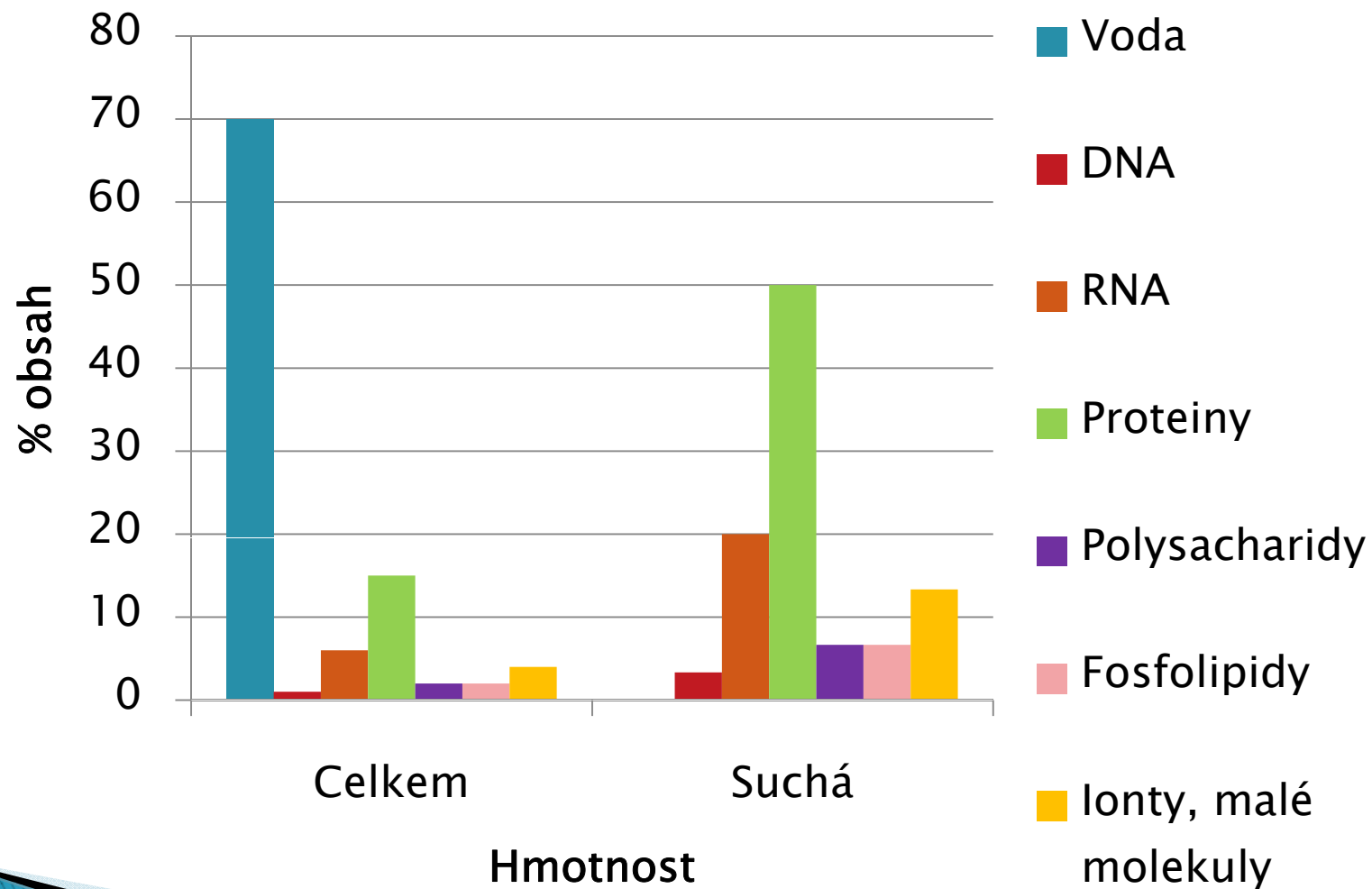
- ▶ Finální produkt genové exprese



Proces přenosu genetické informace

(www.tulane.edu/~wiser/methods/notes.pdf)

Složení bakteriální buňky



Funkce proteinů

▶ Katalýza – enzymy

- Metabolismus – energetický (RuBisCo, pepsin), detoxikace (cyt P450)
- Syntéza makromolekul – DNA polymeráza, reverzní transkriptáza
- Signálování a regulace – acetylcholinesteráza, proteinkináza C, HAT/HDAC ...

▶ Strukturní funkce – mechanická opora

- Extracelulární – kolagen, elastin; Intracelulární – tubulin, aktin; Mezibuněčné spoje – occludin ...

▶ Transport molekul

- Hemoglobin, lipoproteiny, iontové kanály a pumpy ...

▶ Pohyb

- Myosin (svaly), kinesin & mikrotubuly (pohyb organel v buňkách), dynein (bičíky, brvy)...

▶ Zásobní funkce

- Feritin (játra), kasein, ovalbumin ...

▶ Signální a regulační funkce

- Růstové faktory a hormony – endokrinní (insulin), parakrinní (EGF, cytokiny) ...
- Transkripční faktory – obecné (TATA-binding proteins), „speciální“ – HSF, myc, CREB ...
- Receptory – membránové (GPCR, RTK, AChR, rhodopsin), vnitrobuněčné (ER, AhR, PPAR, RXR/RAR) ...

▶ Imunita

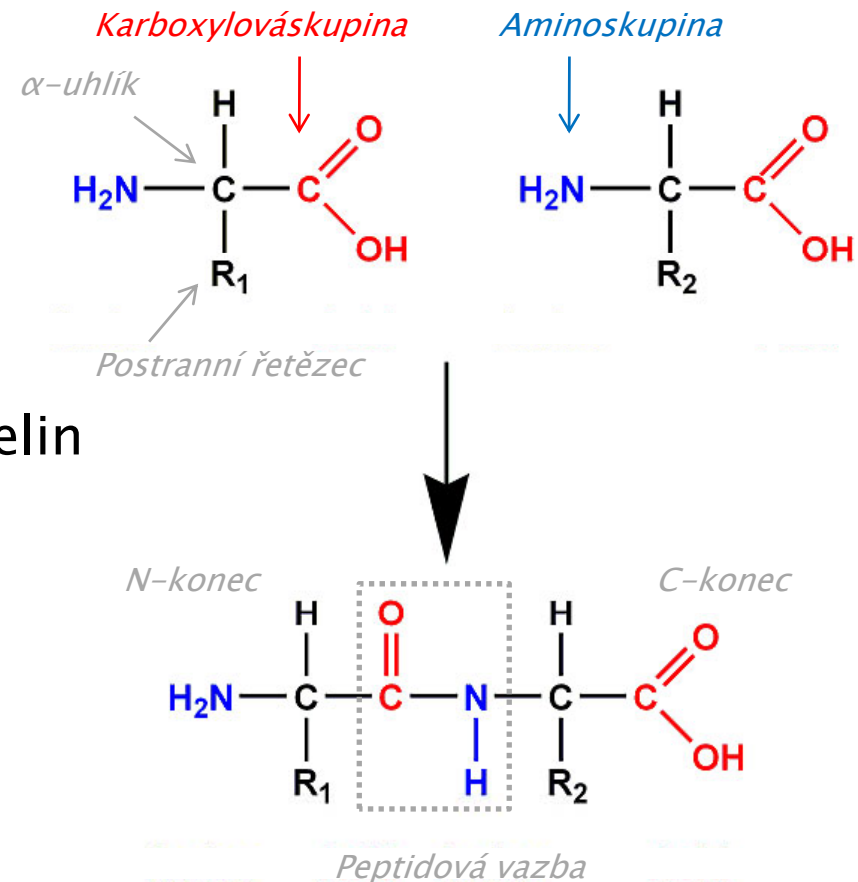
- Likvidace patogenu: Komplement, Protilátky, Host–defense peptidy (defensiny, magainin)

◦ Rozpoznávání: MHC glykoproteiny

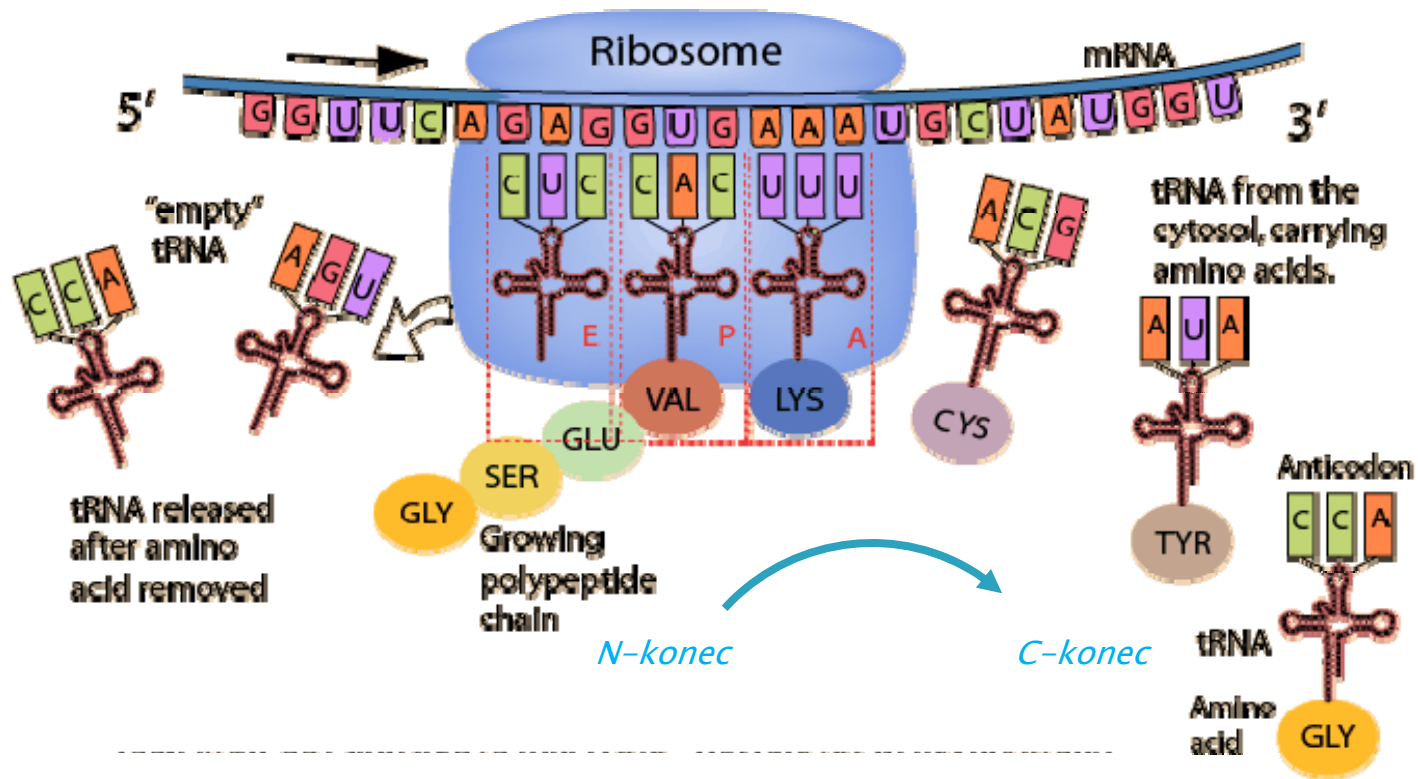
▶ Další (hemokagulace, luminiscence, toxiny ...)

Proteiny

- ▶ Proteiny = polypeptidy
- ▶ Řetězce aminokyselin
 - α-aminokyseliny
 - L-stereoisomery
 - Amfionty
 - 20 proteinogenních aminokyselin
- ▶ Peptidová vazba
 - Karbonylová + aminoskupina
 - N-konec / C-konec
- ▶ Proteosyntéza
 - Translace
 - Ribozómy – dle RNA templátu



Syntéza proteinů

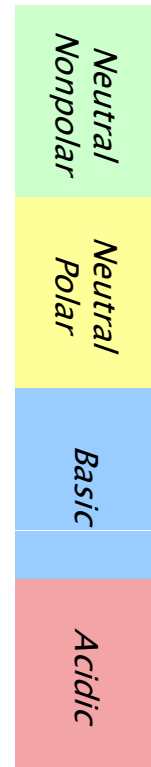


Iniciace - iniciační kodon (AUG), N-koncová aminokyselina
 Elongace - prodlužování řetězce amino->karboxy směrem
 Terminace - terminační / stop kodon

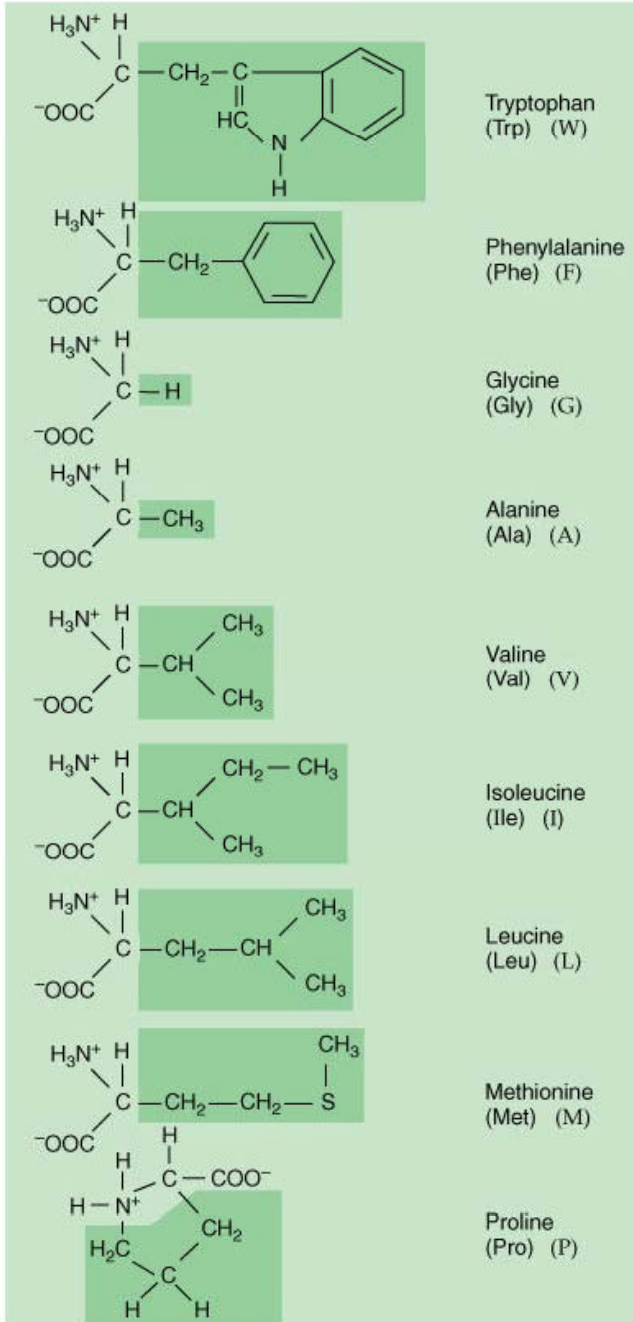
Genetický kód

- ▶ soubor pravidel pro převod genetické informace v DNA (respektive RNA) na primární strukturu bílkovin – tj. pořadí aminokyselin v řetězci
- ▶ 64 → 20(21) aminokyselin, 1x start kodon, 3x stop kodon

Standardní genetický kód									
1. báze	2. báze								3. báze
	U		C		A		G		
U	UUU	Phenylalanine (Phe/F)	UCU	Serine (Ser/S)	UAU	Tyrosine (Tyr/Y)	UGU	Cysteine (Cys/C)	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leucine (Leu/L)	UCA		UAA	STOP (Ochre)	UGA	STOP (Opal)	A
	UUG		UCG		UAG	STOP (Amber)	UGG	Tryptophan (Trp/W)	G
C	CUU	Isoleucine (Ile/I)	CCU	Proline (Pro/P)	CAU	Histidine (His/H)	CGU	Arginine (Arg/R)	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	CGA	A		
	CUG		CCG		CAG	CGG	G		
A	AUU	Methionine (Met/M)	ACU	Threonine (Thr/T)	AAU	Asparagine (Asn/N)	AGU	Serine (Ser/S)	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	AGA	A		
	AUG ^A		ACG		AAG	Lysine (Lys/K)	AGG	Arginine (Arg/R)	G
G	GUU	Valine (Val/V)	GCU	Alanine (Ala/A)	GAU	Aspartic acid (Asp/D)	GGU	Glycine (Gly/G)	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	GGA	A		
	GUG		GCG		GAG	GGG	G		



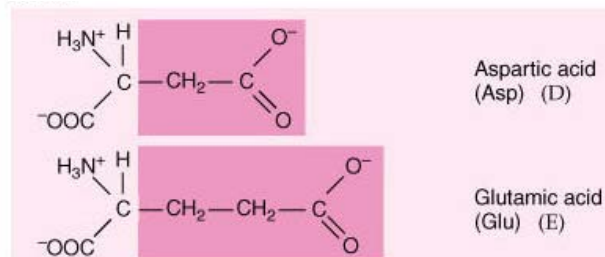
Neutral, nonpolar



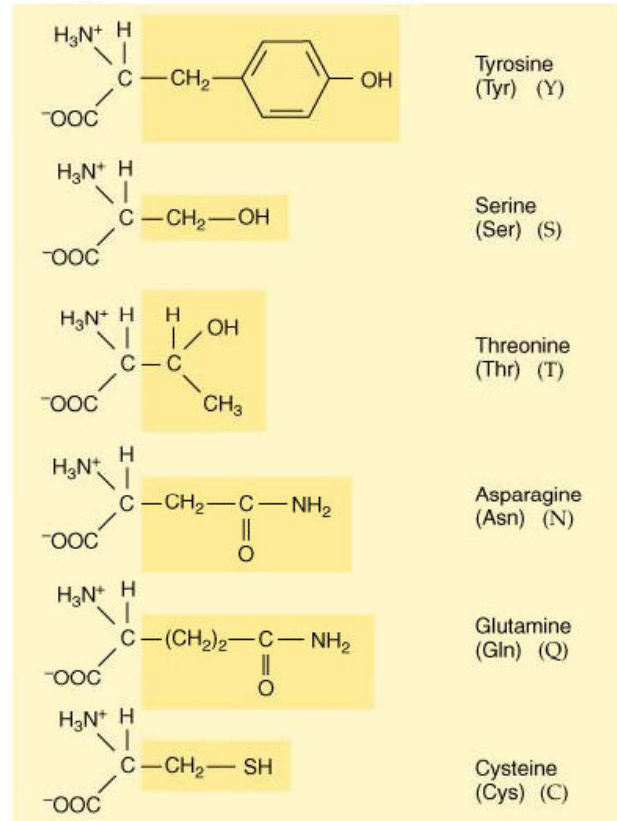
Aminokyseliny

- α -aminokyseliny
- L-stereoisomery
- 20 proteinogenních aminokyselin (+ Selenocystein)
- Neutrální nepolární *WFGAVILMP*
- Neutrální polární *YSTNQC*
- Kyselé *DE*
- Zásadité *KRH*
- Esenciální
 - Člověk: *FVTWMLIKH (RCGQPY)*
- Postranlační modifikace

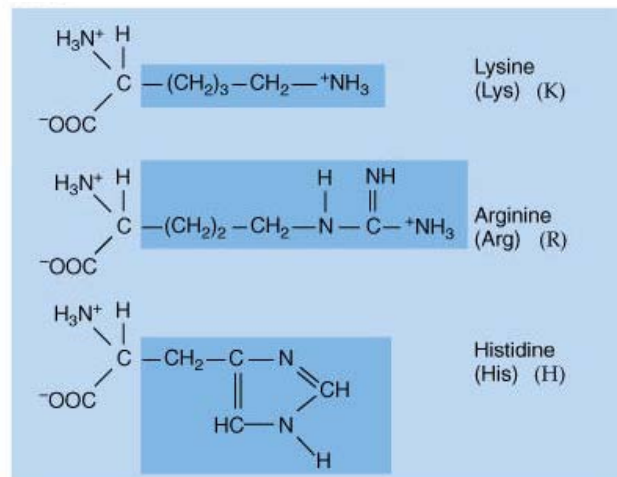
Acidic



Neutral, polar

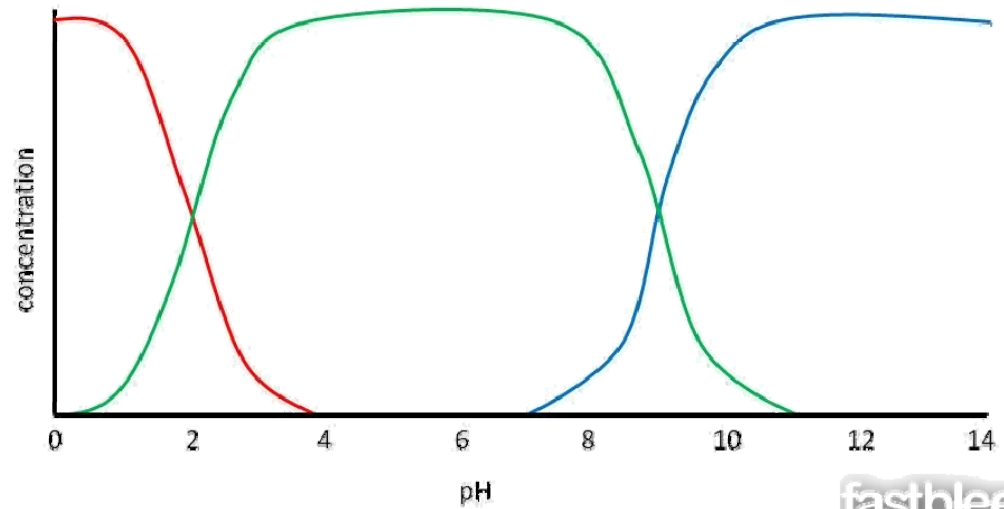
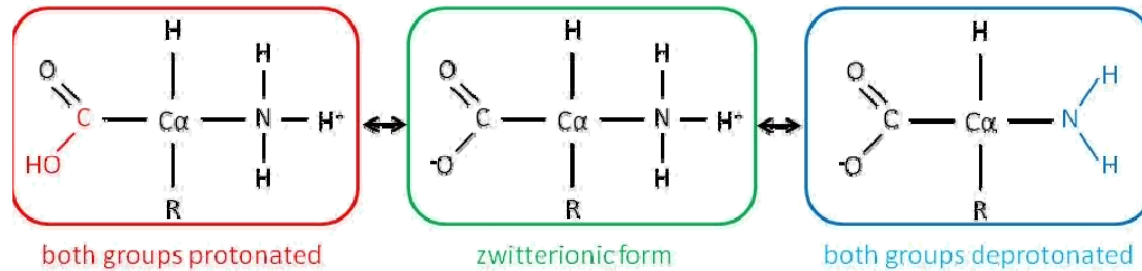


Basic



- Amfionty

- $\text{NH}_3^+ / \text{COO}^-$

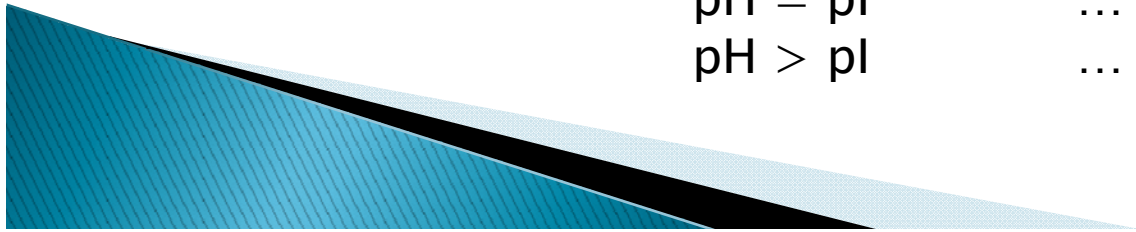


- Isoelektrický bod: pH(I) , pI , IEP

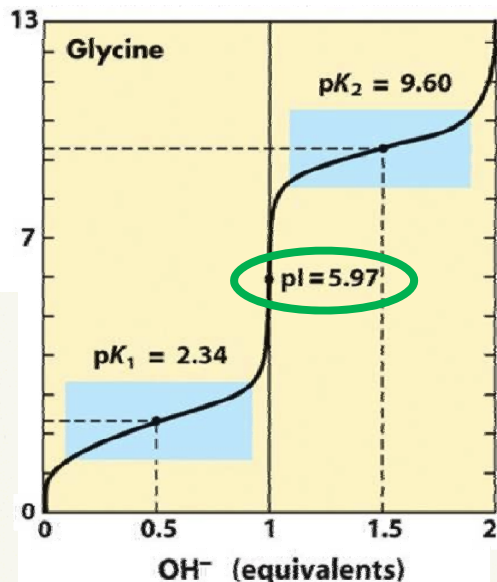
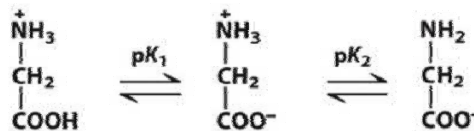
- hodnota pH při které má molekula v roztoku nulový volný náboj

$\text{pH} < \text{pI}$... kladný náboj
$\text{pH} = \text{pI}$... nulový náboj
$\text{pH} > \text{pI}$... záporný náboj

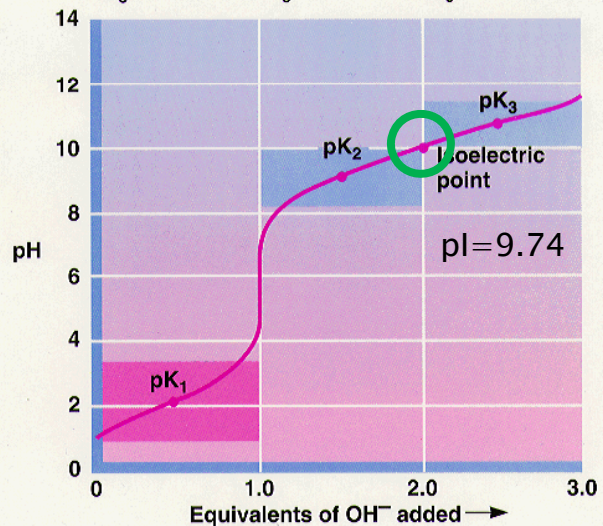
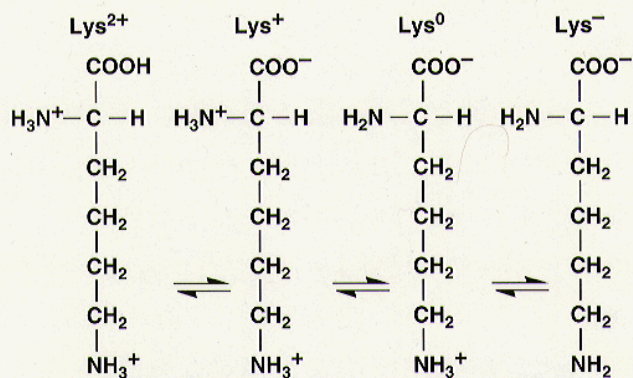
fastbleep))



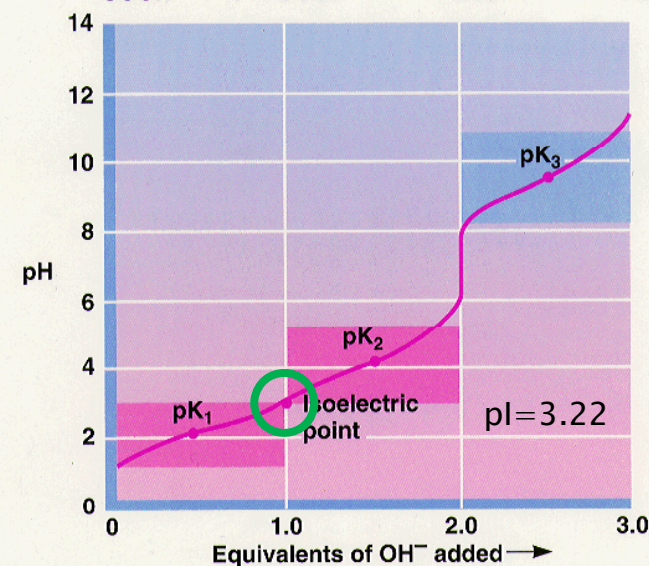
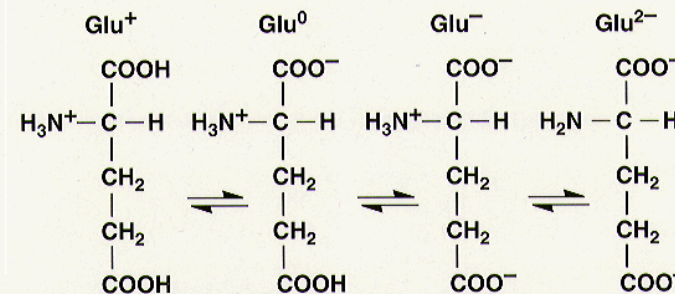
Glycine



Lysin



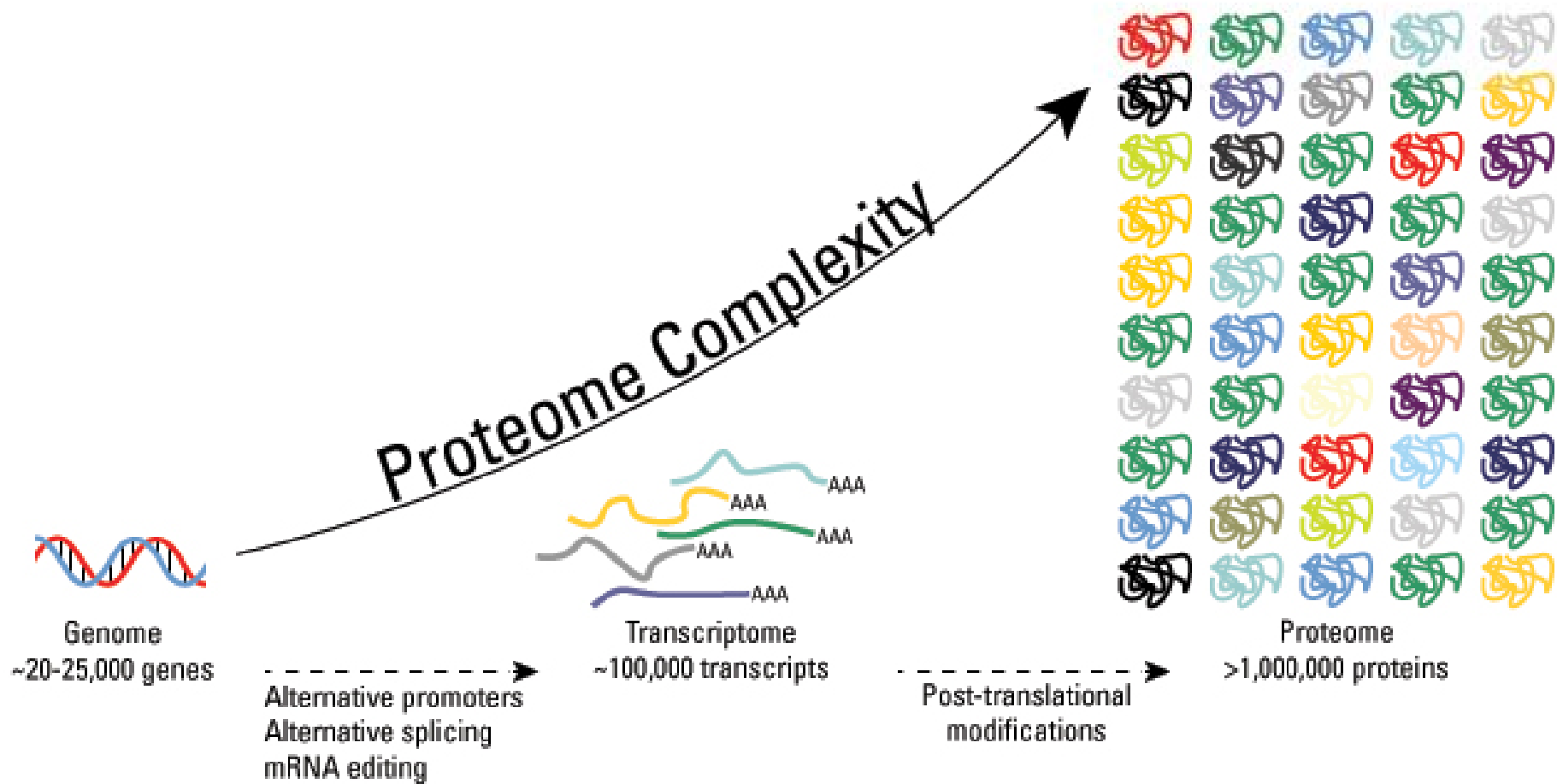
Glutamová kyselina



Post-translační modifikace

- ▶ Skládání proteinů (folding)
- ▶ Štěpení (proteolýza)
- ▶ Modifikace aminokyselinových zbytků
 - Glykosylace => glykoproteiny
 - Fosforylace => fosfoproteiny
 - Serin, Threonin, Tyrosin (O-, fosfoestery)
 - Histidin (N-, fosforamidát)
 - Lipidylace
 - N-Myristoylace, S-palmitoylace, S-prenylace (farnesyl, geranylgeranyl), GPI-kotva
 - Acylace
 - Acetylce/Deacetylce (např. histony), formyl-, propionyl-, malonyl-, sukcinyl-, butyryl-...
 - Alkylace - nejč. methylace
 - Oxidace, hydroxylace, sulfatace, γ -karboxylace
 - S-nitrosylace
 - Adenylace (Adenosinmonofosfát), Ubikvitinylace (Ubikvitin), Sumoylace (SUMO1), ADP-ribosylace, S-glutathionylace
 - Arginylace, polyglutamylace, polyglycinilace
 - Vazba prostetických skupin (lipoát, flavinová skupina, hem C...)
 - Disulfidické můstky - Cystein => „Cystin“

PROTEOM – soubor proteinů exprimovaných genomem, organismem, tkání, buňkou v určitém okamžiku



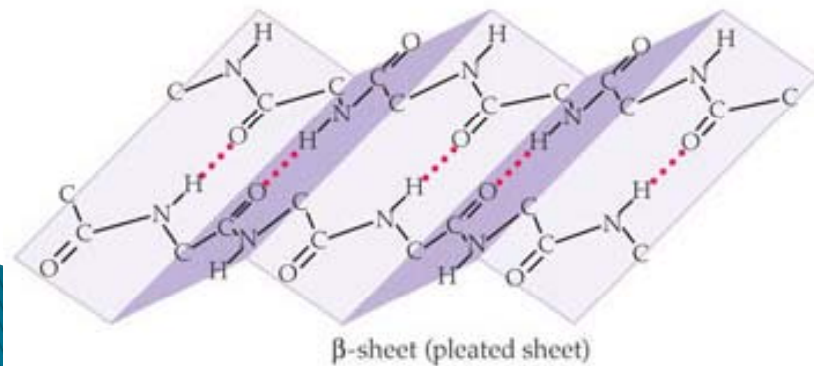
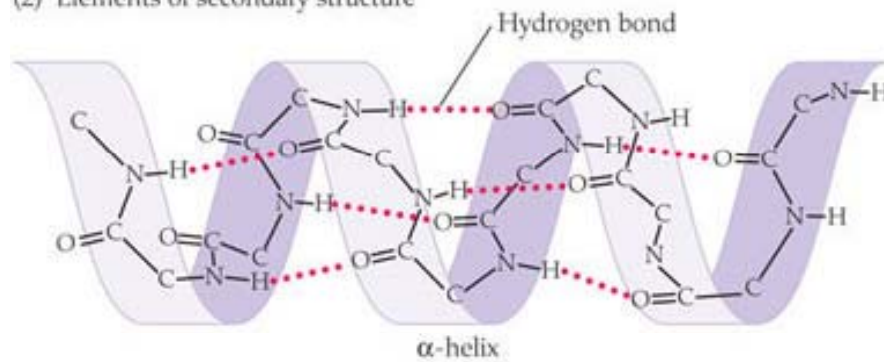
Struktura proteinů

Primární, sekundární, terciární, kvartérní

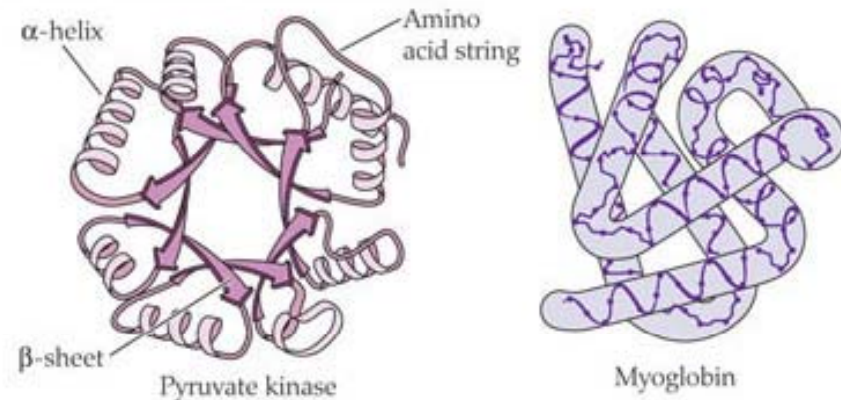
(1) Primary structure



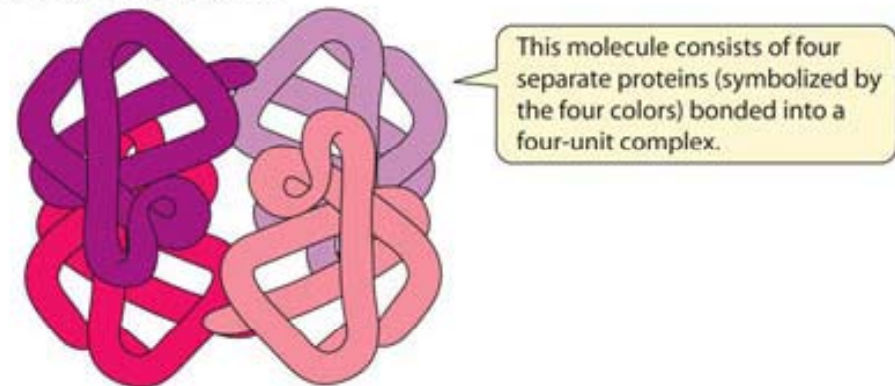
(2) Elements of secondary structure



(3) Tertiary structure drawn in two ways

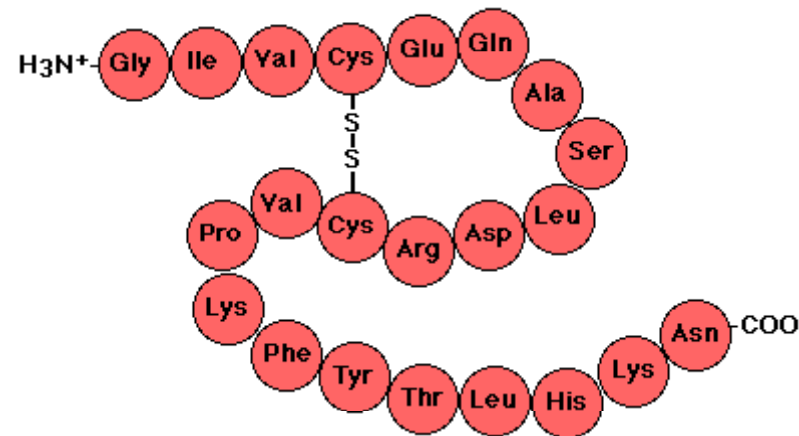


(4) Quaternary structure



Struktura proteinů

- ▶ Primární struktura = pořadí aminokyselin v řetězci
 - Dána pořadím nukleotidů v DNA/RNA
 - Unikátní pro daný protein
 - Definuje strukturu a funkci
 - Kovalentní peptidová vazba
 - 20 proteinogenních aminokyselin (+ seCys)
 - Postranlační modifikace



Struktura proteinů

▶ Primární struktura= pořadí aminokyselin v řetězci

•Velikost proteinů

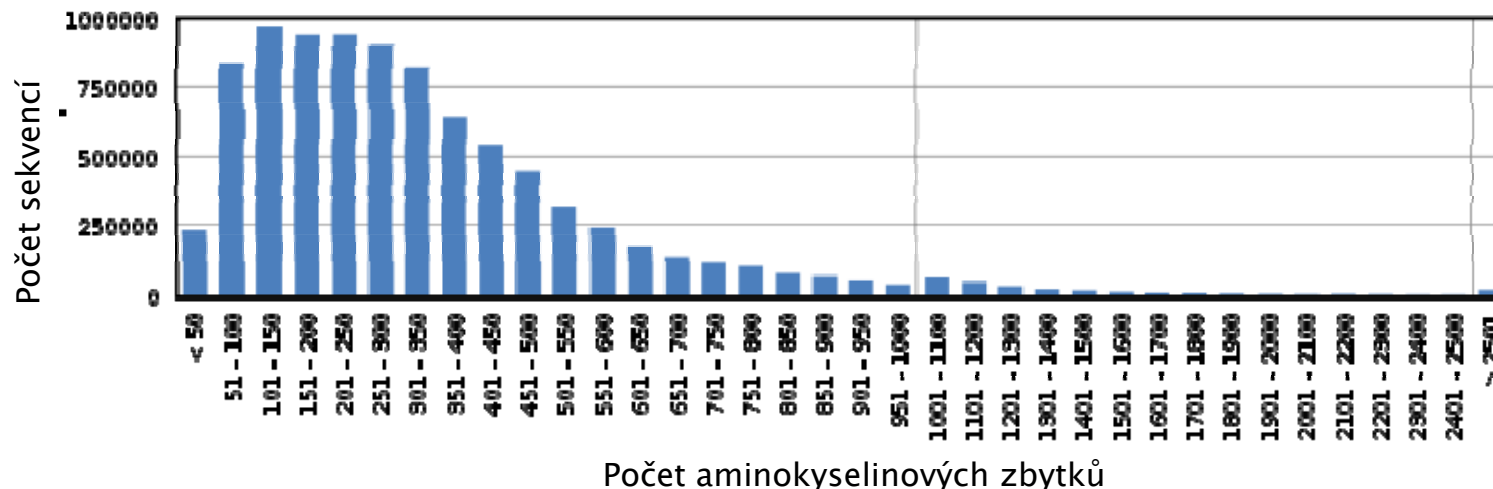
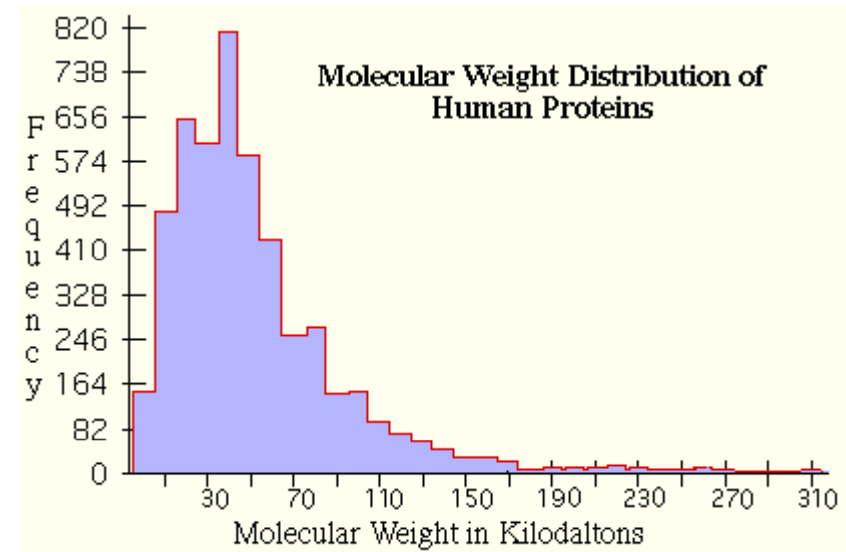
•Od 10 až >10000 zbytků aminokyselin, typicky 50–2000 (<10 ... peptidy)

•(Brocchieri & Karlin, 2005):

•cca 34 000 lidských proteinů

•medián 375 zbytků aminokyselin

• Molekulová hmotnost 1–1000 kDa, typicky 10–200kDa, medián cca 50 kDa

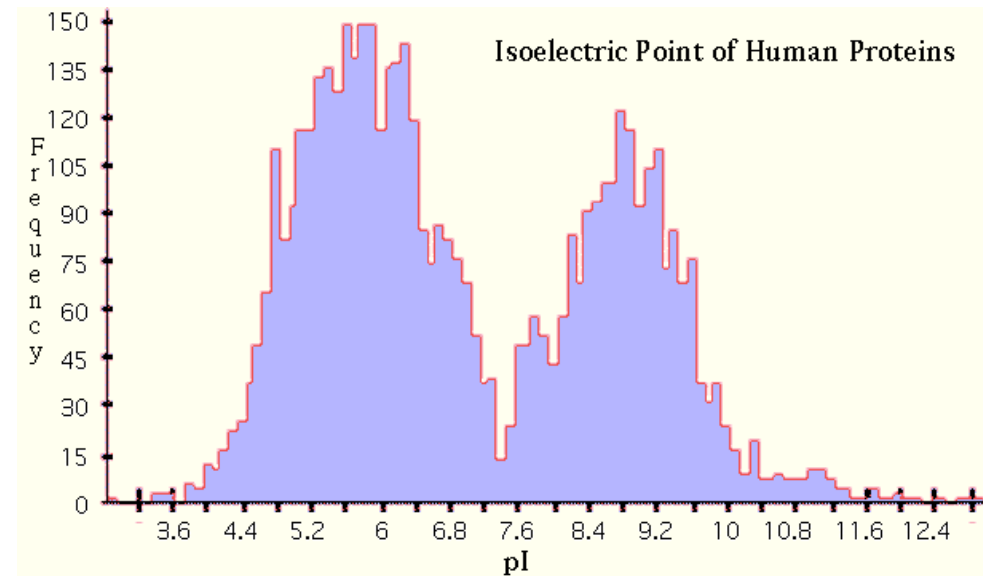


Struktura proteinů

- ▶ Primární struktura = pořadí aminokyselin v řetězci

• Isoelektrický bod

- Počet a podíl zbytků kyselých a bazických aminokyselin
- Kyselé: Asp (D), Glu (E)
- Zásadité: Lys (K), Arg (R), His (H)
- Význam PTM (fosforylace → pokles pI)
- Kyselé proteiny – nízká hodnota pI, negativní náboj při fyziologickém pH
- Bazické proteiny – vysoká hodnota pI, kladný náboj při fyziologickém pH



- Online pI / MW kalkulátory

- http://web.expasy.org/compute_pi/

- <http://isoelectric.ovh.org/>

- Zohlednění postranslačních modifikací:

- <http://proteomics.mcw.edu/promost.html>

Studium struktury proteinů

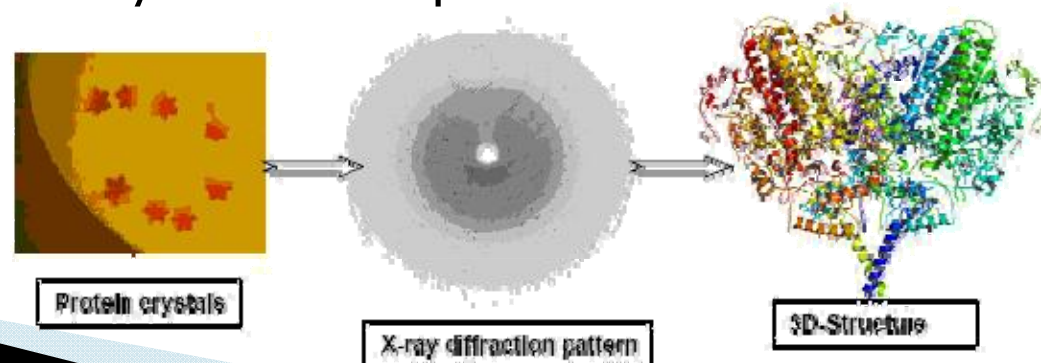
- Primární struktura

- Predikce ze sekvence DNA nebo mRNA
- Edmanova degradace (automatizované sekvenátory)
- Hmotnostní spektroskopie



- Sekundární, terciární struktura

- Rentgenová strukturní analýza (X-ray crystallography)
- Protein NMR
- Elektronová kryomikroskopie

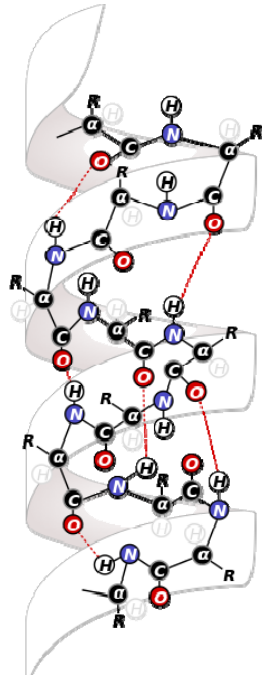


Struktura proteinů

▶ Sekundární struktura – lokální prostorové uspořádání

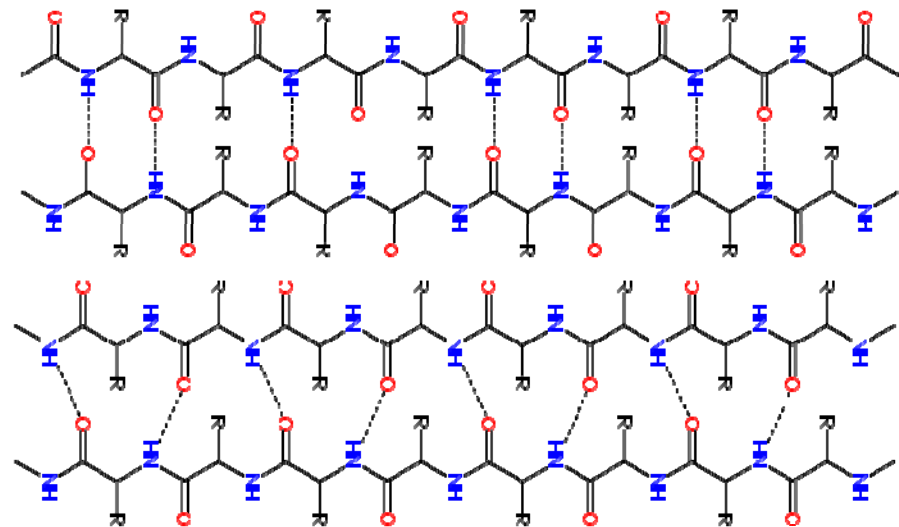
- Vodíkové můstky
- Základní modely skládání :

α šroubovice
(3.6_{13} helix)



- 3_{10} helix, π helix, random coil...

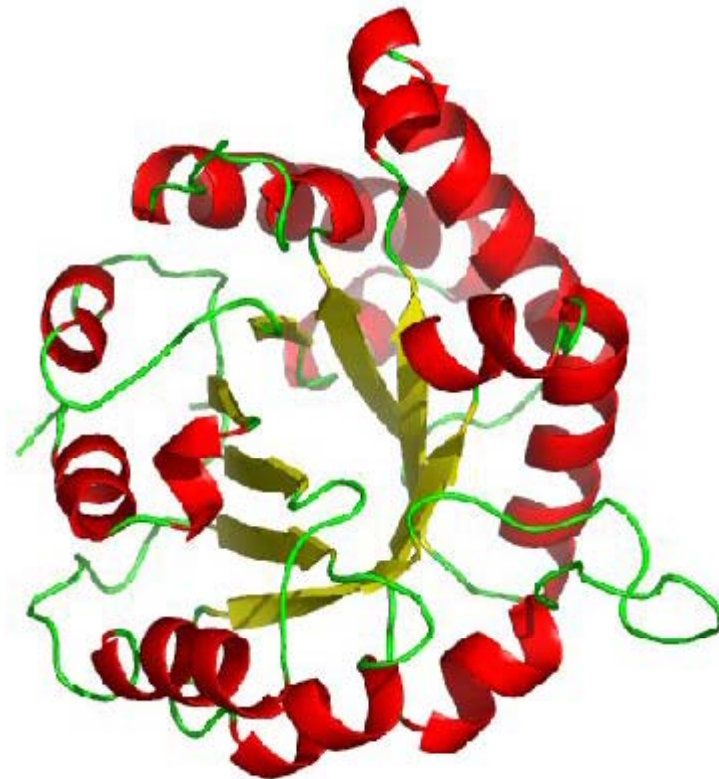
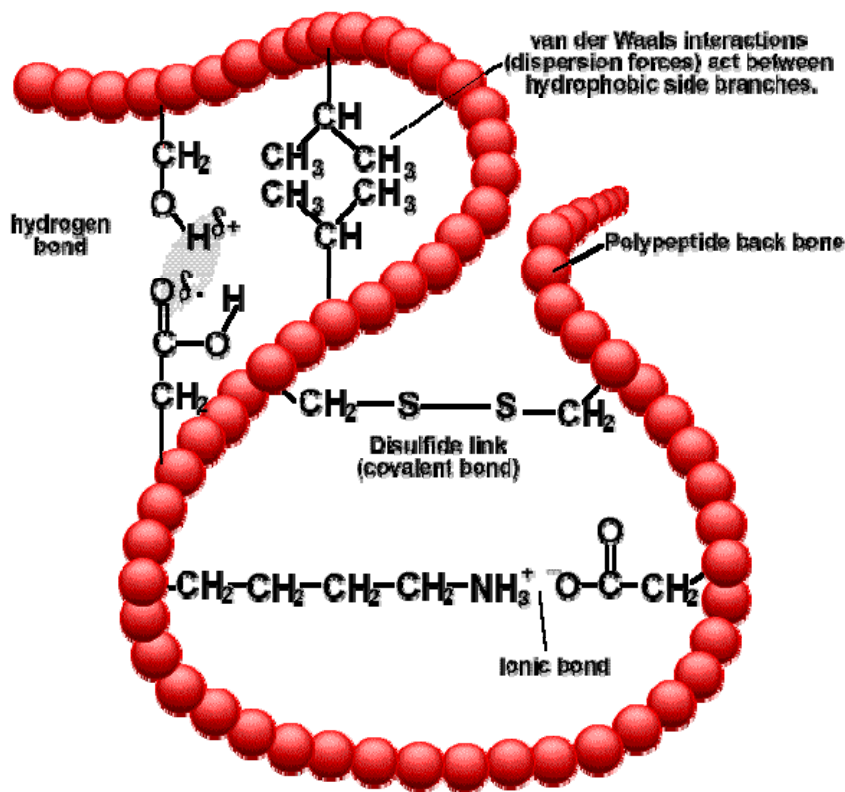
β skládaný list



Supersekundární struktury / motivy:
Beta vlásenka, Řecký klíč, Omega smyčka, Helix–smyčka–helix, Zn prsty, Helix–obrátko–helix...

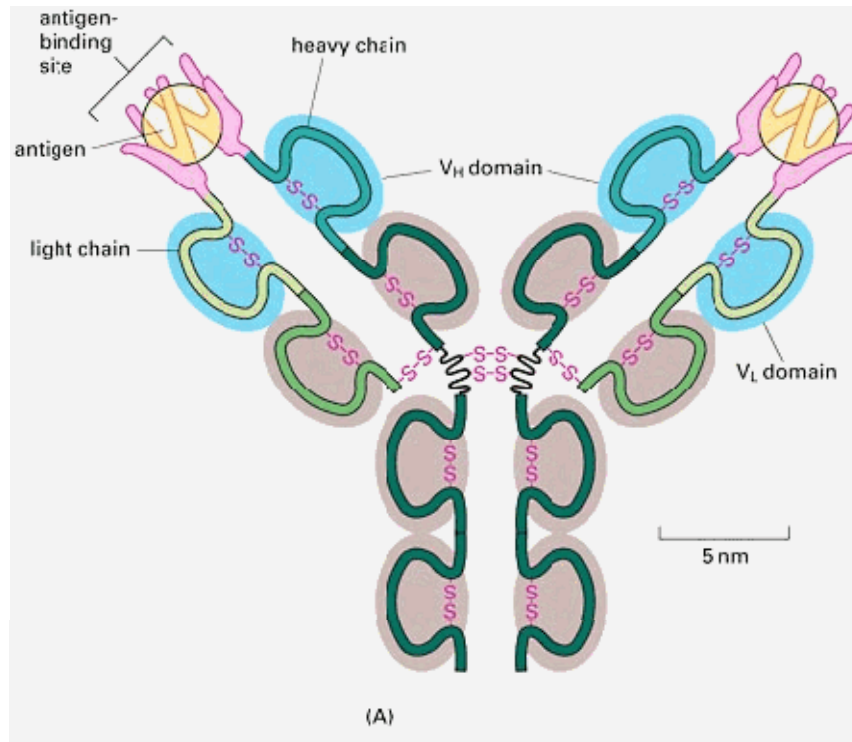
Struktura proteinů

- ▶ Terciární struktura – celkové prostorové uspořádání řetězce
- Vodíkové můstky , Hydrofobní interakce (van der Waals), Iontové síly, Disulfidové můstky

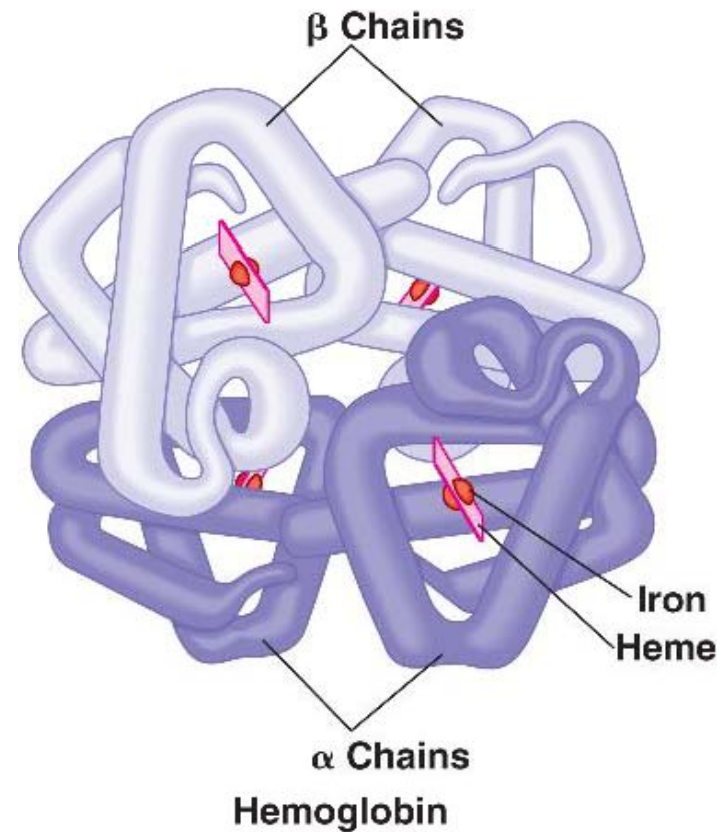


Struktura proteinů

- ▶ Kvartérní struktura – podjednotkové uspořádání
 - Seskupení tvořené několika polypeptidovými řetězci / proteiny



Imunoglobuliny

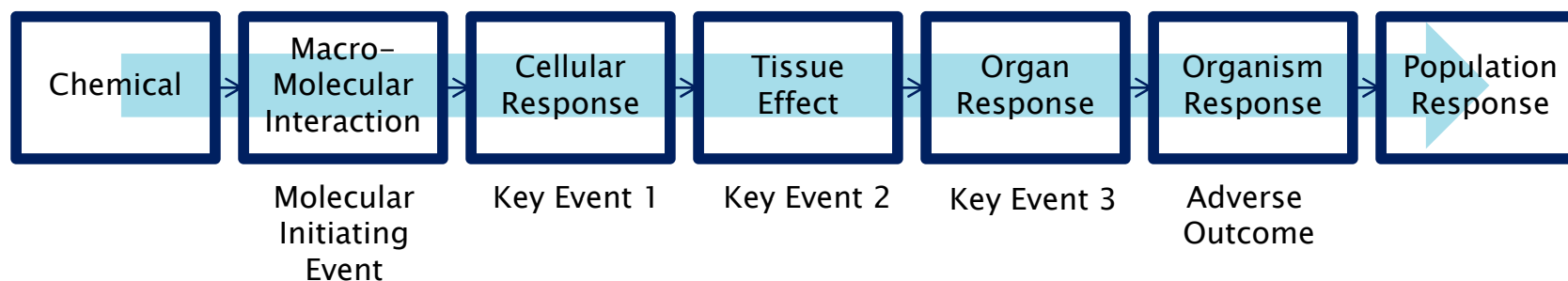


Hemoglobin

Studium proteinů v (eko)toxikologii

- (Eko)toxikologie: studium a predikce škodlivých účinků chemických látek na organismy
- Účinky na vyšších úrovních biologické organizace (jedinec, populace, společenstvo) jsou zprostředkovány změnami na nižších úrovních (orgány, tkáně, buňky, makromolekuly)

Adverse Outcome Pathway (Dráha škodlivého účinku)



- „Moderní metody (studia proteinů) v ekotoxikologii“
 - Moderní – ve smyslu „používané v současnosti“
 - Moderní – ve smyslu snahy studovat a charakterizovat mechanismy vedoucí ke škodlivým účinkům chemických látek
 - => porozumění mechanismům => lepší předpověď účinků na vyšších úrovních biologické organizace
 - => rychlejší, efektivnější, levnější a eticky méně kontroverzní metody pro hodnocení (eko)toxicity chemických látek (proteinové biomarkery)
 - => identifikace nových biomarkerů a klíčových událostí vedoucích k toxicitě
 - => cílený vývoj, optimalizace a validace alternativních testů toxicity

Studium proteinů v (eko)toxikologii

- Organismy = jsou z významné části tvořeny proteiny
- Téměř jakýkoli škodlivý účinek nějakým způsobem ovlivní proteiny/proteom
 - Příklady možných změn v proteomu působením toxických látek:
 - Přímé poškození (např. oxidační)
 - „Globální“ inhibice proteosyntézy
 - Ovlivnění enzymatické aktivity (metabolické, signální enzymy)
 - Aktivace receptorů a signálních drah
 - Změny v postranlačních modifikacích proteinů (fosforylace aj.)
 - Ovlivnění lokalizace proteinů
 - Změny v genové expresi
 - Aktivace/inaktivace funkce proteinu v důsledku mutací

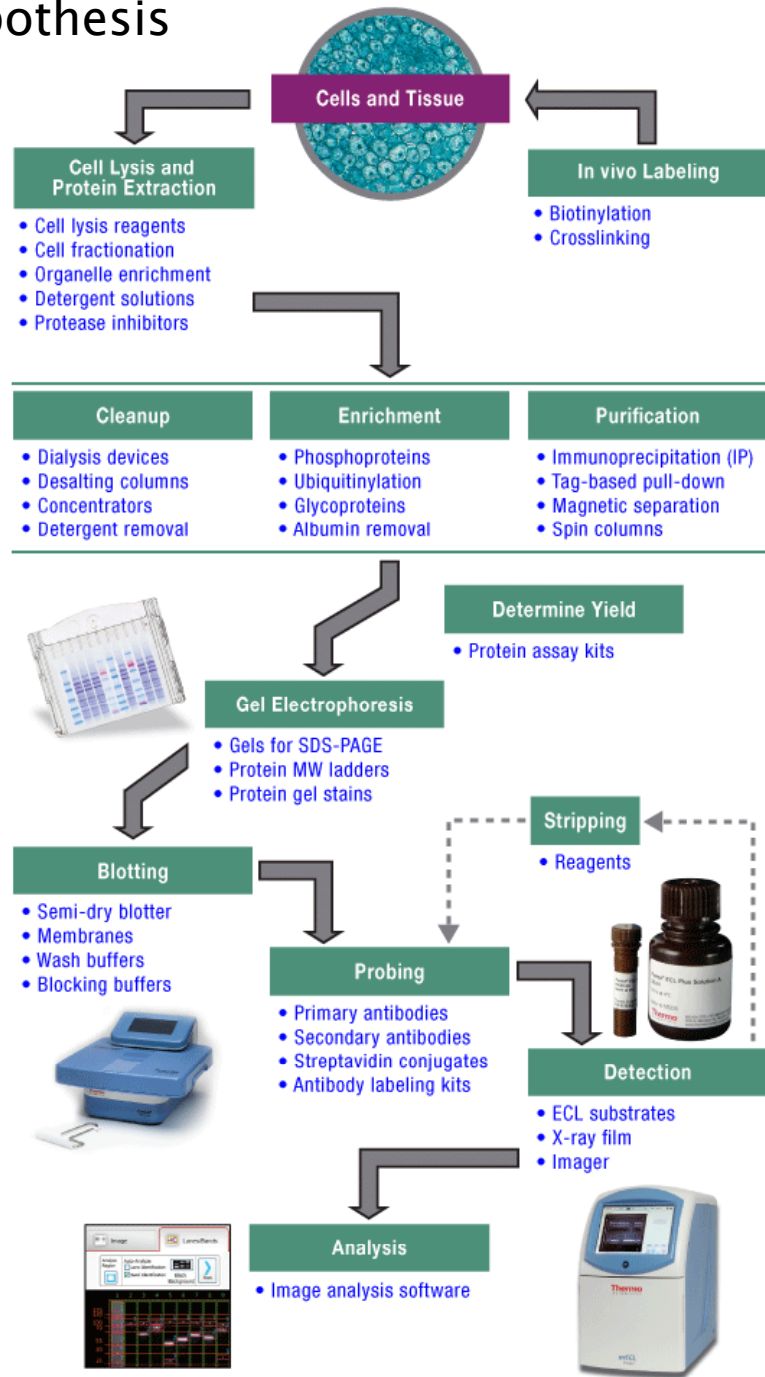
Metody studia proteinů v ekotoxikologii

- velká rozmanitost přístupů, technik, metod a jejich kombinací
- existence alternativních / paralelních řešení

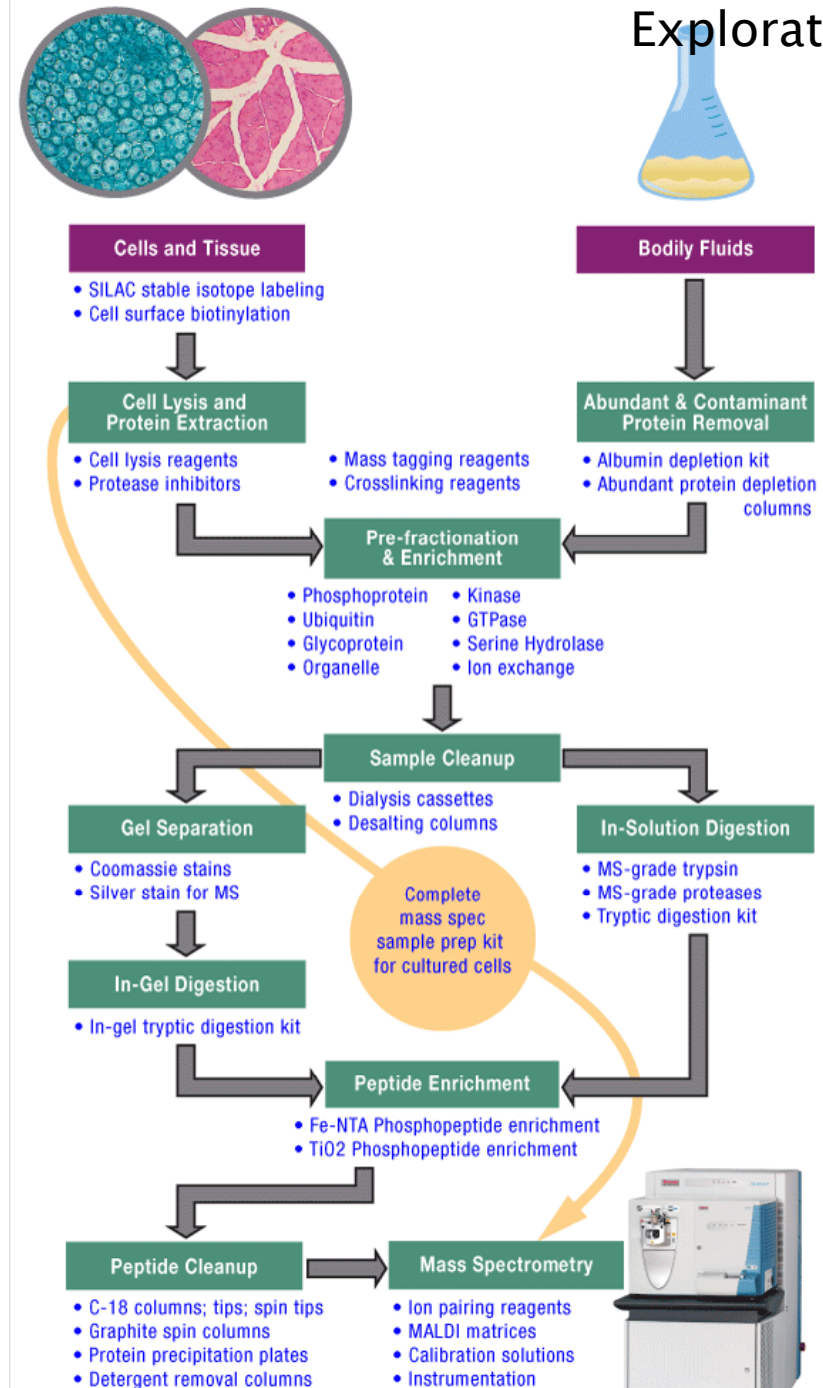
Metody studia proteinů

- ▶ **Extrakce a izolace proteinů**
 - Homogenizace vzorku a lyze buněk
 - Rozpuštění a extrakce proteinů
- ▶ **Frakcionace subcelulárních složek**
 - rozpustnost, velikost, vznášivost
- ▶ **Denaturace**
- ▶ **Stanovení výtěžku / koncentrace proteinů**
 - Biuret, Lowry, BCA, Bradford, UV spektroskopie
- ▶ **Přečištění a obohacení zájmové skupiny proteinů**
 - precipitace, ultrafiltrace, dialýza, chromatografie (gelová, afinitní)
 - Fosforproteiny, glykoproteiny, ubikvitinylované proteiny, imunoprecipitace
- ▶ **Separace proteinů podle náboje, MW, pI**
 - Elektroforéza, Isoelektrická fokusace
- ▶ **Detekce / kvantifikace**
 - Hodnocení enzymatické aktivity proteinu
 - Detekce pomocí specifických protilátek
 - V roztoku (EIA, RIA, ELISA)
 - Na membráně (dot-blot)
 - Na membráně po SDS-PAGE (Western blot)
 - „In situ“ -> imunocytochemie / imunohistochemie
 - MS-identifikace
 - štěpení proteázami na peptidy
 - Obohacení zájmové frakce peptidů (např fosfopeptidy)
 - Přečištění (odsolení)
 - LC-MS/MS

Hypothesis



Exploratory



Homogenizace vzorku a rozbití buněk

➤ Mechanická homogenizace

- mletí, drcení, krájení
- třepání v přítomnosti abrazivních materiálů (skleněné, ZrO₂, ZrSiO₄, o celové kuličky)



➤ Ultrazvukové homogenizátory



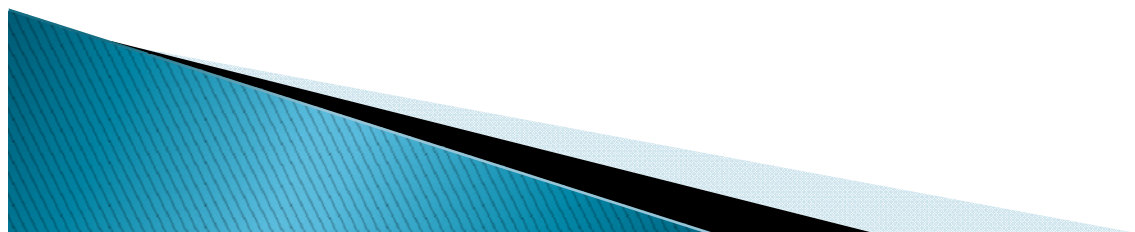
➤ Enzymaticky – lyzozym

➤ Chemicky – použití detergentů

- Probíhá zpravidla v přítomnosti extrakčního činidla (lyzačního pufu)
- Musí být kompatibilní s navazujícím krokem
- Často chlazení
 - Ledová tříšť (0–4C), Chladicí/mrazící stojánky (4 ... –80C)
 - Rychlé zmrazení: Chladicí lázně o definované teplotě (např. suchý led & aceton –78C), kapalný dusík (–196C)
- Skladování: lednice, –20C, –80C, –196C
- Minimalizace rozmrazování/zamrazování (aliquoty!)

Extrakce proteinů

- ▶ Lyzační/extrakční pufr
 - Lyze buněk
 - Rozpuštění proteinů
 - *Celý proteom nebo jen vybrané kompartmenty (membrána, jádro, cytoskelet...) či frakce (např. fosfoproteiny)?*
 - *Zachování nativní konformace / aktivity proteinů nebo denaturace?*
 - Omezení nežádoucích změn vzorku
 - *Stabilizace molekul, prevence oxidativního poškození*
 - *Inhibice proteolýzy, defosforylace*
 - *Inhibice růstu bakterií*



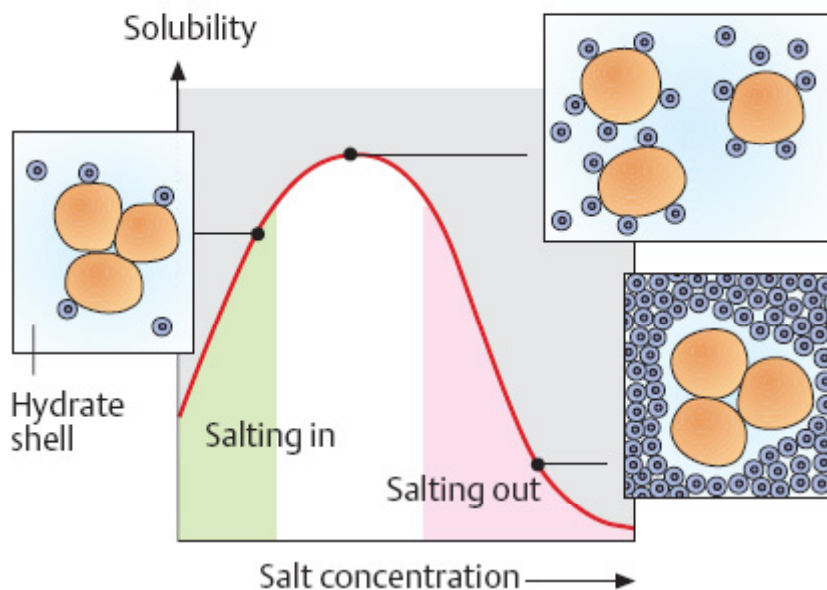
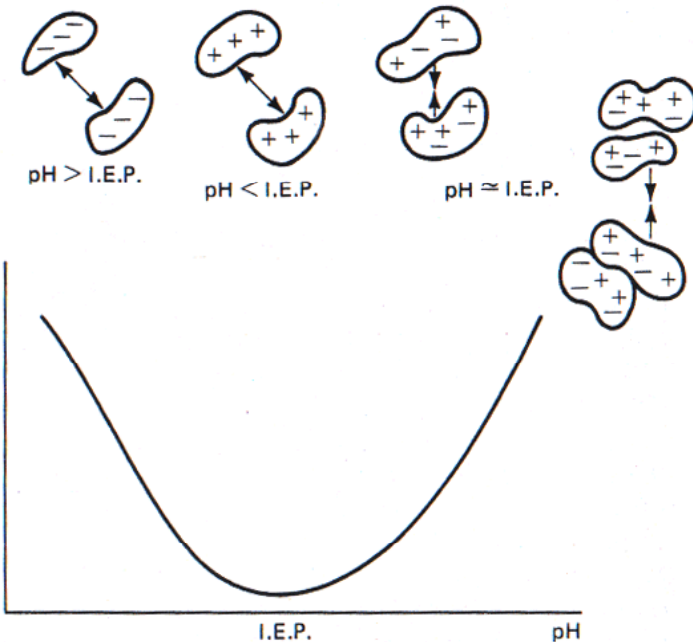
Rozpustnost ve vodě

- Aminokyselinové složení

- Nepolární vs. Polární aminokyseliny

- pH

- Amfolyty
- nízká rozpustnost v oblasti $\text{pH}=\text{pI}$
- minimalizace celkového náboje a odpuzivých elektrostatických sil bránících agregaci a precipitaci proteinů



Salinita

- Malé množství neutrálních solí \Rightarrow nárůst ionizace funkčních skupin (tzv. vsolení, salting-in) vede k vytvoření ochranného pláště iontů soli kolem proteinu a jeho stabilizaci v roztoku
- Zvyšování koncentrace anorganických solí \Rightarrow ionty solí odebírají proteinům jejich hydratační obal, což vede k postupnému vysolení (vysrážení, salting-out) proteinu z roztoku.

pH

Buffer	pH range
Citric acid – NaOH	2.2 – 6.5
Sodium citrate – citric acid	3.0 – 6.2
Sodium acetate – acetic acid	3.6 – 5.6
Cacodylic acid sodium salt – HCl	5.0 – 7.4
MES – NaOH	5.6 – 6.8
Sodium dihydrogen phosphate – disodium hydrogen phosphate	5.8 – 8.0
Imidazole – HCl	6.2 – 7.8
MOPS – KOH	6.6 – 7.8
Triethanolamine hydrochloride – NaOH	6.8 – 8.8
Tris – HCl	7.0 – 9.0
HEPES – NaOH	7.2 – 8.2
Tricine – NaOH	7.6 – 8.6
Sodium tetraborate – boric acid	7.6 – 9.2
Bicine – NaOH	7.7 – 8.9
Glycine – NaOH	8.6 – 10.6

(zpravidla v koncentraci 20–50 mM)

Soli

- ▶ NaCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- ▶ 50–150 mM
- ▶ zachování iontové síly

Detergenty

- ▶ Surfaktanty nebo jejich směsi
- ▶ Lyze buněk, solubilizace (hůře rozpustných) proteinů

Neiontové:

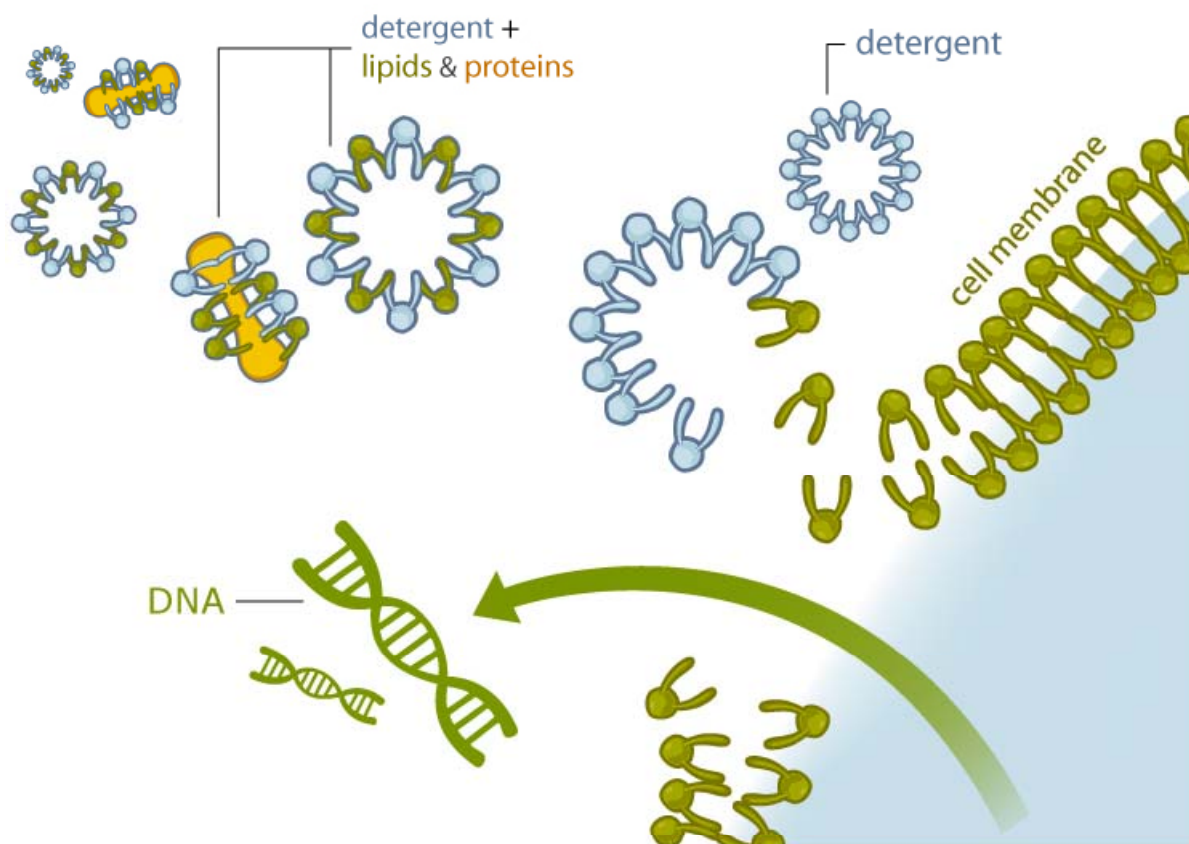
Tween20
Triton X-100
Nonidet P40

Aniontové:

Sodium dodecylsulfát (SDS)
Sodium deoxycholát
CTAB

Zwitteriontové:

CHAPS
CHAPSO
C7BzO
ASB-14



Silné detergenty mohou způsobovat denaturaci proteinů!

Další aditiva

- ▶ **Glycerol**
 - ▶ 5–10%
 - ▶ stabilizace proteinů (nativní konformace), snižuje bod mrazu
- ▶ **Glukóza / Sukróza**
 - ▶ 25 mM
 - ▶ stabilizace lyzozomálních membrán, potlačení uvolňování proteáz
- ▶ **Chelatační činidla – EDTA, EGTA**
 - ▶ 1–5 mM
 - ▶ Potlačení oxidačního poškození, metaloproteáz
- ▶ **Dvojmocné kationty (Mg²⁺)**
 - ▶ 1–10 mM
- ▶ **Ligandy (ATP, GTP)**
- ▶ **Redukční činidla**
 - ▶ Dithiothreitol (1–100 mM), 2-merkapt ethanol (0,05%)
 - ▶ Prevence oxidačního poškození, redukce disulfidických můstků
- ▶ **Chaotropní reagenty**
 - ▶ Močovina (6–8M), thiomočovina (2M), guanidinium hydrochlorid (6M)
 - ▶ Denaturace proteinů, vhodné pro aplikace nekompatibilní s detergenty
- ▶ **Antibakteriální látky**
 - ▶ Azid sodný (0,02–0,05%)

Reztoky nativních proteinů dlouhodobě uchovávané v chladu

Další aditiva

▶ Inhibitory proteáz

Protease inhibitor	Concentration	Solvent	Inhibice
Aprotinin	1–2 µg/ml	water	serine proteases
Benzamidine	15 µg/ml	water	serine proteases
EDTA, EGTA	1–10 mM	water	metallo proteases
Leupeptin	1–2 µg/ml	water	cysteine and serine proteases
PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)	0.1–1.0 mM	isopropanol	serine proteases
Pepstatin A	1 µg/ml	methanol	aspartic proteases
Antipain, bestatin, AEBSF, E-64...			

▶ Inhibitory fosfatáz

Phosphatase Inhibitor	Concentration	Solvent	Inhibitor
Na ₃ VO ₄	1 mM	water	Tyr phosphatases
NaF	5–10 mM	water	Ser/Thr phosphatases

Nativní proteiny

- ▶ Zachování nativní struktury a aktivity proteinu
 - ▶ Optimální pH, iontová síla, teplota
 - ▶ Nízké koncentrace detergentů:
 - ▶ Neiontové 0,1–2%, iontové 0,01–0,5%
 - ▶ Nízké koncentrace redukčních činidel
 - ▶ 1–10 mM DTT nebo 0,05% 2-merkaptoethanol
 - ▶ Stabilizující látky (glycerol, dvojmocné kationty, chelatační činidla)
 - ▶ !!! Inhibitory proteáz, případně fosfatáz
- Příklady lyzačních pufrů (*Abcam.com*)

Tris-HCl buffer

(*Cytosolové proteiny*)

•20 mM Tris-HCl, pH 7.5

Tris-Triton buffer

(*Cytoskeletární proteiny*)

10 mM Tris, pH 7.4

100 mM NaCl

1 mM EDTA, 1 mM EGTA

1% Triton X-100

0.1% SDS

0.5% sodium deoxycholate

10% glycerol

Nonidet-P40 (NP40) buffer

50 mM Tris, pH 8.0

150 mM sodium chloride

1.0% NP-40 (nebo Triton X-100)

RIPA (RadiolImmunoPrecipitation Assay buffer)

50 mM Tris, pH 8.0

150 mM sodium chloride

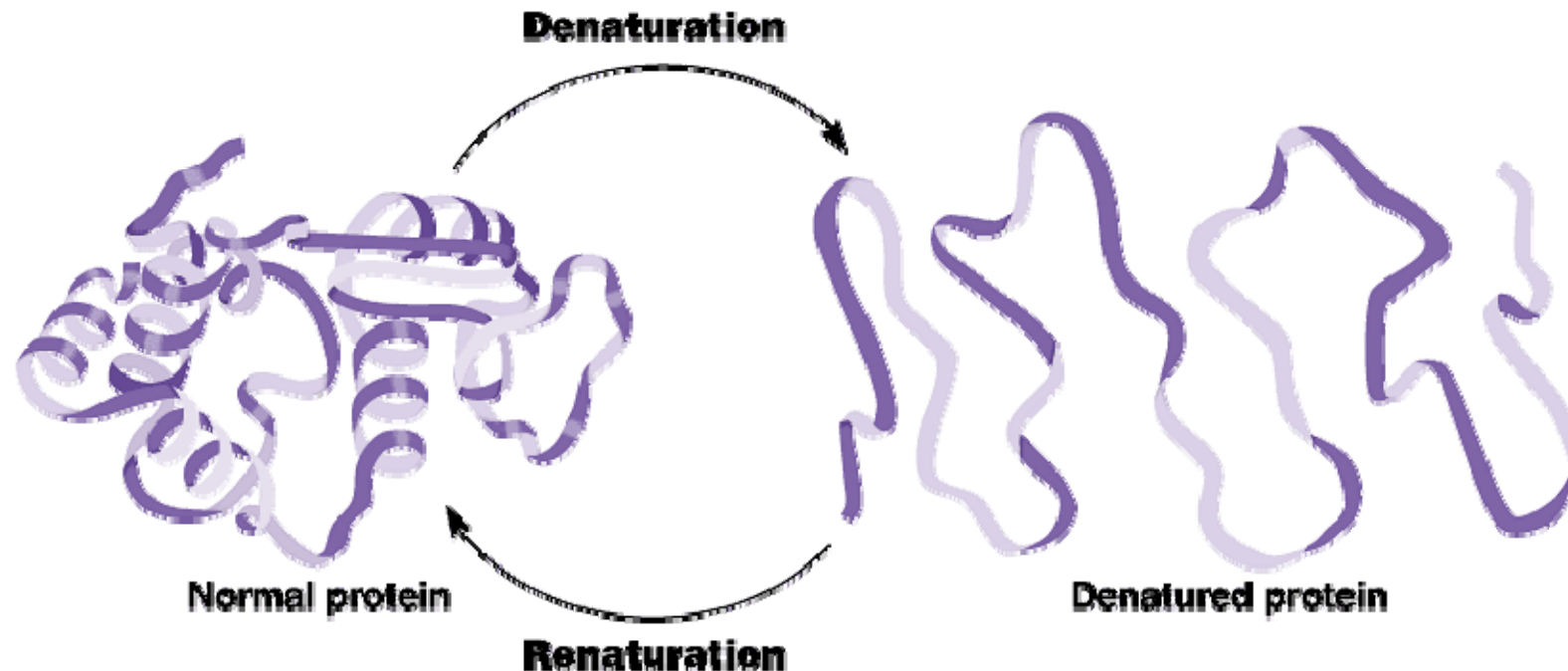
1.0% NP-40

0.5% sodium deoxycholate

0.1% SDS

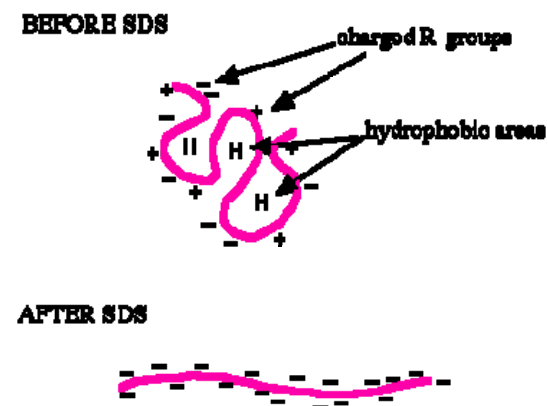
Denaturace proteinů

- ▶ Narušení nekovalentních vazeb a interakcí udržujících přirozenou (nativní) konformaci proteinu
- ▶ Narušení S-S vazeb
 - => Ztráta kvartérní / terciární / sekundární struktury
 - => Zachována pouze primární struktura (rozvinutý, volně ohebný polypeptidový řetězec)



Denaturace proteinů

- Vysoká teplota – *H-můstky, hydrofóbní interakce*
- Organická rozpouštědla (methanol, ethanol) – *H-můstky*
- Iontová síla (vysolování)
- pH (TCA, HAC) – *iontové interakce*
- Iontové detergenty (2–4% v/v)
- Redukční činidla (dithiothreitol DTT, dithioerythritol DTE, 2-merkaptoethanol) – *S-S můstky*
- Chaotropní reagenty (močovina, thiomočovina, guanidinium hydrochlorid)
– *H-můstky*
- Cross-linkery (paraformaldehyd, glutaraldehyd)



Vyžaduje-li navazující metoda studia proteinů denaturaci, je možné ji provést již v extrakčním kroku

- **Příklady denaturujících redukujících lyzačních pufrů**
- 4% SDS, 100 mM Tris pH 7.6, 100 mM DTT (Wisniewski et al 2009, Nat Met)
- 8M močovina, 50 mM Tris, pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA
- 8M močovina, 40 mM Tris, pH 8, 4%CHAPS, 65 mM DTT ...

- ▶ Kompatibilita jednotlivých metod:
 - ▶ SDS+DTT+vysoká teplota: OK x Močovina+vysoká teplota: => karbamylace proteinů
- ▶ Kompatibilita s navazujícími kroky
 - ▶ Aniotové detergenty interferují při isoelektrické fokusaci (zwitteriontové jsou OK)
 - ▶ Vysoké koncentrace silných detergentů interferují s trypsinovým štěpením

Frakcionace proteinů podle rozpustnosti

Volbou lyzačního pufru lze přednostně izolovat frakce proteinů s rozdílnou rozpustností

Lokalizace	Doporučený pufr
Celá buňka	NP-40, RIPA
Cytosol (rozpustné)	Tris-HCl
Cytoskelet	Tris-Triton
Membránové	NP-40, RIPA
Jaderné	RIPA
Mitochondriální	RIPA

<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11379>

Sekvenční extrakcí řadou lyzačních pufrů lze izolovat i několik různých proteinových frakcí

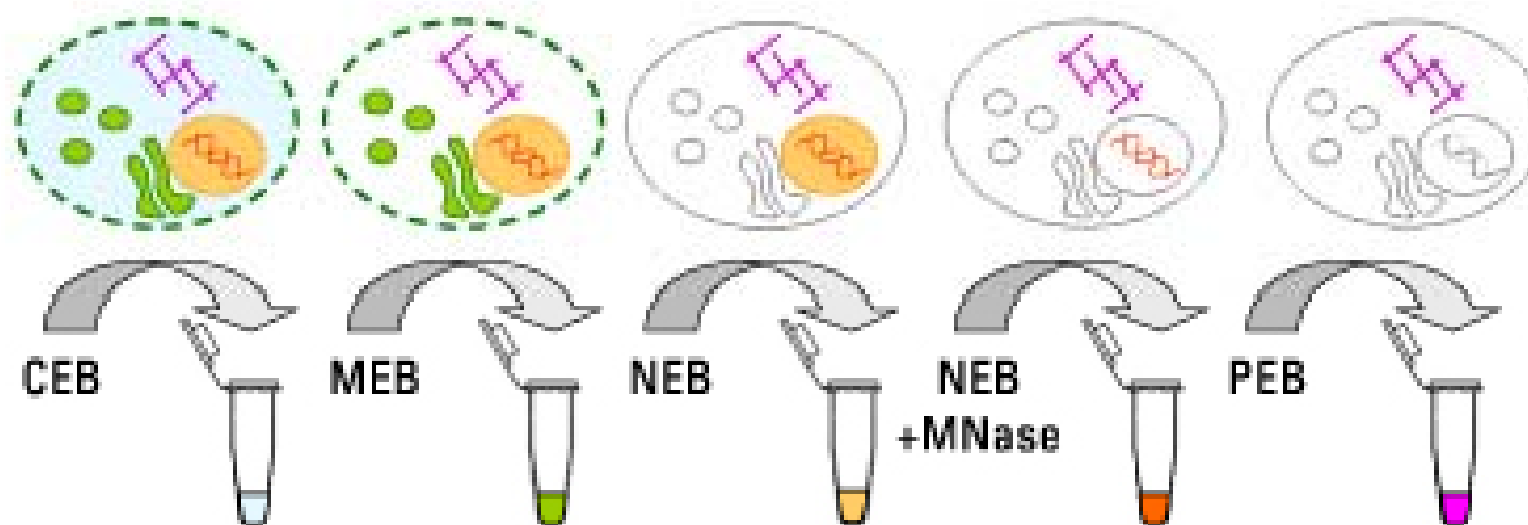
- => komerčně dostupné kity různých výrobců
- => různé subcelulární frakce a jejich kombinace

➤ Příklad - izolace frakce rozpustných cytosolových a frakce membránových proteinů (*Sigma PROTWO*):

- Rozpustné proteiny solubilizovány v 5mM Tris pufru
- Nerozpustné proteiny (membrána, cytoskelet) odděleny centrifugací (14000xG) a následně solubilizovány puftrem chaotropních reagentů a detergentu (močovina, thiomočovina, C7BzO)

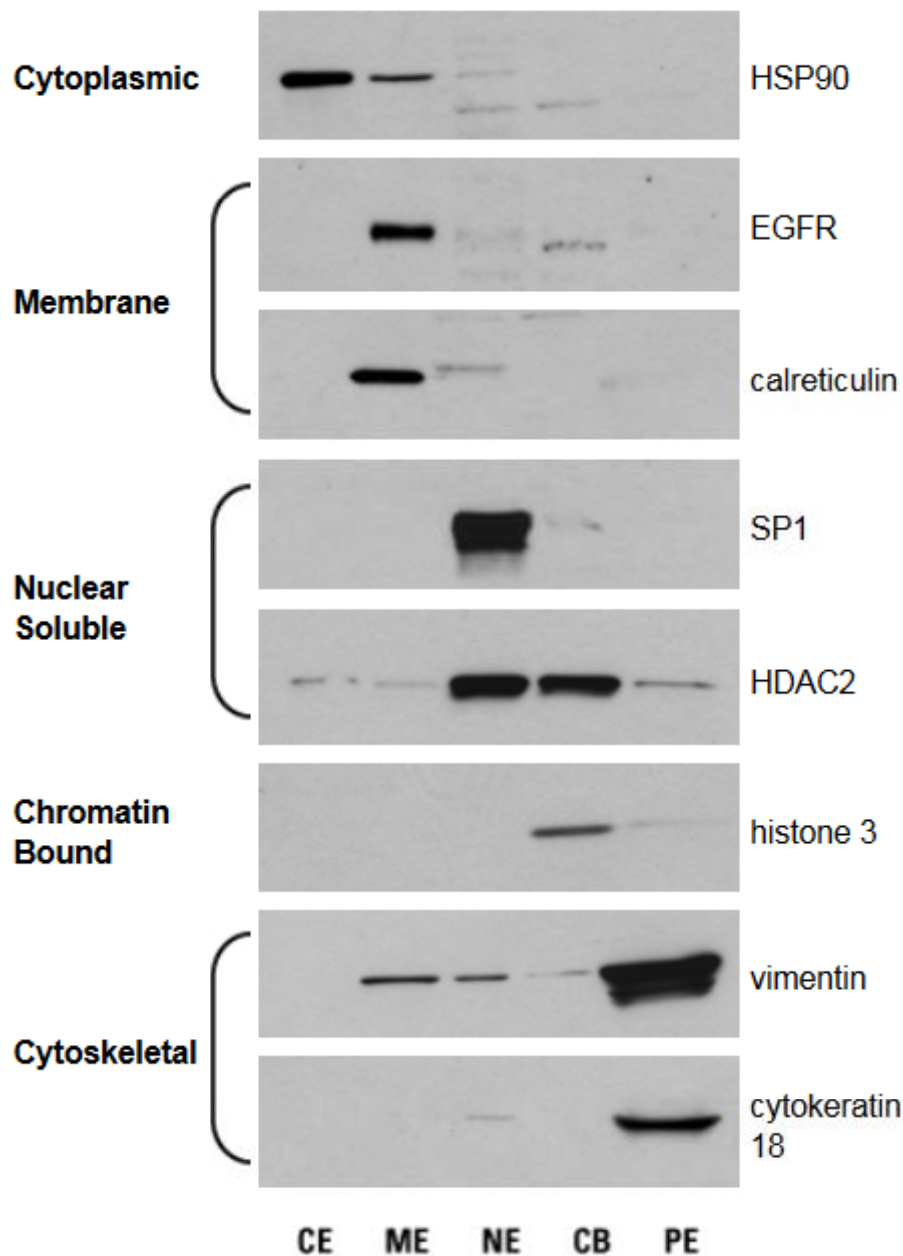
Frakcionace proteinů podle rozpustnosti

➤ Příklad – Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (*Pierce 78840*)

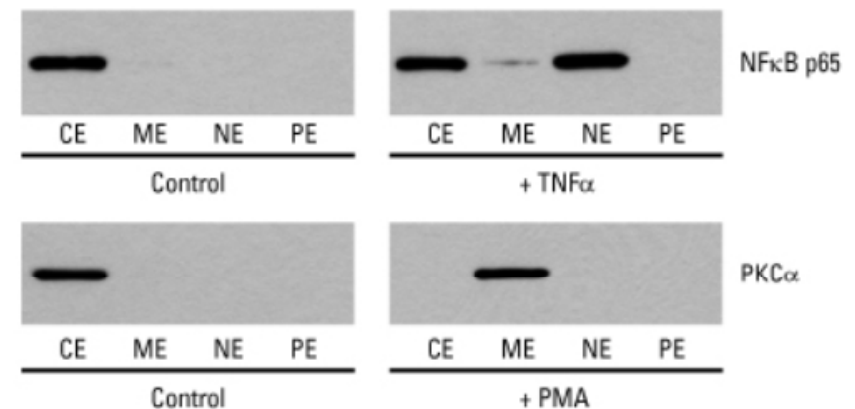


CEB Cytoplazmový extrakční pufr => cytosolové proteiny
MEB Membránový extrační pufr => membránové proteiny
NEB Jaderný extrakční pufr => jaderné proteiny
MNase Mikrokokální nukleáza => chromatin-vázané proteiny
PEB P ellet extrakční pufr => cytoskelet

➤ Příklad – Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (*Pierce 78840*)

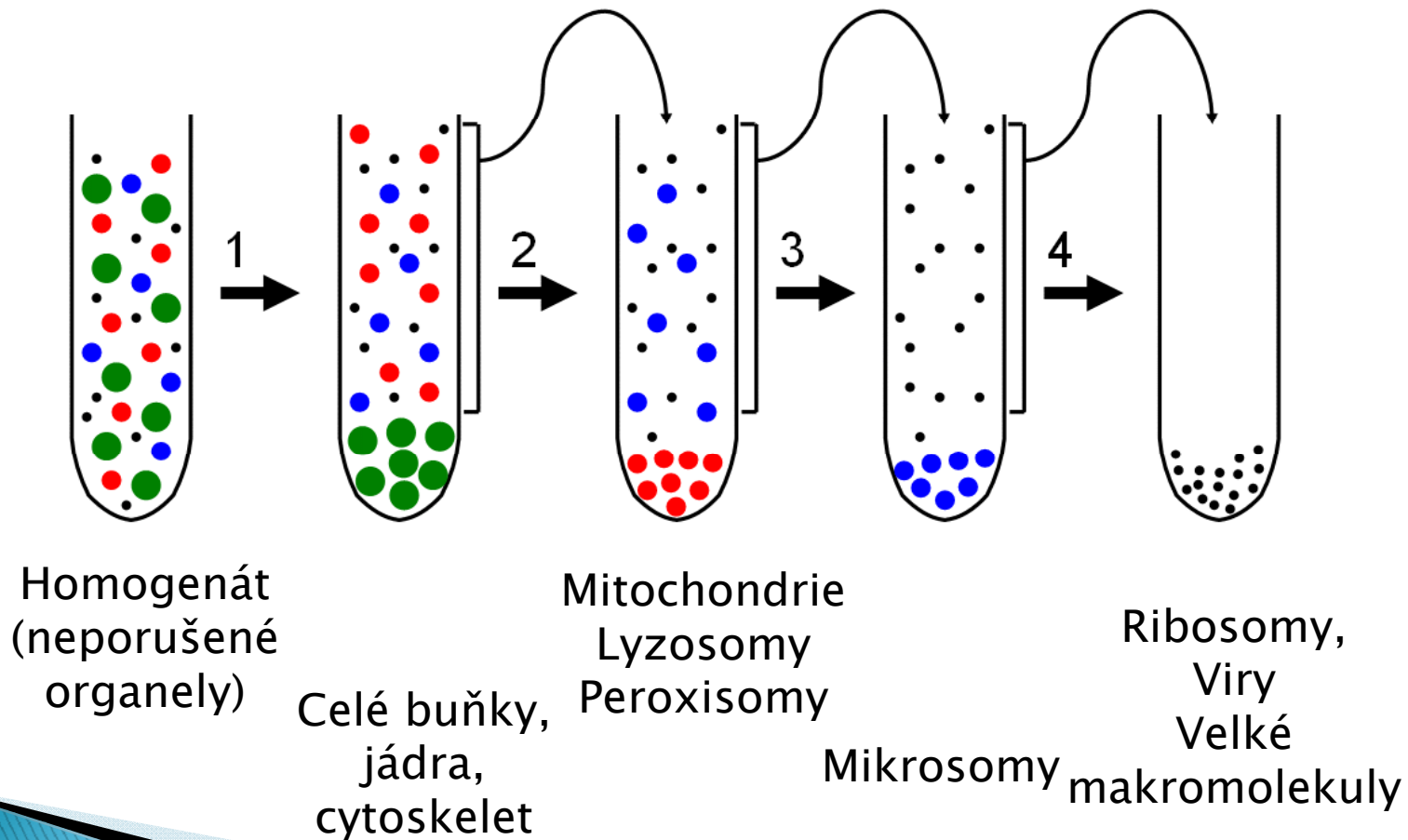


- Snížení komplexity vzorku
- Obohacení zájmové frakce proteinů
- Lokalizace proteinů
- Translokace proteinů

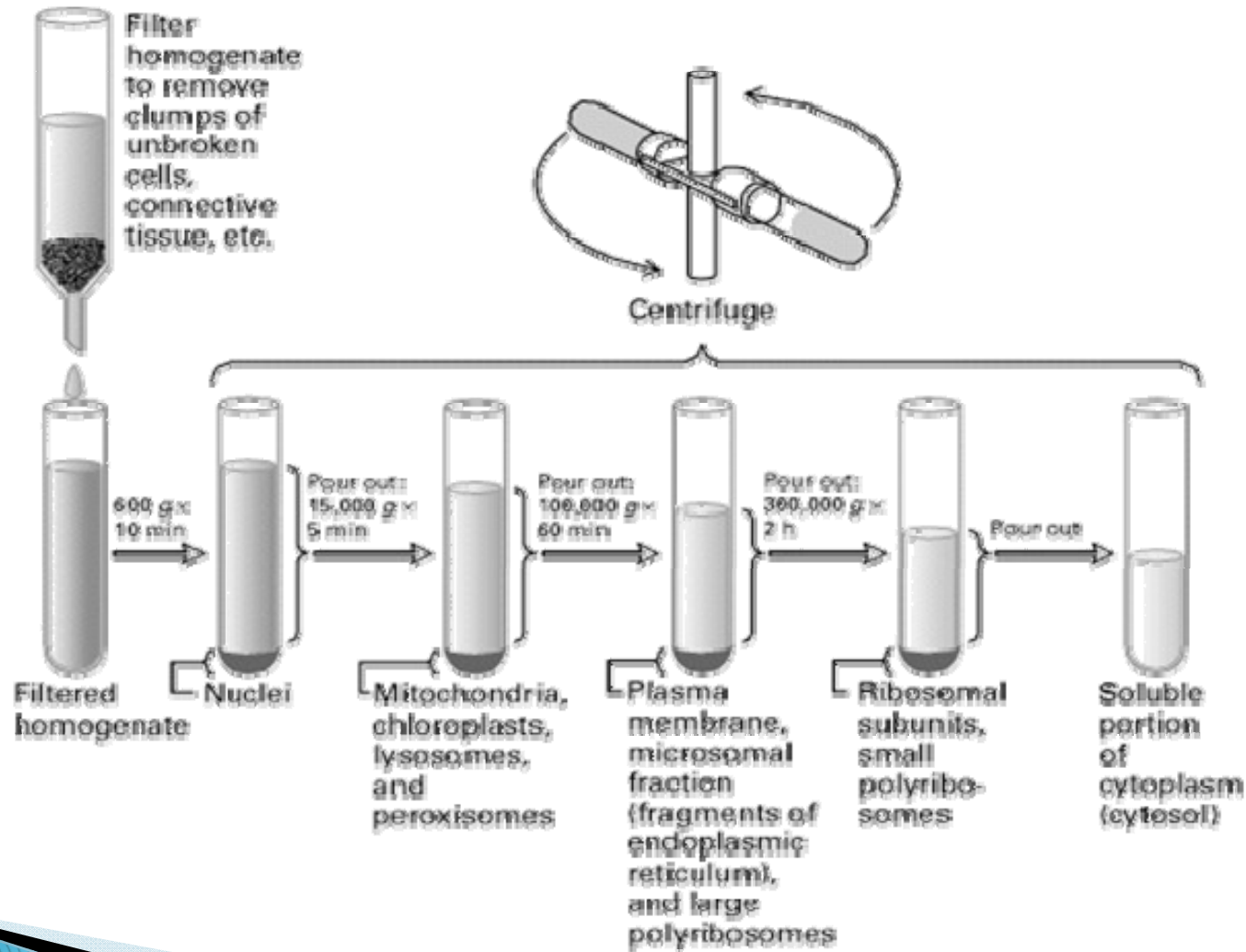


Frakční centrifugace

- *Differential centrifugation*
- Dělení buněčných složek podle hustoty a velikosti
- Postupné zvyšování otáček / RCF pro jednotlivé kroky

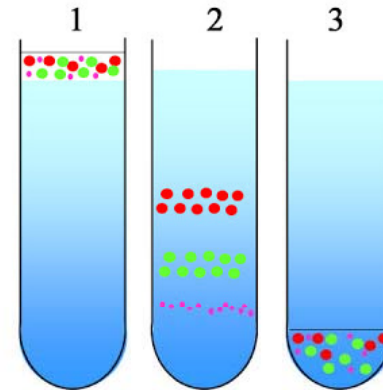


Frakční centrifugace



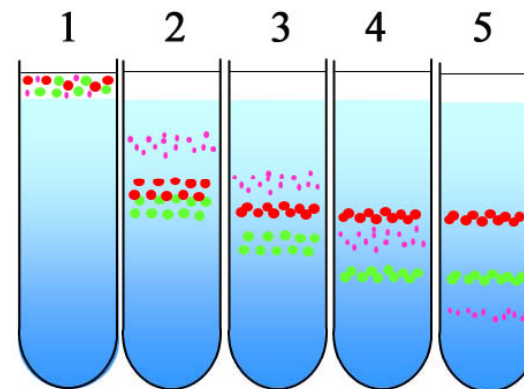
Rychlostní gradientová centrifugace

- *Rate Zonal Density Gradient Centrifugation*
- Dělení buněčných složek podle jejich rychlosti sedimentace (jejich velikosti) v mírném gradientu sacharózy (5–20%)



Centrifugace v hustotním gradientu

- *(Equilibrium) Density Gradient Centrifugation*
- Dělení buněčných složek podle vznášivosti (hustoty) ve strmém gradientu sacharózy (20–70%) nebo CsCl

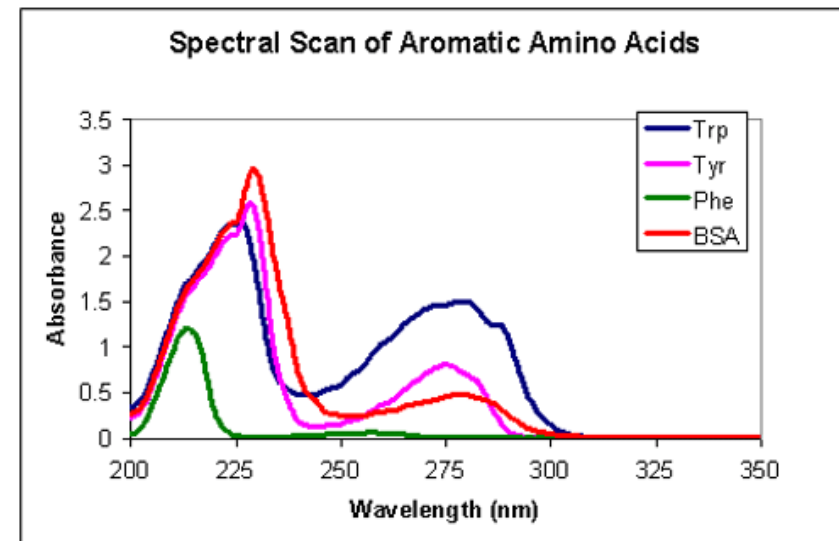


Stanovení celkové koncentrace proteinů v roztoku

- ▶ Posouzení výtěžnosti extrakce, frakcionace, purifikace
- ▶ Standardizace navazujících kroků – použití definovaného a pro různé vzorky ekvivalentního množství proteinů (např. pro gelovou elektroforézu, štěpení trypsinem...)
- ▶ Enzymatické aktivity, koncentrace metabolitů ve tkáních => zpravidla se vztahují na množství proteinů
- ▶ Kvantifikace a charakterizace mikroorganismů a jejich společenstev

UV spektrofotometrie

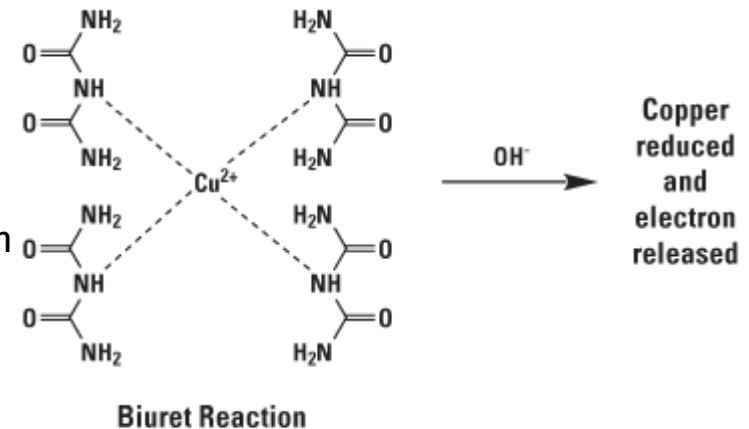
- Absorbance zbytků aromatických aminokyselin tyrosinu, tryptofanu a fenylalaninu při 280 nm
- Jednoduchá, rychlá metoda, malé objemy vzorku (Nanodrop etc.)
- Závislá na aminokyselinovém složení proteinu
- Lze měřit i při kratších vlnových délkách – vyšší citlivost, ale vyšší pravděpodobnost interferencí (pufr)



Kolorimetrické reakce

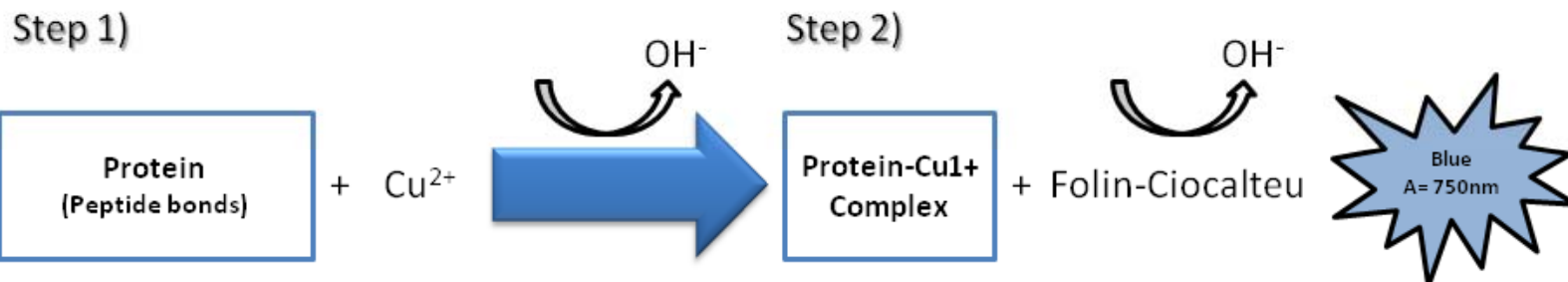
▶ Biuretová reakce

- Činidlo obsahující CuSO_4 , vínan sodno–draselný a NaOH
- v alkalickém prostředí dochází k reakci peptidových vazeb s Cu(II) za vzniku modrofialového zbarvení
- Měří se absorbance při 540 nm
- Nezávisí na aminokyselinovém složení, ale málo citlivá



▶ Lowryho reakce

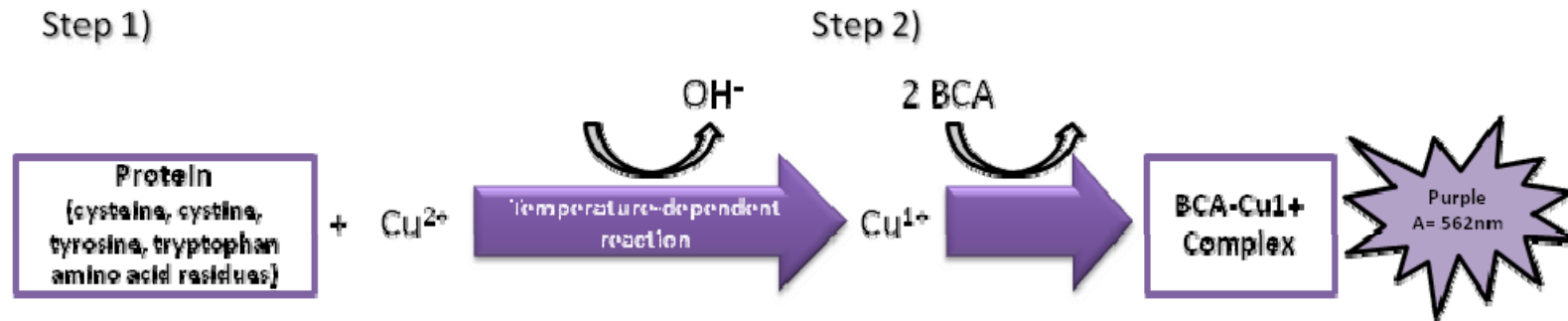
- Lowry et al. (1951) PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 193(1):265–275 => 14.10.2014: 305202 citací (1. na WOS)
- Dvoustupňová: Kombinuje biuretovou reakci s následným použitím Folinova činidla, které se redukuje v přítomnosti komplexů Cu(I) a zbytků aromatických aminokyselin (W, Y)
- 10–1000 $\mu\text{g/mL}$, měření absorbance při 750 nm
- Existují modifikace (např. DC Bio–rad)



Kolorimetrické reakce

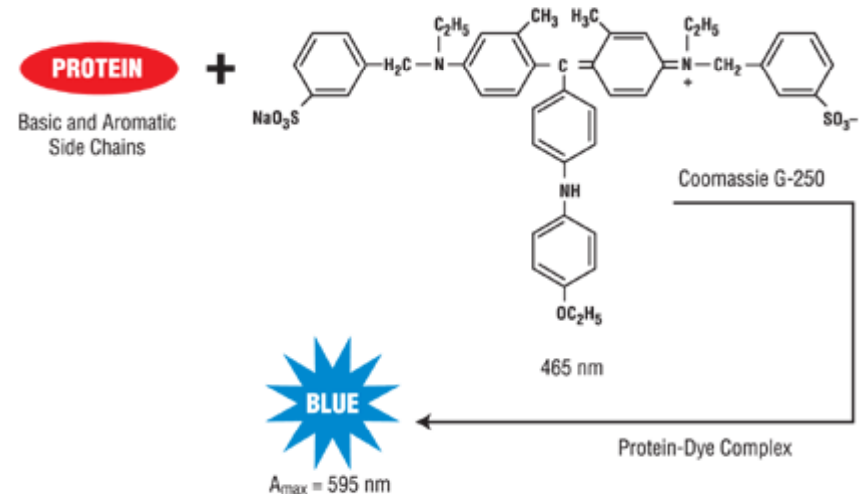
▶ BCA reakce

- Peptidová vazba reaguje s ionty Cu^{2+} (CuSO_4), které redukuje; následně sodná sůl kyseliny bicinchoninové (BCA) reaguje s ionty Cu^{1+} za vzniku barevného komplexu
- 10–1000 $\mu\text{g/mL}$, absorbance se při 562 nm



▶ Reakce Bradfordové

- barvení rozpuštěných proteinů roztokem Coomassie Brilliant Blue G-250
- Nárůst absorbance při 595 nm
- Lineární pro koncentrace proteinů 20–2000 $\mu\text{g/mL}$



Kompatibilita

- ▶ Některé běžné složky lyzačních / extrakčních pufrů nejsou kompatibilní s kolorimetrickými metodami stanovení proteinů => vždy ověřit v tabulce kompatibility pro příslušnou metodu, pufr a ředění vzorku
- ▶ V ideálním případě mít stejné složení a ředění pufru jak pro vzorek, tak pro externí standard

The listed compounds were tested and found to be compatible with the Bio-Rad DC Protein Assay. In some cases, the presence of one or more of these substances will effect a change in the response of the protein to the assay reagents; therefore, the standard should always be prepared in the same buffer as the sample.

10% SDS	1% CHAPS	2% NP-40
1% Triton† X-100	1% CHAPSO	1% Thesit†
1% Tween† 20	1% Octyl glucoside	1% Brij†-35
0.2% C ₁₂ E ₈ *	0.1 M Tris, pH 8	0.5 M NaOH
0.5 M HCl	0.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0.025 M EDTA
0.05 M CaCl ₂	0.4 M Guanidine HCl	4 M Urea
0.05% Sodium azide	1 mM DTT (dithiothreitol)	

Note: The DC Protein Assay is incompatible with 2-mercaptoethanol (BME)

† BRIJ and TWEEN are registered trademarks of Atlas Chemical. THESIT is a registered trademark of Desitin Arzneimittel GMBH. TRITON is a registered trademark of Rohm and Haas.

*octaethyleneglycol dodecyl ether

Table 2. Compatible substance concentrations in the BCA Protein Assay (see text for details).⁴

Substance	Compatible Concentration	Substance	Compatible Concentration
Salts/Buffers		Detergents**	
ACES, pH 7.8	25mM	Brij®-35	5.0%
Ammonium sulfate	1.5M	Brij-56, Brij-58	1.0%
Asparagine	1mM	CHAPS, CHAPSO	5.0%
Bioine, pH 8.4	20mM	Deoxycholic acid	5.0%
Bis-Tris, pH 6.5	33mM	Octyl β-glucoside	5.0%
Borate (50mM), pH 8.5 (# 28384)	undiluted	Nonidet P-40 (NP-40)	5.0%
B-PER® Reagent (#78248)	undiluted	Octyl β-thioglucoyanoside	5.0%
Calcium chloride in TBS, pH 7.2	10mM	SDS	5.0%
Na-Carbonate/Na-Bicarbonate (0.2 M), pH 9.4 (# 28382)	undiluted	Span® 20	1.0%
Cesium bicarbonate	100mM	Triton® X-100	5.0%
CHES, pH 9.0	100mM	Triton X-114, X-305, X-405	1.0%
Na-Citrate (0.6 M), Na-Carbonate (0.1 M), pH 9.0 (# 28388)	1:8 dilution*	Tween®-20, Tween-60, Tween-80	5.0%
Na-Citrate (0.6 M), MOPS (0.1 M), pH 7.5 (#28386)	1:8 dilution*	Zwittergent® 3-14	1.0%
Cocaoil chloride in TBS, pH 7.2	0.8mM	Chelating agents	
EPPS, pH 8.0	100mM	EDTA	10mM
Ferrocenone in TBS, pH 7.2	10mM	EGTA	---
Glycine-HCl, pH 2.8	100mM	Sodium citrate	200mM
Guanidine-HCl	4M	Reducing & Thiol-Containing Agents	
HEPES, pH 7.5	100mM	N-acetylglucosamine in PBS, pH 7.2	10mM
Imidazole, pH 7.0	50mM	Ascorbic acid	---
MES, pH 6.1	100mM	Cysteine	---
MES (0.1 M), NaCl (0.9%), pH 4.7 (#28390)	undiluted	Dithioerythritol (DTE)	1mM
MOPS, pH 7.2	100mM	Dithiothreitol (DTT)	1mM
Modified Dulbecco's PBS, pH 7.4 (#28374)	undiluted	Glucose	10mM
Nickel chloride in TBS, pH 7.2	10mM	Melliciose	---
PBS; Phosphate (0.1 M), NaCl (0.15 M), pH 7.2 (# 28372)	undiluted	2-Mercaptoethanol	0.01%
PIPES, pH 6.8	100mM	Potassium thioyanate	3.0M
RIPA lysis buffer, 50mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% DOC, 1% NP-40, 0.1% SDS, pH 8.0	undiluted	Thimerosal	0.01%
Sodium acetate, pH 4.8	200mM	Misc. Reagents & Solvents	
Sodium azide	0.2%	Acetone	10%
Sodium bicarbonate	100mM	Acetonitrile	10%
Sodium chloride	1M	Aprotinin	10mg/L
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200mM	DMF, DMSO	10%
Sodium phosphate	100mM	DMSO	10%
Tricine, pH 8.0	25mM	Ethanol	10%
Triethanolamine, pH 7.8	25mM	Glycerol (Fresh)	10%
Tris	250mM	Hydrazides	---
TBS; Tris (25mM), NaCl (0.15 M), pH 7.6 (# 28376)	undiluted	Hydrides (Na ₂ BH ₄ or NaCNBH ₃)	---
Tris (25mM), Glycine (192mM), pH 8.0 (# 28380)	1:3 dilution*	Hydrochloric Acid	100mM
		Leupeptin	10mg/L

* Diluted with ultrapure water.

** Detergents were tested using high-purity Thermo Scientific Surface-Amps Products, which have low peroxide content.

--- Dashed-line entry indicates that the material is incompatible with the assay.

Externí kalibrace

- ▶ Nutná externí kalibrace
 - Bovinní sérový albumin (BSA)
 - Ovalbumin (OVA)
- ▶ V závislosti na složení aminokyselin mohou mít některé proteiny vyšší odezvu než jiné

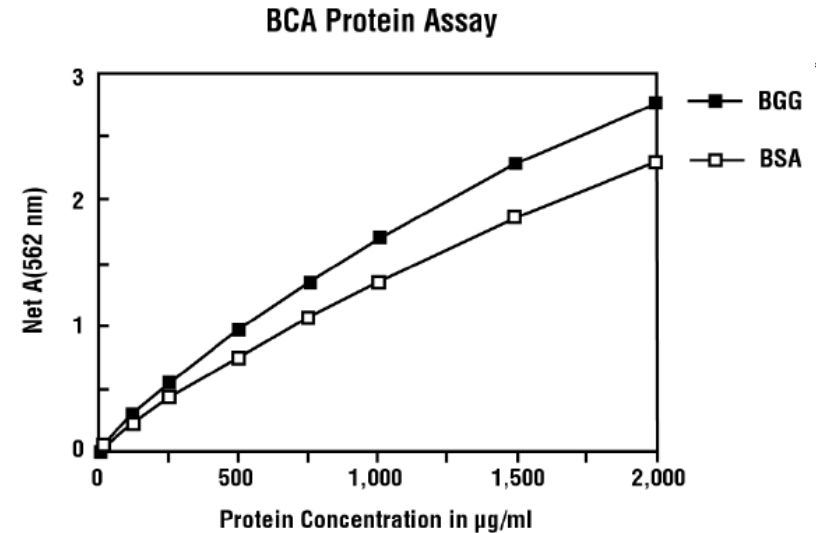
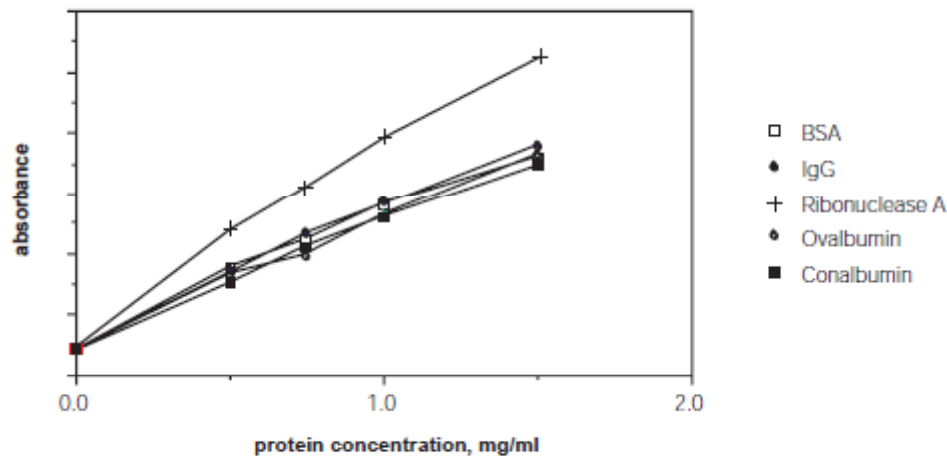


Table 3. Protein-to-protein variation. Absorbance ratios (562nm) for proteins relative to BSA using the Standard Test Tube Protocol.

Ratio = (Avg "test" net Abs.) / (avg. BSA net Abs.)

Protein Tested	Ratio
Albumin, bovine serum	1.00
Aldolase, rabbit muscle	0.85
α-Chymotrypsinogen, bovine	1.14
Cytochrome C, horse heart	0.83
Gamma globulin, bovine	1.11
IgG, bovine	1.21
IgG, human	1.09
IgG, mouse	1.18
IgG, rabbit	1.12
IgG, sheep	1.17
Insulin, bovine pancreas	1.08
Myoglobin, horse heart	0.74
Ovalbumin	0.93
Transferrin, human	0.89
<hr/>	
Standard Deviation	0.15
Coefficient of Variation	14.7%

DC Bio-Rad (Lowry Based)



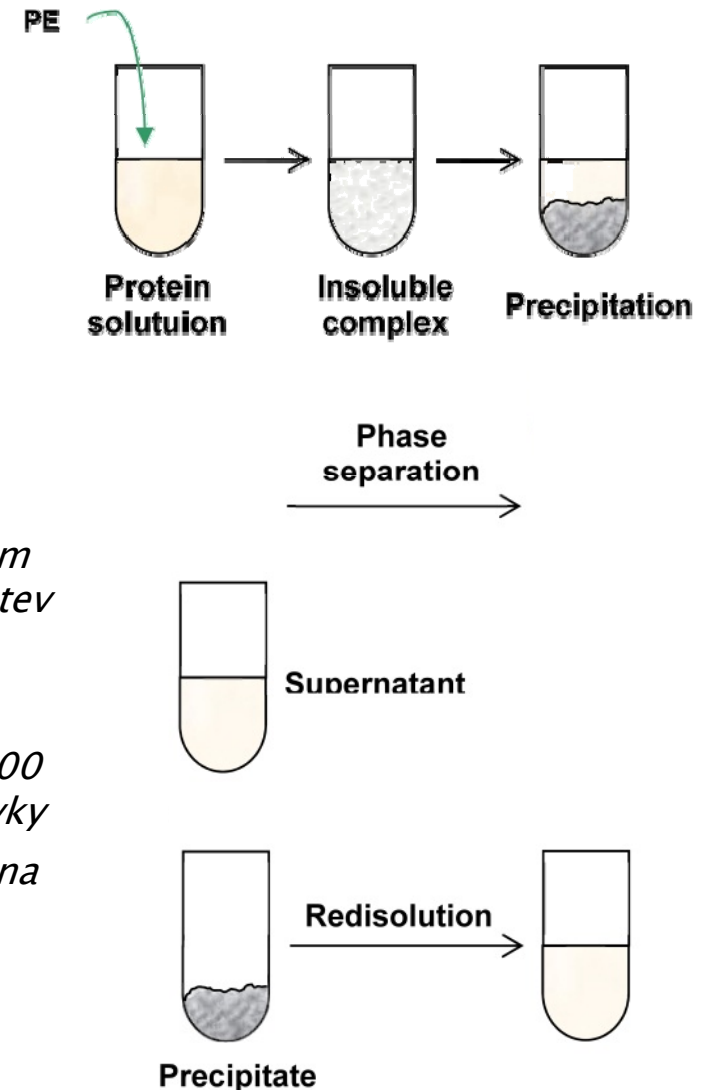
Assay	absorption	mechanism	detection limit	advantages	disadvantages
UV absorption	280 nm	tyrosine and tryptophan absorption	0.1–100 ug/ml	small sample volume, rapid, low cost	incompatible with detergents and denaturing agents, high variability
Bicinchoninic acid	562 nm	copper reduction (Cu^{2+} to Cu^{1+}), BCA reaction with Cu^{1+}	20–2000 ug/ml	compatible with detergents and denaturing agents, low variability	low or no compatibility with reducing agents
Bradford or Coomassie brilliant blue	470 nm	complex formation between Coomassie brilliant blue dye and proteins	20–2000 ug/ml	compatible with reducing agents, urea, rapid	incompatible with detergents
Lowry	750 nm	copper reduction by proteins, Folin-Ciocalteu reduction by the copper-protein complex	10–1000 ug/ml	high sensitivity and precision	incompatible with detergents and reducing agents, long procedure
Modified Lowry (DC Biorad)	750 nm	copper reduction by proteins, Folin-Ciocalteu reduction by the copper-protein complex	10–1500 ug/ml	high sensitivity and precision, compatible with some detergents, rapid	Limited compatibility with reducing agents

Precipitace proteinů

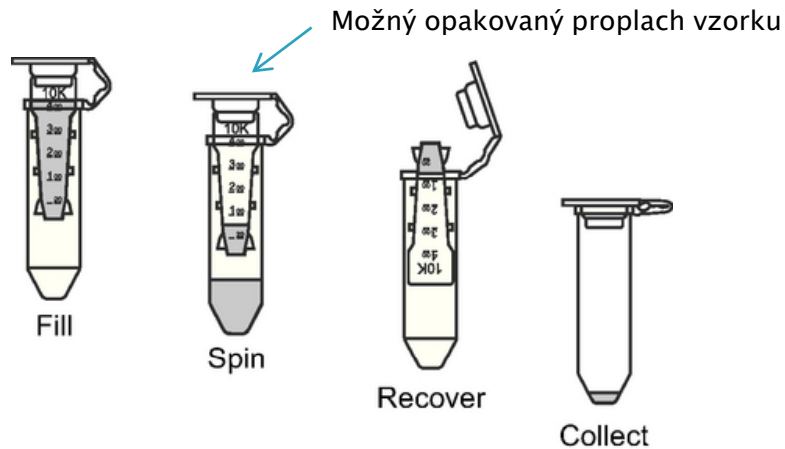
- ▶ Zakoncentrování proteinů
- ▶ Odstranění nežádoucích složek lyzačního pufru (detergenty, soli...) anebo odstranění proteinů
- ▶ Organická rozpouštědla, kyseliny, soli
- ▶ Příklad: Chloroform/Methanol precipitace:
 - ▶ *Do Epp. Zkumavky napipetovat 100 uL roztoku proteinů*
 - ▶ *Přidat 400 uL methanolu, vortex, krátce stočit*
 - ▶ *Přidat 100 uL chloroformu, vortex, krátce stočit*
 - ▶ *Přidat 300 uL vody, vortex, stočit min. 13000 rpm (5 min) => proteiny budou na rozhraní dvou vrstev kapalin.*
 - ▶ *Opatrně odebrat horní kapalnou vrstvu*
 - ▶ *Přidat 300 uL methanolu, vortex, stočit min 13000 rpm (5 min) => proteiny peletují na dno zkumavky*
 - ▶ *Odebrat supernatant, proteiny nechat uschnout na vzduchu*
 - ▶ *Rozpustit v požadovaném objemu a typu pufru*

▶ Další metody:

- ▶ Trichlorooctová kyselina (TCA), TCA-aceton, TCA-DOC, sulfát amonny



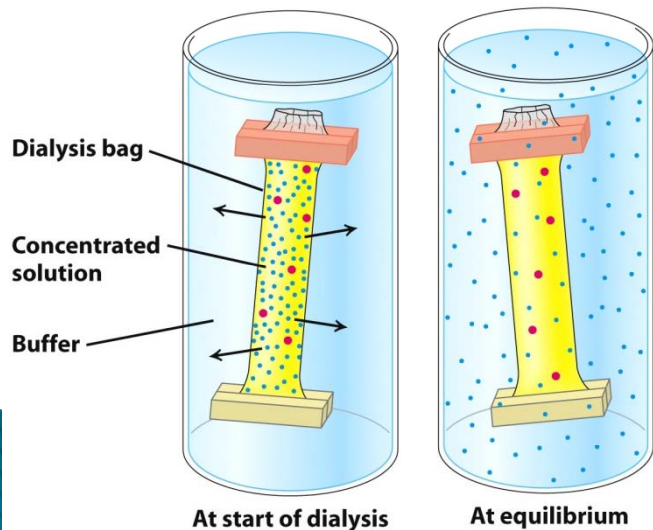
Ultrafiltrace



- ▶ Filtry z membrán s malou velikostí pórů
- ▶ Průchod vzorku docílen centrifugací
- ▶ Komerčně dostupné patrony různých objemů a s různou propustností filtrů
>3, >10, >30, >50, >100 kDa

Tzv. **MWCO** = molecular weight cut-off

Dialýza



- ▶ Semipermeabilní membrána umožňující průchod malých molekul → osmóza
- ▶ Klasicky „dialyzační střívko“, inzerty pro centrifugační zkumavky a mikrozukavky, dialyzační rámečky, láhve, 96 mikroděsky
- ▶ Objemy od 20 uL až po 250 mL, MWCO 2, 3.5, 7, 10, 20K

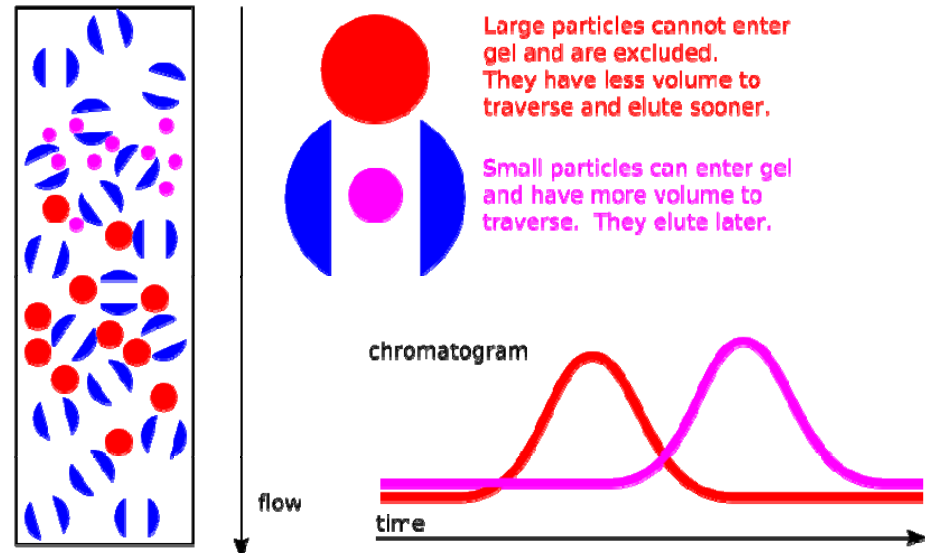


Figure 3.2
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

<https://www.emdmillipore.com>
<http://oregonstate.edu/instruct/bb450/fall14/lecture/proteincharacterizationoutline.html>
<http://piercenet.com>

Gelová chromatografie

- ▶ Gelová filtrace, *size-exclusion chromatography*
- ▶ Vzorek je unášen mobilní fází procházející kolonou naplněnou porézní stacionární fází (pohyb mobilní fáze: gravitace nebo centrifugace)
- ▶ Stacionární fáze umožňuje vstup malých molekul do pórů => zvyšuje jejich retenci
- ▶ Velké molekuly nevstupují do pórů => migrují rychleji, kratší retenční čas
- ▶ Komerčně dostupné kolony různých velikostí (uL až mL vzorku), různých formátů (kolonky, 96j destičky) s různými typy stacionární fáze s různým MWCO:
 - Zeba Resin (MWCO 7K, 40K)
 - Polyakrylamid Resin (MWCO 1.8K, 6K)
 - Dextran Resin (MWCO 5K)
 - Sephadex (dextran, MWCO 0,7–600 kDa)

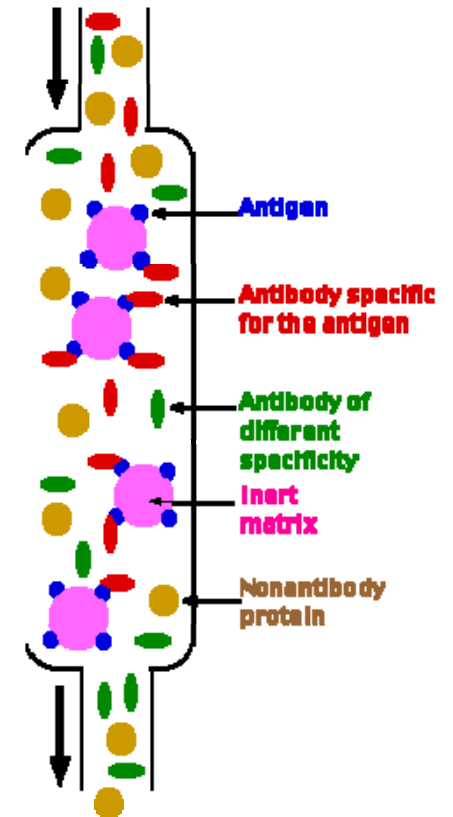


Afinní chromatografie

- ▶ Zrnka stacionární fáze mají navázanou molekulu / jsou tvořena molekulami interagujícími s cílovými proteiny

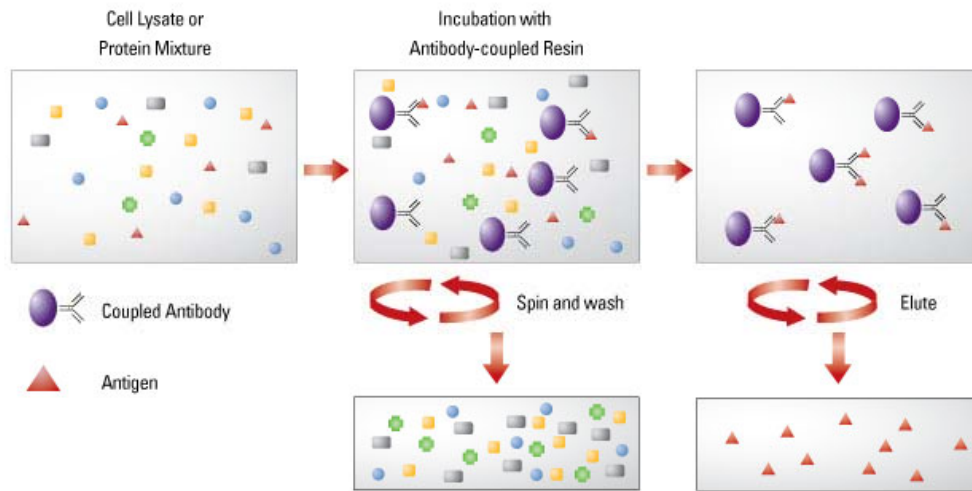
=> specifická vazebná aktivita

- **Protilátka** rozpoznávající daný protein nebo antigen (Immunoafinitní chromatografie)
 - Konkrétní protein(y)
 - Soubor proteinů – protilátky proti ubikvitinu
- **Antigen** rozpoznávaný protilátkou – purifikace protilátek
- **Substrát enzymu**
- **IMAC (Immobilized Metal Ion chromatography)**, TiO₂, Pro-Q Diamond – izolace fosfoproteinů
- **Concavalin A / Wheat Germ Agglutinin (WGA)** – izolace glykoproteinů
- Purifikace značených rekombinantních/fúzních proteinů (GST, 6xHis, MBP, FLAG, ...)

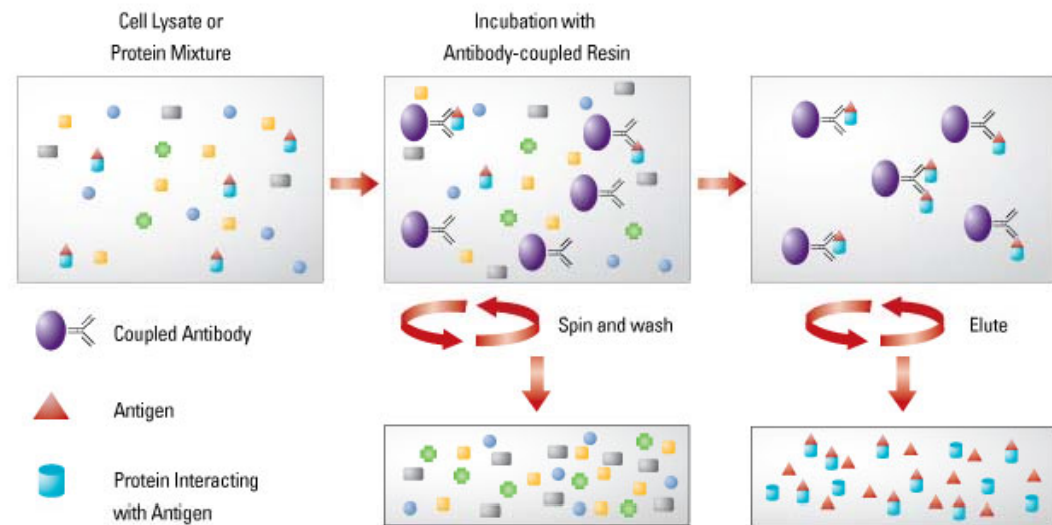


- ▶ Komerčně dostupné kity
- ▶ Možnost zakoncentrovat i proteinové komplexy -> studium interakcí proteinů
- ▶ Lze realizovat v kolonkové podobě nebo v suspenzi („batch techniques“)

Imunoprecipitace & imunokoprecipitace

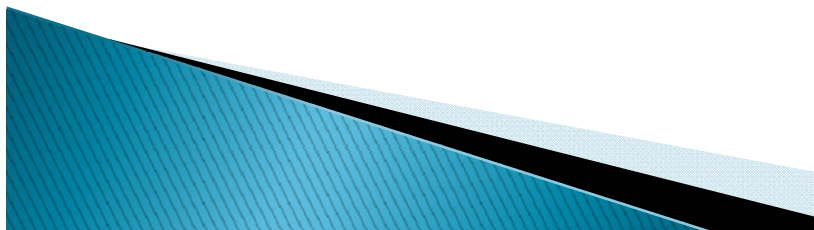


- ▶ Zrnka sefarózy v roztoku/suspenzi s protilátkou a cílovým proteinem
- ▶ Navázání protilátky na sefarózu pomocí Protein A nebo Protein G
- ▶ Imunoprecipitát oddělen centrifugací
- ▶ Analýza imuno(ko)precipitátu



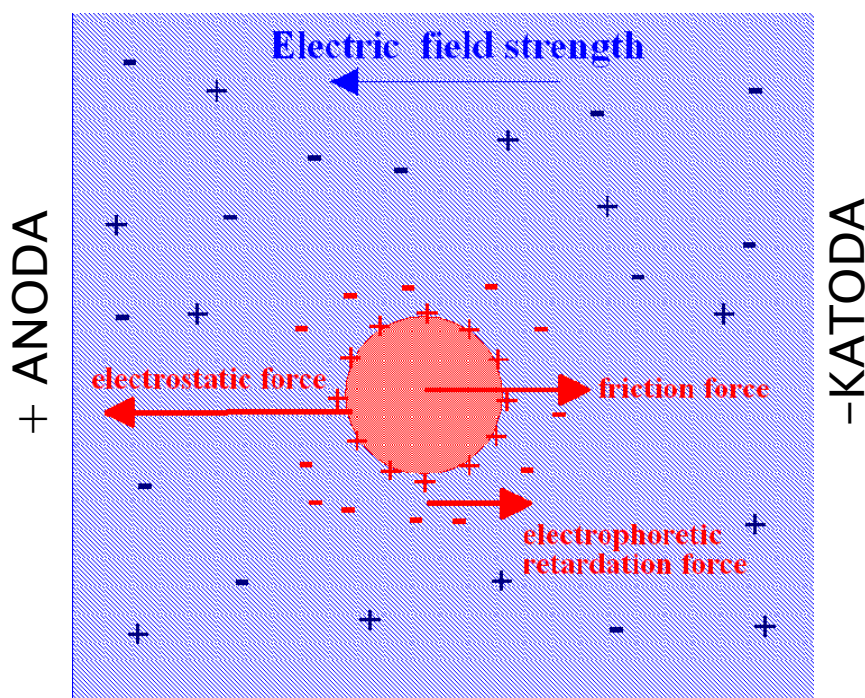
Analyze

<http://piercenet.com>



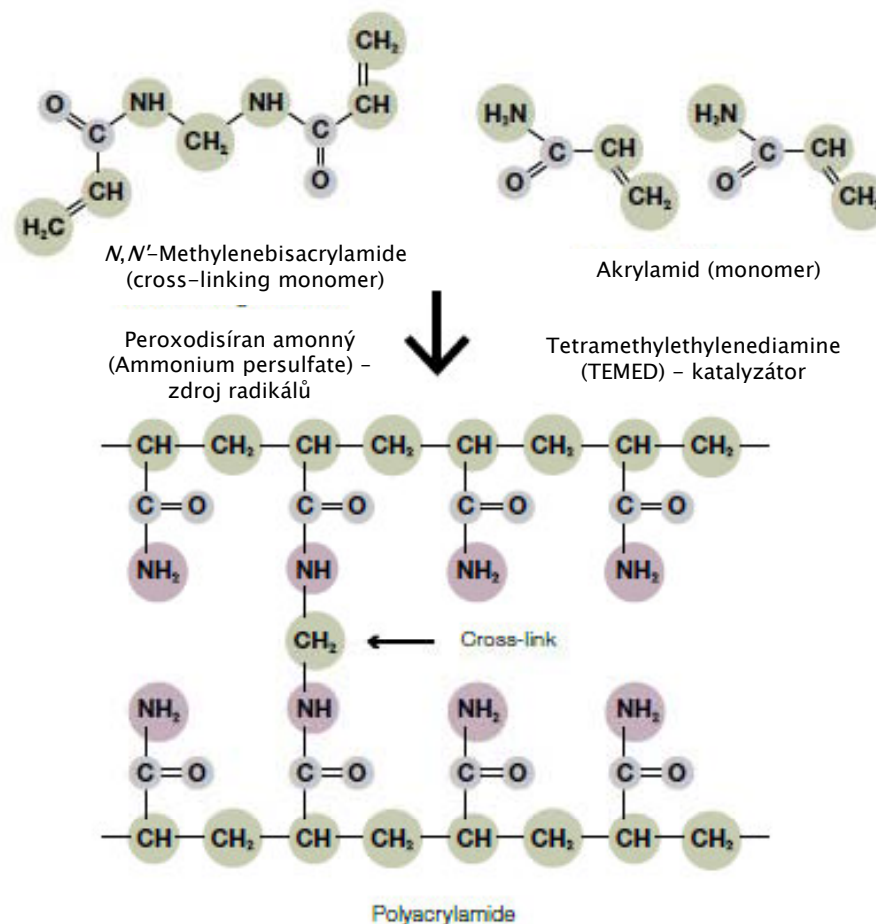
Elektroforetická separace

- ▶ Pohyb nabitých molekul v elektrickém poli

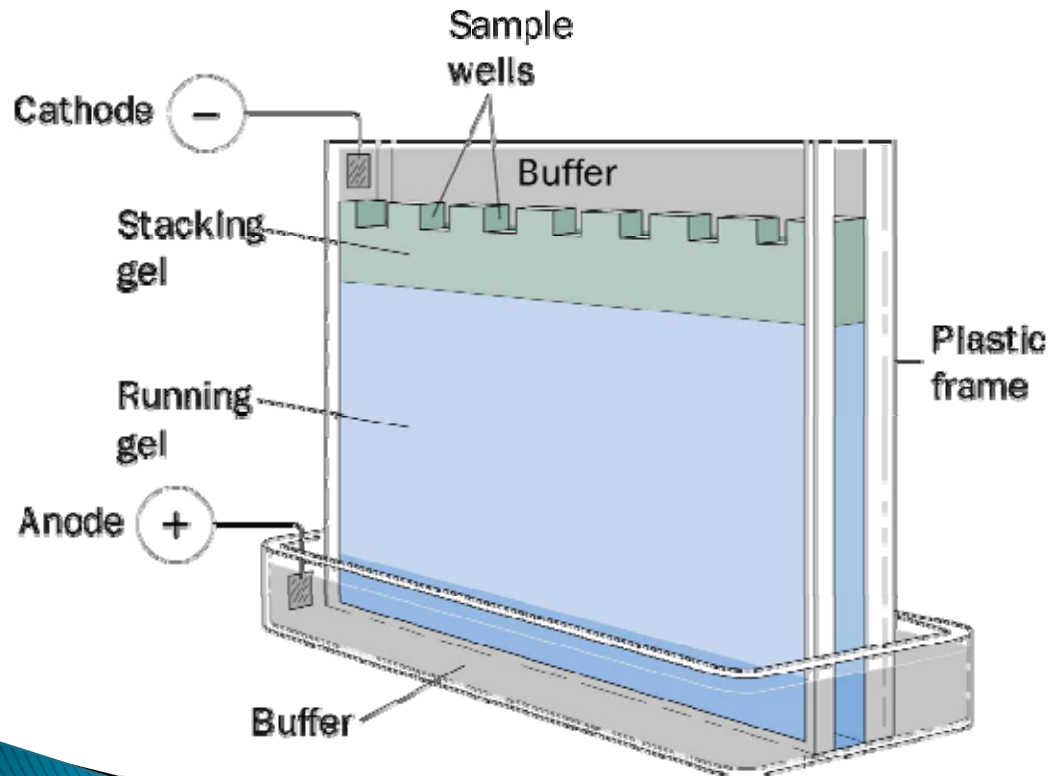
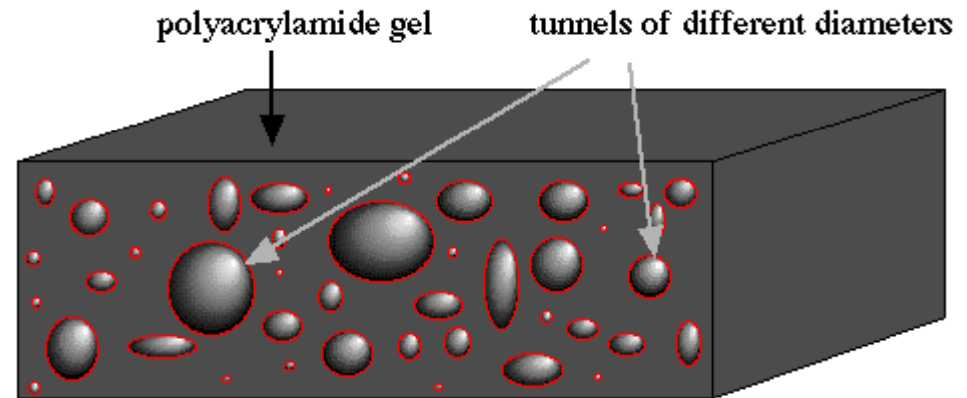


- ▶ Různá uspořádání a varianty
- ▶ Elektroforéza gelová, free-flow, kapilární
- ▶ Isoelektrická fokusace
- ▶ Isotachorofóza...

- ▶ Typicky v polyakrylamidovém gelu
- ▶ Polyacrylamide Gel Electrophoresis = PAGE



% bis/akrylamidu - ovlivňuje velikost pórů a rigiditu gelu
 ⇒ Velikost separovaných proteinů
 ⇒ Jednoduché gely - konstantní
 ⇒ Gradientové gely - nárůst koncentrace akrylamidu směrem k anodě



• Vertikální uspořádání PAGE

• Gel

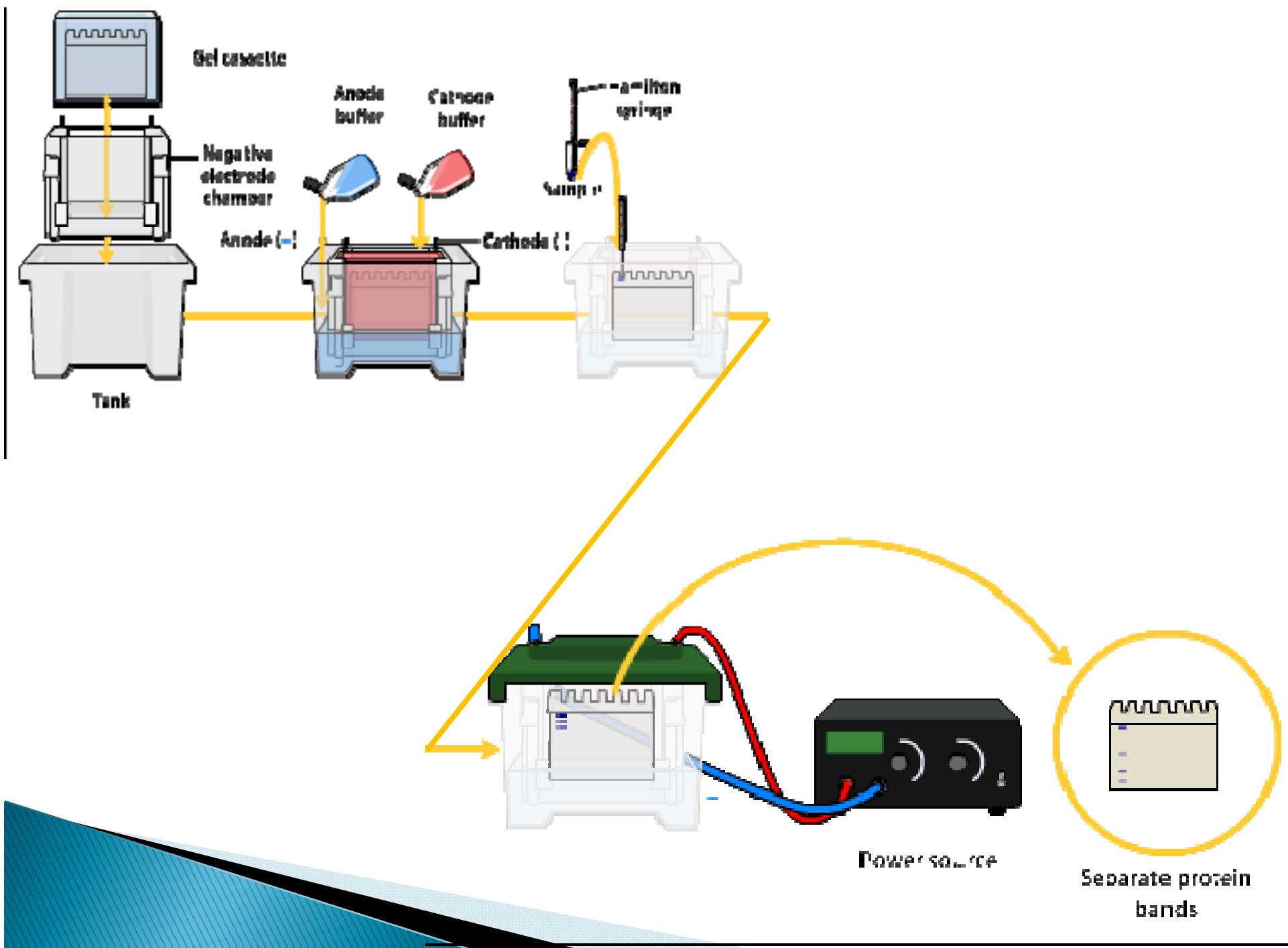
- v kazetě (mezi skly / plastovými destičkami)
- Různé rozměry (mini cca 8 x 6 cm, standard cca 13 x 8 cm, velké >20 x 20 cm)
- nalévané v laboratoři nebo komerčně dostupné **pre-cast gely**

• Vzorek do jamek (10–50 ug proteinů)

• Umístění v tanku

- Rezervoár katodového a anodového pufru (upper / lower chamber)

• Zdroj napětí



- **Nativní PAGE**

- Nedenaturované neredukované proteiny

- Rychlost migrace závisí na

 - Náboji

 - Velikosti a tvaru molekuly

 - /Hustota náboje/

Malé s vysokým neg. nábojem >

> Malé s nízkým neg. nábojem ~

~ velké s neg. vysokým nábojem >

> Velké s neg. nízkým nábojem

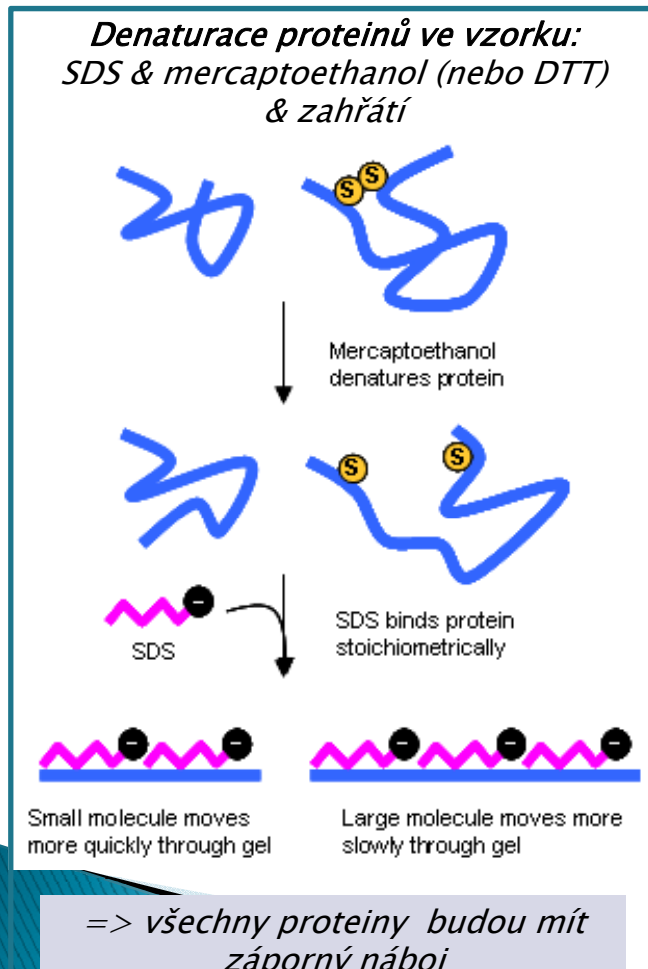
Typicky Tris–Glycinový elektrodo­vý pufr & Tris–HCl PAGE gel

- ✓ Separace proteinů v nativním stavu

- ✓ Odlišení proteinů se stejnou molekulovou hmotností X neumožňuje určit molekulovou hmotnost

SDS-PAGE

- Laemmli (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259):680–5
- 14.10.2014: přes 200 000 citací, 2. nejcitovanější článek na WOS



- ✓ Denaturované a redukované proteiny
- ✓ Uniformní náboj (SDS), rychlost migrace závisí na molekulové hmotnosti
- ✓ Umožňuje určit molekulovou hmotnost:

Molecular weight marker = žebříček standardů proteinů o známé MW

• Nanášecí pufr (2X):

4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromphenol blue and 0.125 M Tris HCl, pH 6.8 => smíchání se vzorkem v poměru 1:1 a zahřátí (55–100C)

• Elektroforetický pufr: 25 mM Tris–192 mM Glycine, 0.1%SDS pH 8.3–8.8

• Diskontinuální Tris–HCl PAGE gel:

- Zakoncentrování vzorku do úzké zóny na vstupu do separačního gelu

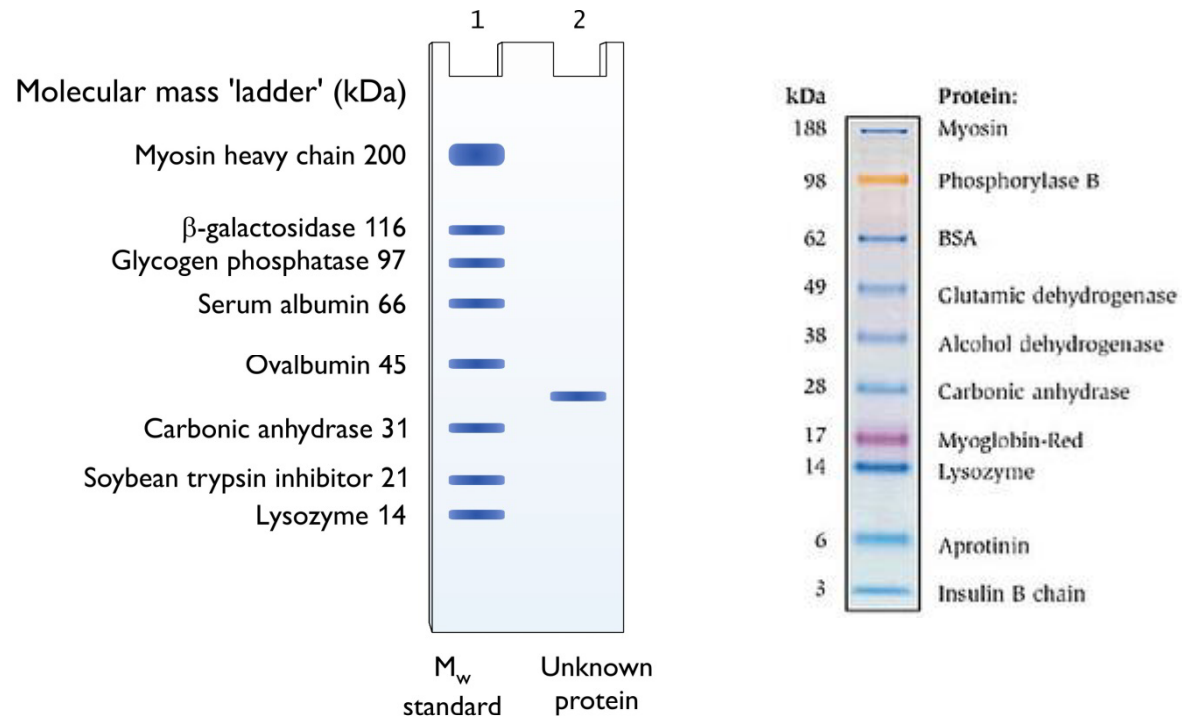
- 4% zaostřovací gel, 125 mM Tris–HCl–0.1%SDS, pH 6.8

- separační gel, 375 mM Tris–HCl, pH 8.8 (4 ...20%)

- tloušťka 0,5–1,5 mm

- 100–200V

Odhad molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE



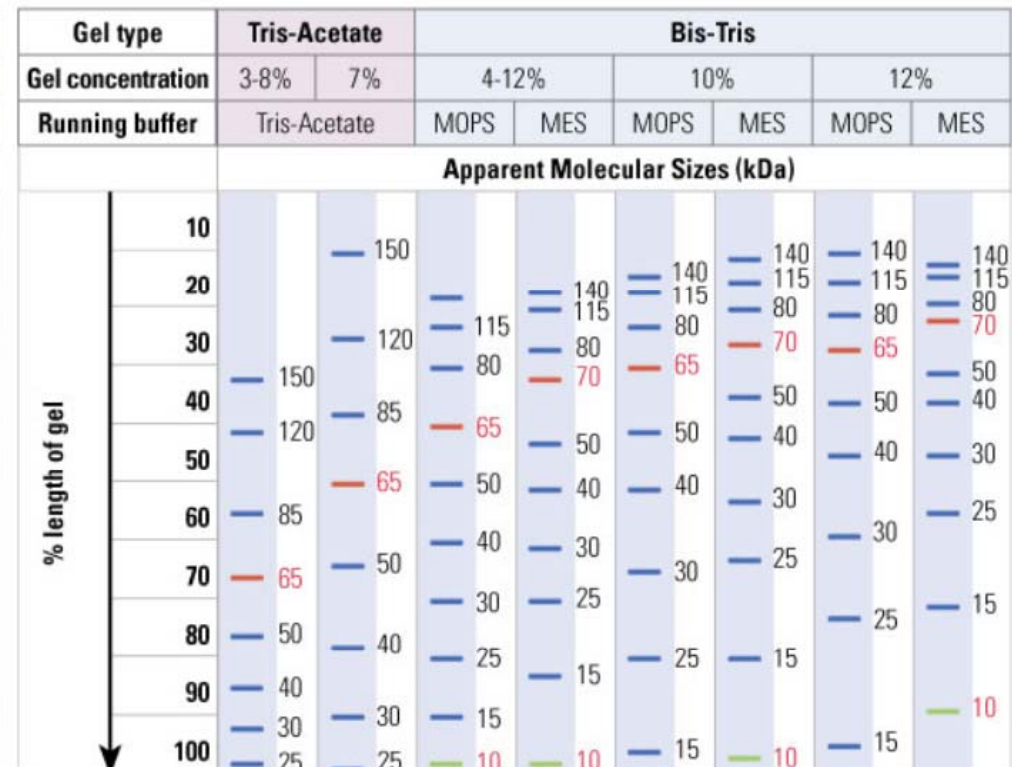
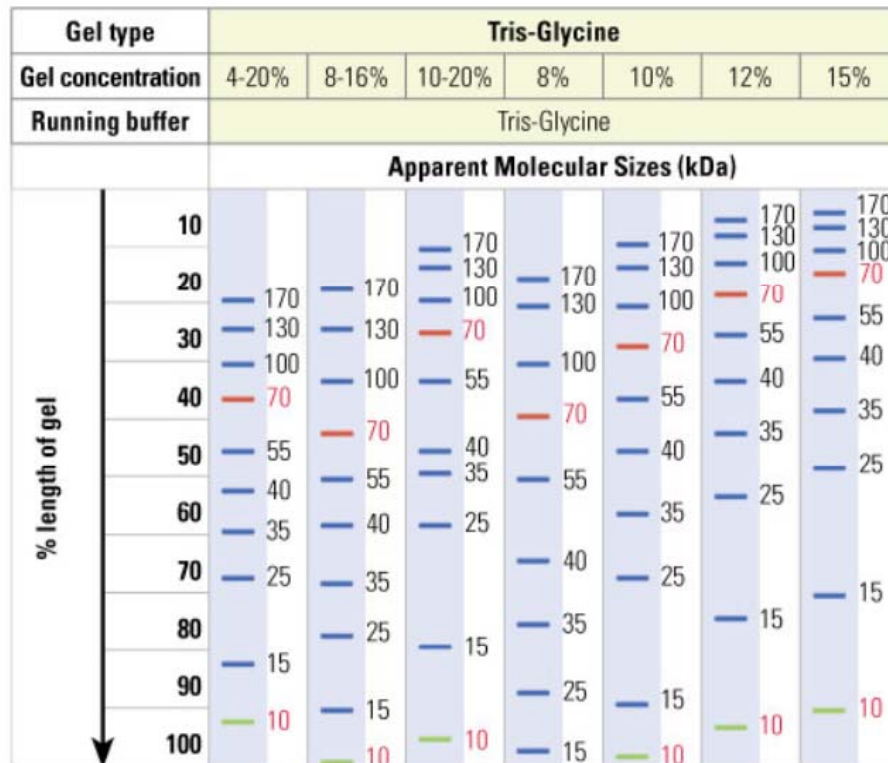
- Komerčně dostupné směsi standardů od různých výrobců
- Nebarvené markery – nejpřesnější, nutno ale vizualizovat barvením (Ponceau S, Coomassie etc.)
- „Prestained“ – s navázaným barvivem, lze sledovat průběh migrace gelem během elektroforézy, ale odhad MW není tak přesný (barvivo ovlivňuje migraci)

Vliv koncentrace akrylamidu v gelu na rozlišení molekulových hmotností

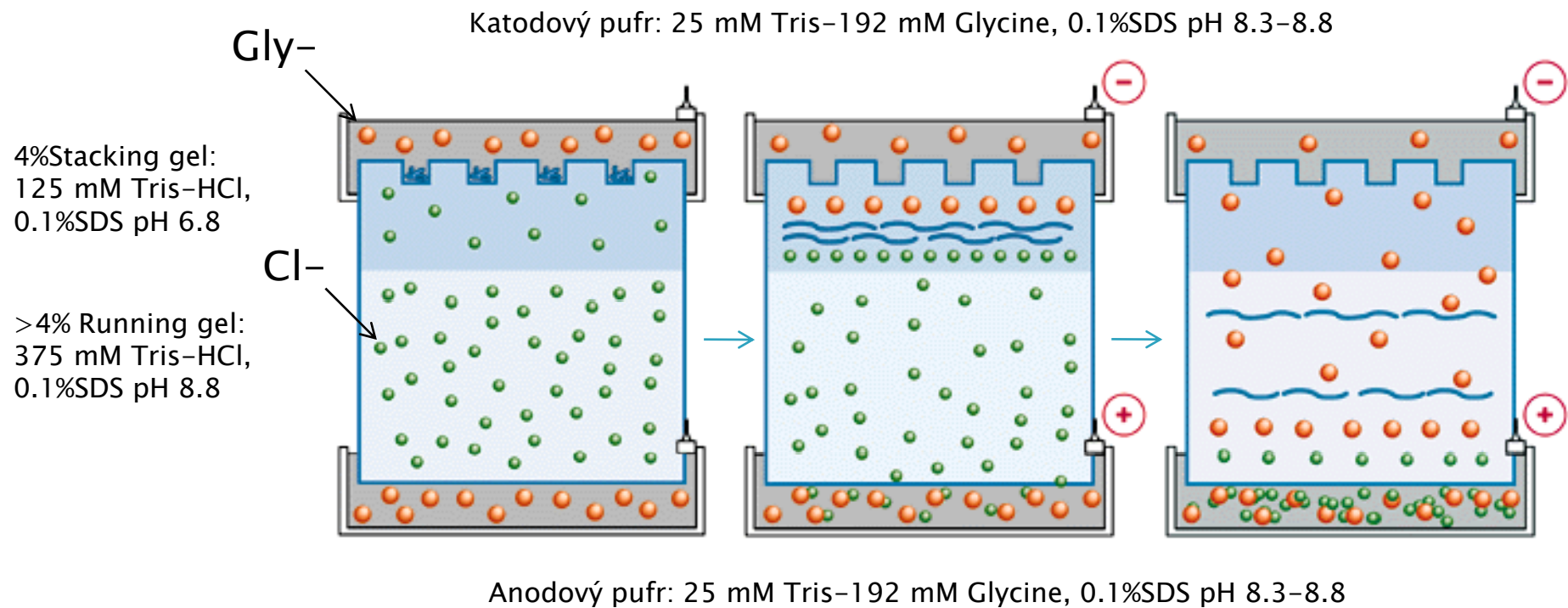
Vyšší koncentrace akrylamidu – lepší rozlišení menších molekul a opačně

Protein MW range, kDa	Recommended gel, %
~5-50	18
~5-60	16
~10-80	14
~20-150	12
~30-200	10
~40-250	8
~60-300	6
~100-400	4

Protein MW range, kDa	Recommended gradient gel, %
~5-100	10-20
~5-300	4-20
~10-200	8-16
~30-300	4-12



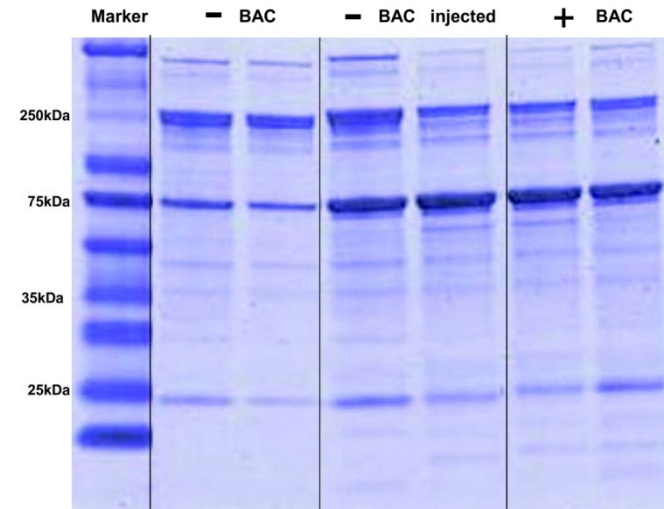
Efekt zaostřovacího gelu v diskontinuálním systému Laemmli SDS-PAGE



Vizualizace proteinů v gelu

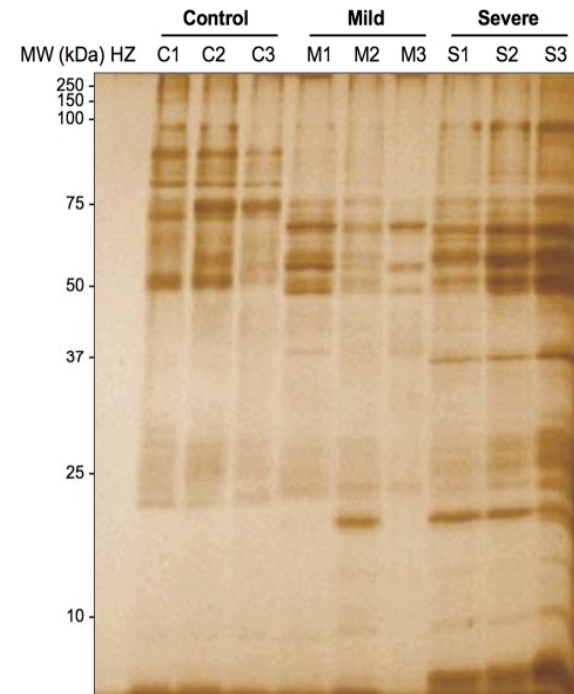
•Coomassie Blue

- R250, G250 ... – různá citlivost, rychlost, rozlišení
- Fixace gelu: 40%MeOH–20%HAc
- Inkubace s Coomassie Blue
- Odbarvení pozadí :10%MeOH–10%Hac
- Detekce 3–50 ng proteinu
- Jednoduchá, kompatibilní s MS detekcí



•Barvení stříbrem

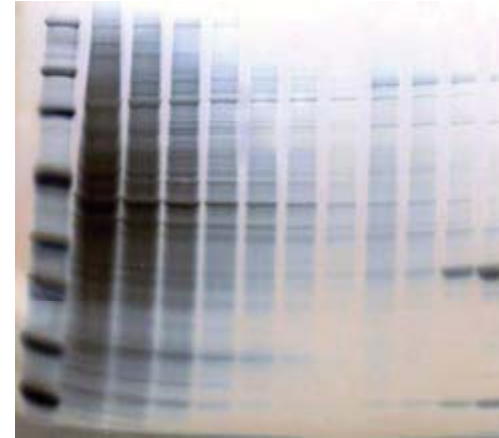
- Dusičnan stříbrný AgNO₃
- Ag⁺ ionty interagují nejvíce s nabitými skupinami Asp, Glu, Cys, His, Lys
- Vymytí slabě navázaných iontů a konverze Ag⁺ na kovové stříbro (formaldehydová nebo glutaraldehydová vývojka, stabilizátor)
- Nejcitlivější technika – 0,5 ng proteinu
- Cross–linky, ireverzibilní, špatná kompatibilita s MS detekcí, nutno optimalizovat



Vizualizace proteinů v gelu

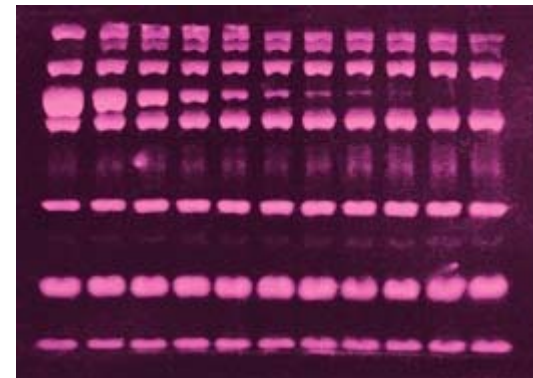
•Barvení zinkem nebo mědí

- Negativní metoda pro SDS-PAGE
- Nerozpustné komplexy Zn nebo Cu s polyakrylamidem vytvářejí mléčné zbarvení okolo míst obsahujících proteiny-SDS, které odpuzuje Zn/Cu
- Citlivé - 1 (5-10) ng proteinu
- Bez fixace, snadné odmytí barvení, kompatibilní s MS aplikacemi



•Fluorescenční barvy

- Krypton Stain, SYPRO-Ruby, Flamingo, Oriole
- Interagují a barví místa s proteiny-SDS
- Rychlé, jednoduché
- Vysoce citlivé 0,25-1 ng proteinu
- Nutný nákladný dokumentační systém schopný detekovat fluorescenci (Ex/Em)
- Snadné odbarvení, kompatibilita s navazujícími aplikacemi



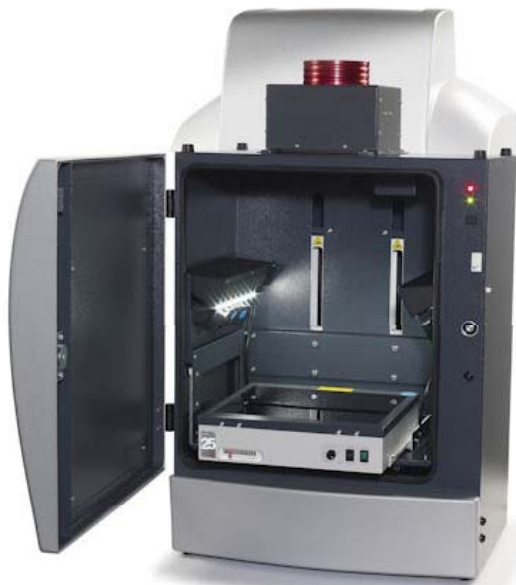
<http://www.lonza.com/>

<http://www.gbiosciences.com/ResearchProducts/ReversibleZincStain-desc.aspx>

Vizualizace proteinů v gelu

- **Specifické fluorescenční barvy**
 - Glykoproteiny (Pro-Q Emerald), fosfoproteiny (Pro-Q Diamond)
- **Stain-free technologie TGX Stain-Free™ Gels (Bio-Rad)**
 - gel obsahuje speciální trihalo sloučeninu, která se po aktivaci UV zářením váže na rezidua tryptofanu a dochází k vizualizaci barvy
 - Citlivost podobná Coomassie, kompatibilní nejen s MS, ale i imunodetekcí

Dokumentační systém



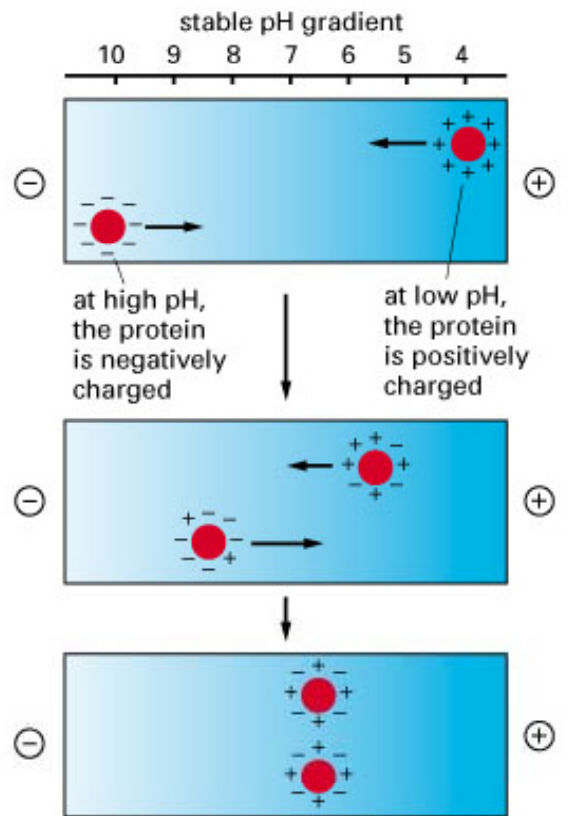
- Gel Doc
- UV-VIS Transiluminátor (event. i epiiluminace) & CCD kamera
- Klasické výbojky nebo LED-excitace
- Ex/Em filtry pro fluorescenci
- Některé systémy umožňují také snímání chemiluminiscence
- software pro denzitometrická vyhodnocení a kvantifikaci

Vizualizace proteinů v gelu – Bio–Rad

Total Protein Stain	Sensitivity (Lower Limit)	Time	Comments	Imaging
<u>Stain-Free</u>				
	Similar to Coomassie and dependent upon tryptophan	No staining or N/A	Fast and reproducible; visualize proteins in 5 minutes or less with a stain-free enabled imager; no staining required	
<u>Coomassie Stains</u>				
Bio-Safe Coomassie G-250	8–28 ng	1–2.5 hr	Nonhazardous staining in aqueous solution; premixed, mass spectrometry compatible	Densitometer
Coomassie Brilliant Blue R-250	36–47 ng	2.5 hr	Simple and consistent; mass spectrometry compatible; requires destaining with methanol	
QC Colloidal Coomassie	3 ng	1–20 hr	Colloidal endpoint stain; premixed, nonhazardous formulation — no methanol required	
<u>Silver Stains</u>				
Silver Stain Plus™ Kit	0.6–1.2 ng	1.5 hr	Simple, robust; mass spectrometry compatible (Gottlieb and Chavko 1987)	Densitometer
<u>Fluorescent Stains</u>				
Oriole Fluorescent Gel Stain*	0.5–1 ng	1.5 hr	Rapid protocol, requires no destaining, mass spectrometry compatible; compatible only with UV excitation	CCD and Laser-Based Scanners
Flamingo Fluorescent Gel Stain	0.25–0.5 ng	5 hr	High sensitivity; broad dynamic range; simple protocol requires no destaining; mass spectrometry compatible; excellent for laser-based scanners	
SYPRO Ruby Protein Gel Stain	1–10 ng	3 hr	Fluorescent protein stain; simple, robust protocol; broad dynamic range; mass spectrometry compatible	

Isoelektrická fokusace

- ▶ Separace proteinů (peptidů) podle jejich izoelektrického bodu (pI)
- ▶ V pH gradientu proteiny v elektrickém poli migrují do oblasti pH, kde budou mít celkový nulový náboj (pH=pI)

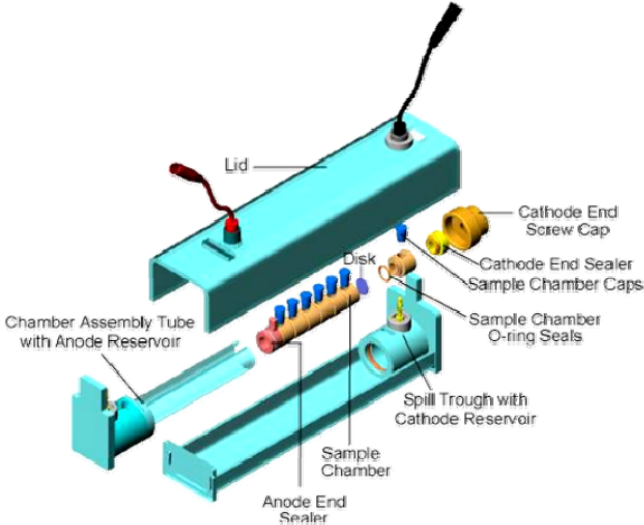


The protein shown here has an isoelectric pH of 6.5.

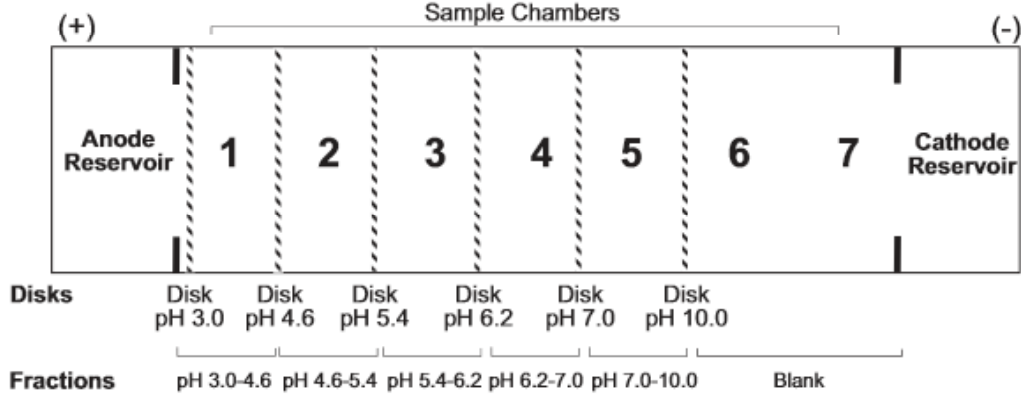
pH gradient vytvořen pomocí amfolytů:

- ▶ Preparativní IEF – rozdělení proteinů v kapalně fázi do frakcí proteinů v rozmezí určitých hodnot pI
 - ▶ Rotofor (Bio-Rad)
 - ▶ ZOOM (Life Tech)
 - ▶ Agilent OFFGEL
- ▶ „Analytická“ IEF – v kombinaci s SDS-PAGE => tzv. 2D-ELFO
- ▶ Metoda „carrier ampholyte IEF“ – amfolyty aplikovány na polyakrylamidový gel v trubičce, zafokusovány, následně aplikace vzorku
- ▶ Immobilizovaný pH gradient IPG – IPG stripy s kovalentně vázanými amfolyty v tenké vrstvě gelu (komerčně dostupné, ready-to-use)

ZOOM IEF Fractionator (LifeTechnologies)



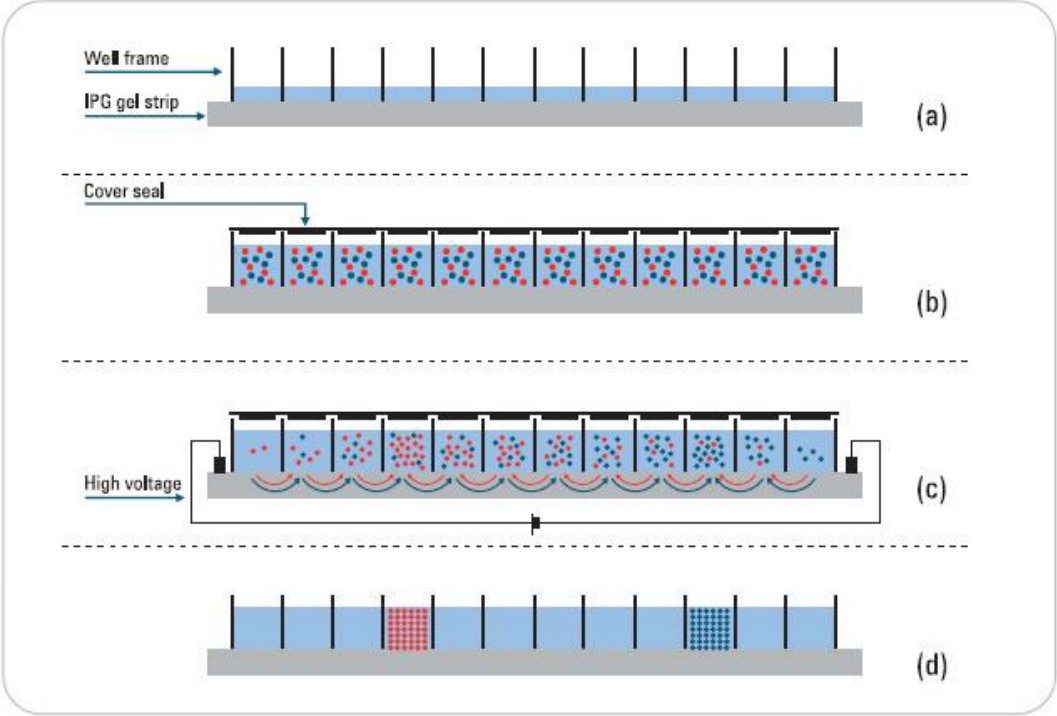
Configuration for fractionation from pH 3.0 to pH 10.0



MicroRotor (BioRad)



OFFGEL 3100 (Agilent)



2D elektroforéza

1. dimenze – Isoelektrická fokusace – pI

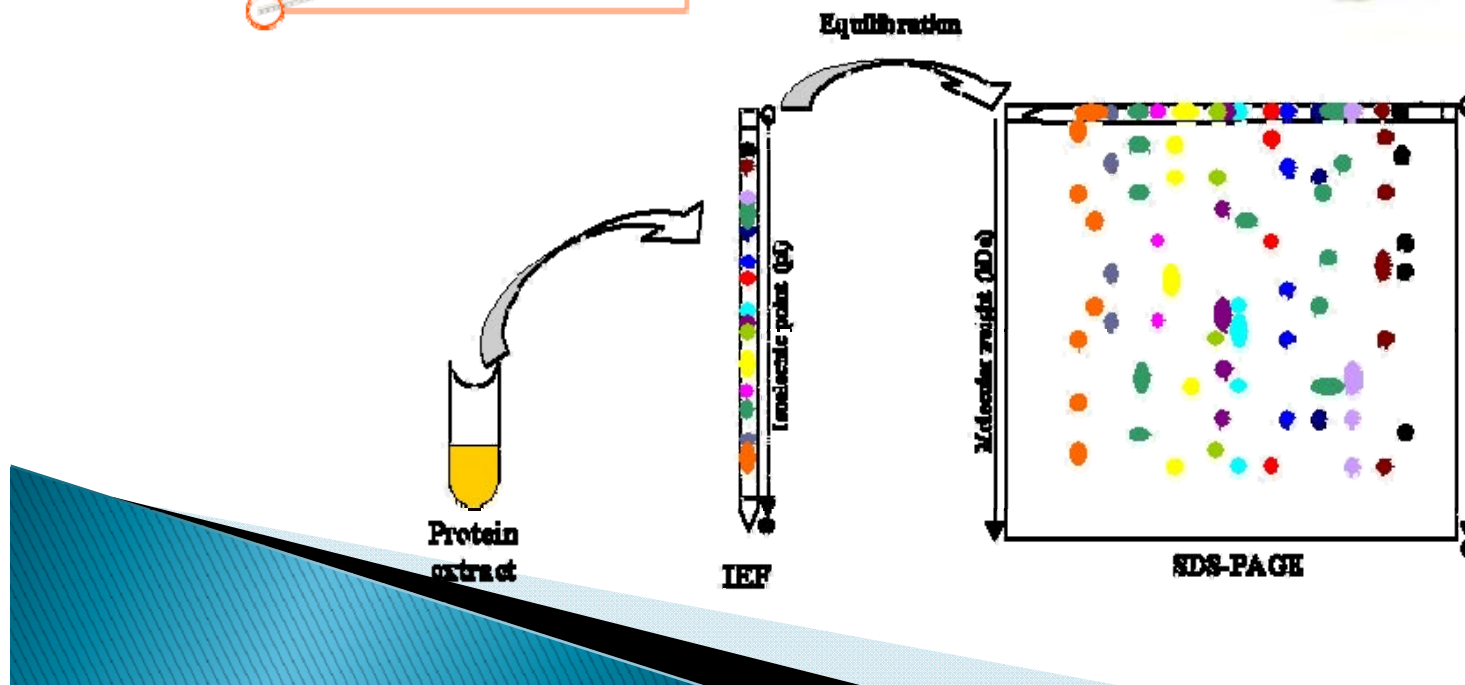
2. Dimenze – SDS-PAGE – MW

IPG Stripy (pro různé oblasti pH)

Isoelektrický fokusátor pro IPG stripy

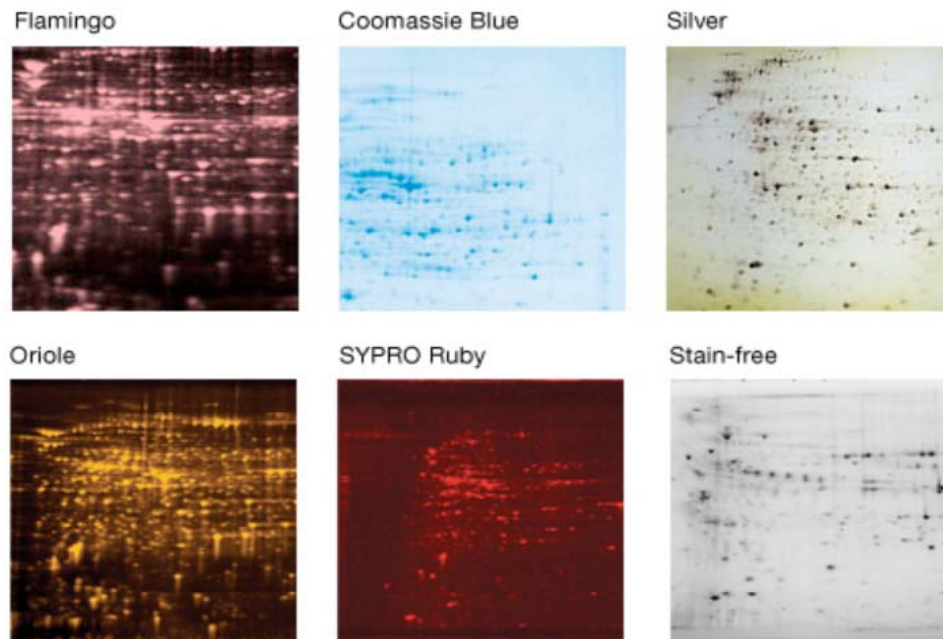


Artisan Technology Group

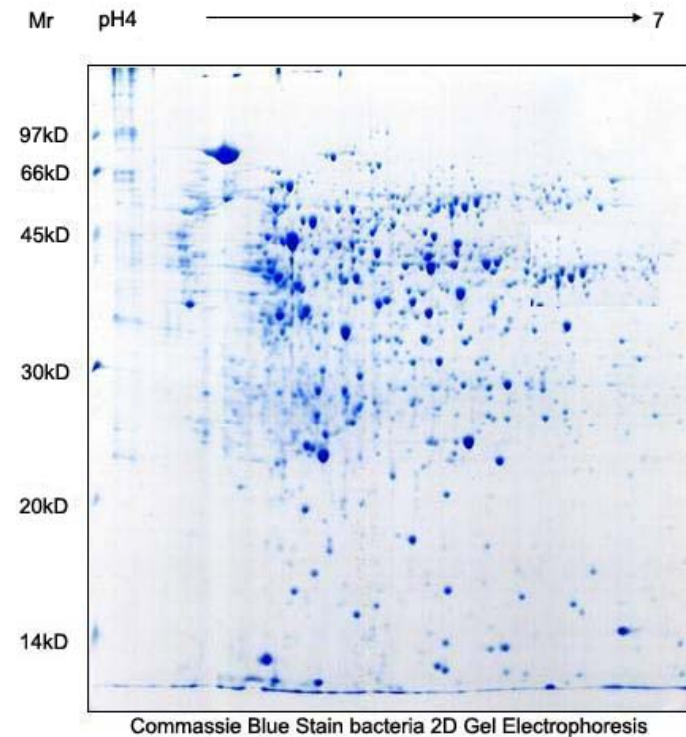


2D elektroforéza

Vizualizace proteinů ve 2D gelu



Možné rozlišení až na úroveň jednotlivých proteinů



Identita proteinů?
Zpravidla LC-MS