

Studium přítomnosti proteinů v buňkách (analýza proteomu)

Metody pro stanovení fyzické přítomnosti proteinů:

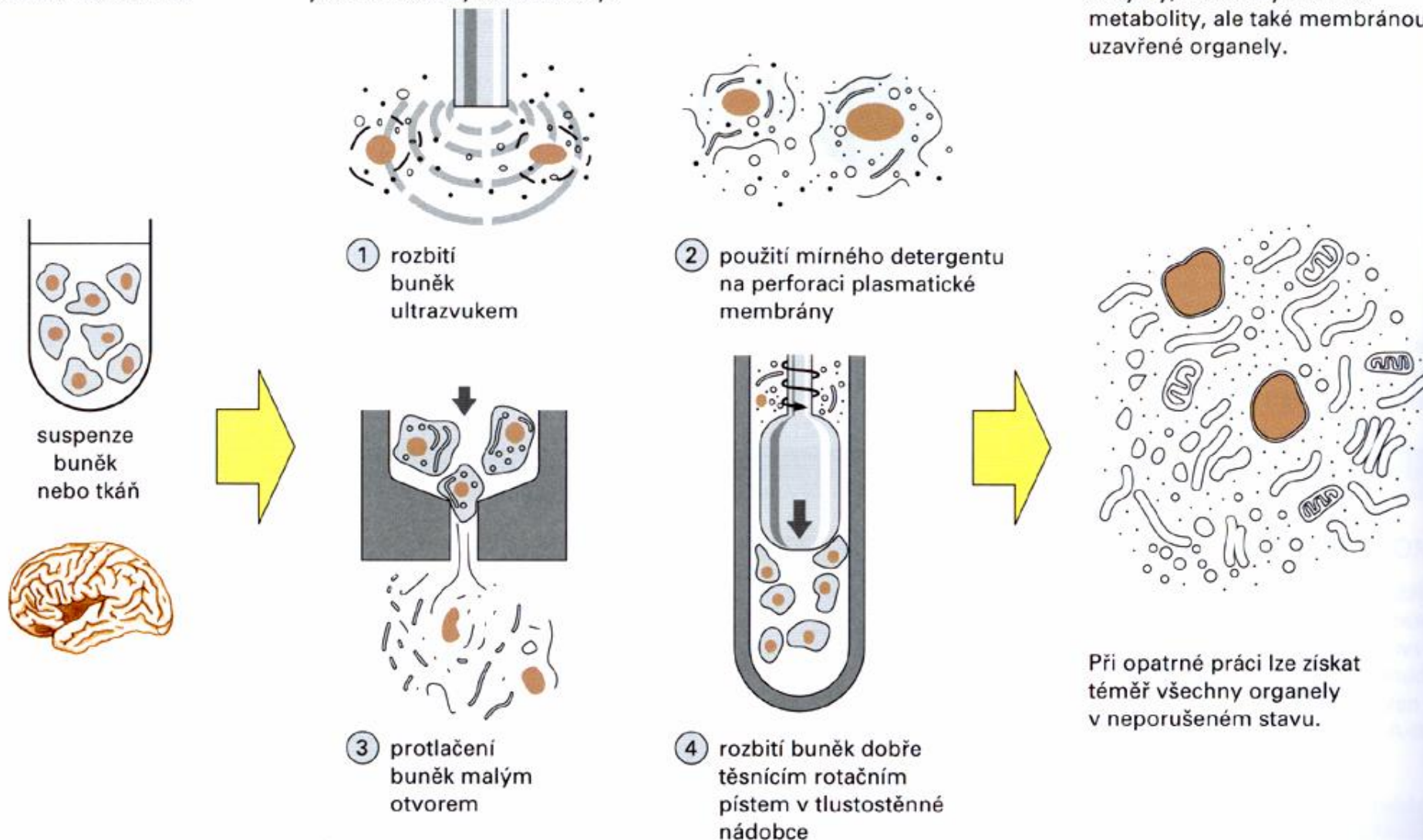
- polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)
- westernový přenos
- imunoprecipitace
- imunohistochemie
- izoelektrická fokusace
- dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
- chromatografie
- fluorescenční a elektronová mikroskopie
- průtoková cytometrie

ROZBÍJENÍ BUNĚK A TKÁNÍ

Prvním krokem purifikace většiny proteinů je rozbití buněk nebo tkáně

Použitím jemných mechanických postupů, zvaných homogenizace, lze perforovat plasmatické membrány buněk, takže se z buněk uvolní jejich obsah. Používané čtyři metody jsou tu ukázány schematicky.

Vznikající hustý homogenát nebo extrakt obsahuje větší i menší molekuly z cytosolu, jako jsou enzymy, ribosomy a různé metabolity, ale také membránou uzavřené organely.

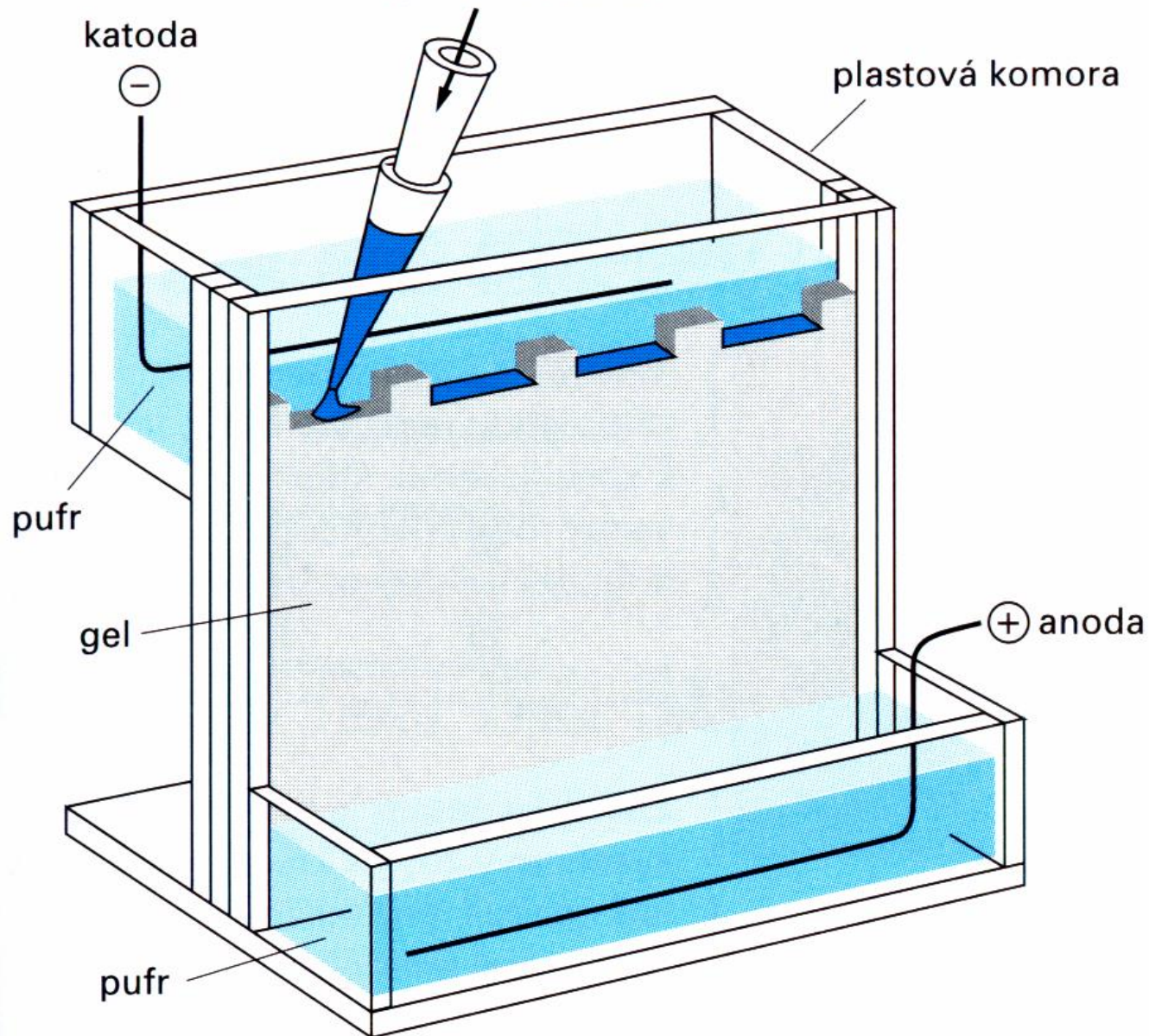


Elektroforetické techniky jsou založeny na
schopnosti pohybu nabitých molekul v
elektrickém poli

- proteiny se obvykle od sebe separují polyakrylamidovou gelovou elektroforézou
- polymerizovaný gel se vloží mezi dvě nádoby naplněné pufrem, do kterých se ponoří elektrody
- u deskové varianty se vzorky nanasou do jamek na horní straně gelu
- používají se alkalické pufry, které proteinům udílejí negativní náboj - v elektrickém poli pohyb směrem k anodě

GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

vzorek se nanáší na gel
speciální pipetou



Faktory ovlivňující pohyblivost proteinů v gelu

- velikost: se vzrůstající velikostí molekuly se snižuje pohyblivost proteinů v gelu (efekt molekulárního síta)
- tvar: globulární proteiny se pohybují rychleji než vláknité
- hustota náboje (náboj/jednotka hmoty): čím vyšší hustota náboje tím vyšší pohyblivost v gelu
- koncentrace akrylamidu: se vzrůstající koncentrací pohyblivost klesá

SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

- proteiny zaujímají různé tvary a disponují různými náboji (na rozdíl od molekul DNA, které jsou uniformní z hlediska tvaru a rozdělení náboje):
- pro separaci proteinů se běžně používá denaturační varianta PAGE zvaná SDS-PAGE
- proteiny se rozpouští ve roztoku obsahujícím negativně nabitě molekuly SDS
- disulfidové vazby se eliminují redukčním činidlem (β -merkaptoetanol)
- denaturace proteinů je dokončena varem

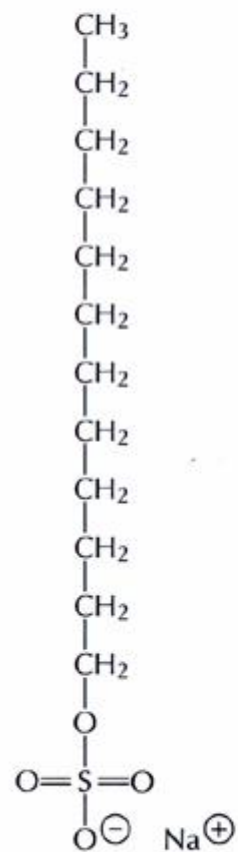
SDS -polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Důsledky vazby SDS na molekuly proteinu:

- elektrostatické odpuzování molekul SDS způsobí natažení proteinu (denaturaci) a eliminuje se tak vliv tvaru proteinu na pohyblivost
- počet molekul SDS navázaných na protein je zhruba úměrný jeho molekulové hmotnosti. Proto má každý protein, bez ohledu na svou velikost, ekvivalentní hustotu náboje.
- větším proteinům bude kladen v gelu větší odpor a jejich pohyb bude pomalejší (efekt molekulárního síta).

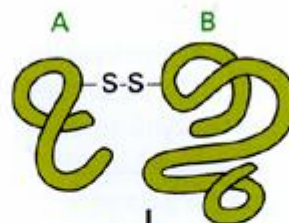
Proteiny se při SDS-PAGE separují pouze podle jediné vlastnosti: molekulové hmotnosti.

detergent
dodecylsulfát sodný
(SDS) se používá
pro solubilizaci
proteinů, které
se pak dělí v SDS-
polyakrylamidové
gelové
elektroforéze



SDS

protein s dvěma
podjednotkami A a B
spojenými disulfidovou
vazbou



samostatná
podjednotka

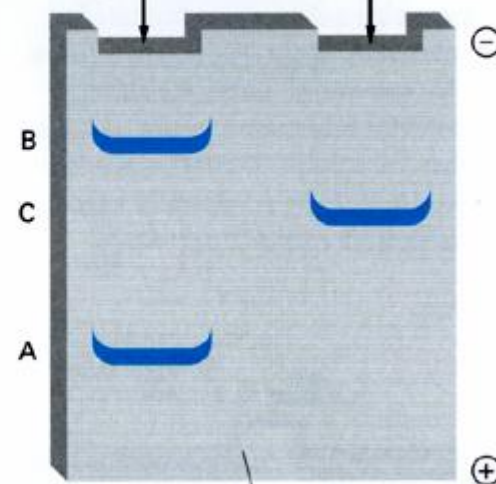


zahřátí s SDS a merkaptoethanolem



záporně
nabitá
molekula SDS

polyakrylamidová gelová elektroforéza



destička polyakrylamidového gelu

Zviditelnění proteinů separovaných PAGE

- nespecificky: obarvení všech proteinů ve vzorku proteinovými barvivy
- specificky: westernový přenos (detekce specifických proteinů protilátkami)

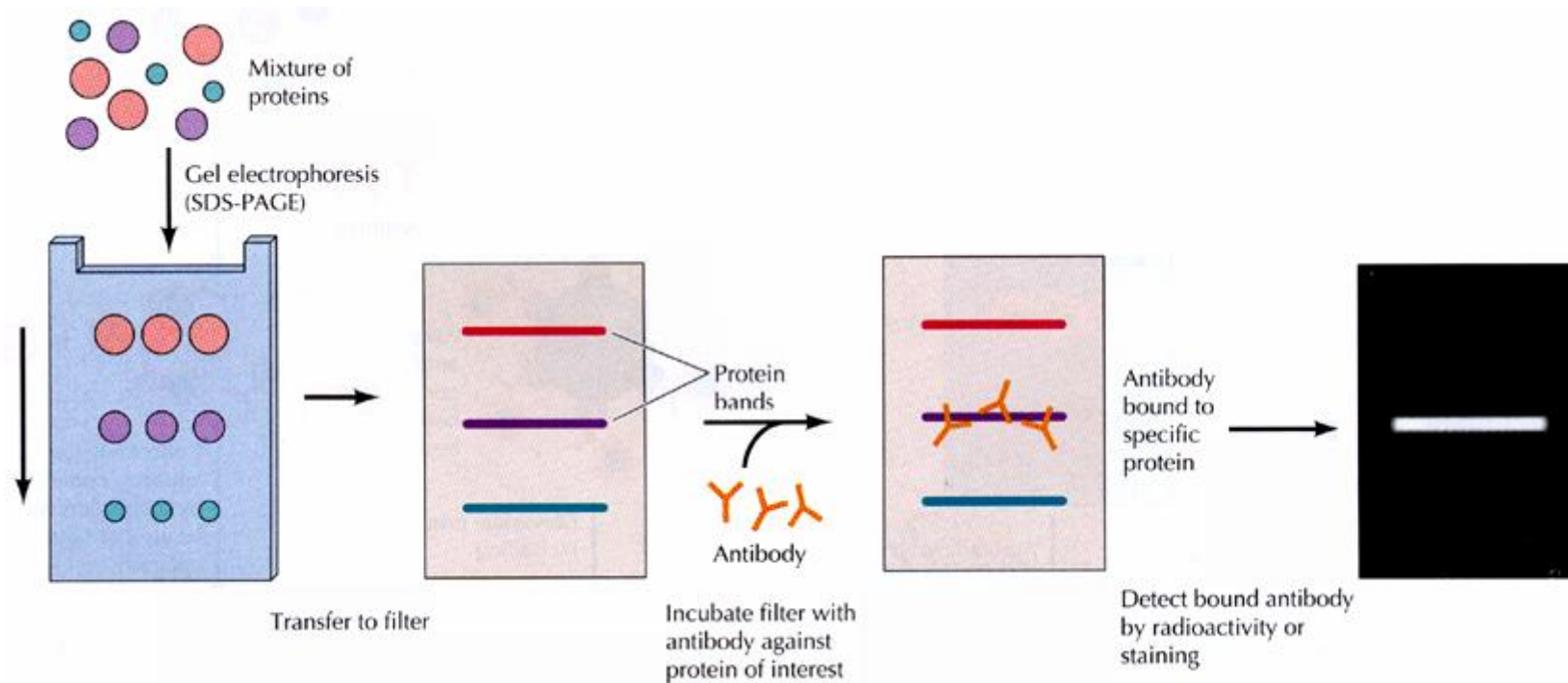
Nespecifické barvení proteinů v gelech:

- stříbro, „coomassie brilliant blue“

Specifické barvení proteinů při westernovém přenosu:

- přenos rozdělených proteinů z gelu na pevný filtr (elektroblotting)
- navázání protilátky na příslušný antigen při promývání filtru v roztoku specifické primární protilátky (protilátka musí rozeznat lineární epitop – protein je denaturován)
- zviditelnění protilátky na filtru např. radioaktivní sondou nebo sekundární protilátkou konjugovanou s určitým enzymem

Zviditelnění proteinů westernovým přenosem



Blotting proteinů a nukleových kyselin

Pro další charakterizaci nebo při mikropreparaci je nutné extrahovat proteiny či nukleové kyseliny z gelu, kteý je nevhodný pro manipulaci i pro provádění detekčních chemických reakcí. Je přitom nutné zabránit smísení separovaných biomakromolekul.

Nejčastěji se používají techniky tzv. blottingu (angl. blot = skvrna, kaňka, česky přenos) . Při blottingu se pásy separované elektroforézou přenášejí na určitou membránu, kde jsou uchyceny adsorpcí nebo kovalentní vazbou. Po vazbě na membránu je pak možné provádět analýzu různými způsoby.

DNA analýza (Southern blotting, Southern 1975)

RNA analýza (Northern blotting, Alwine et al., 1977)

PROT analýza (Western blotting, Towbin et al., 1979)

Southern blotting

DNA je z gelu přenesena na nitrocelulózovou nebo nylonovou membránu. Přítomnost určité jednořetězcové DNA je pak potvrzena hybridizací - vazbou komplementárního DNA řetězce (sonda či proba), který je značen radioaktivně, biotinyací nebo vazbou antigenu pro imunodetekci. Použití např. pro přiřazení fragmentů restriční štěpení genomové DNA jednotlivým genům.

Northern blotting

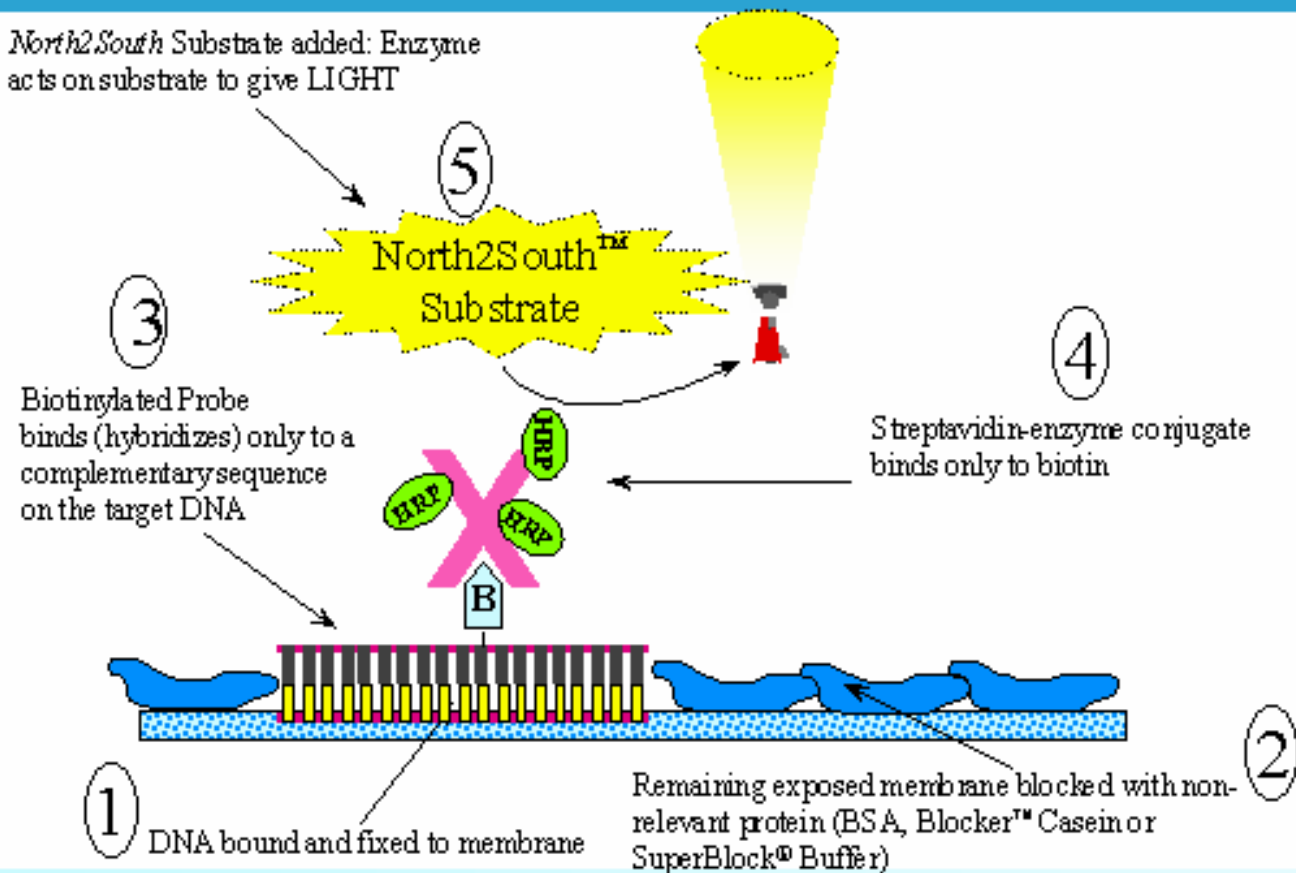
Separovaná RNA je přenesena na membránu. Specifická detekce se děje hybridizací s komplementární DNA sondou, která je značena.

Obě metody mají velký význam pro molekulární biologii, ale v současné době jsou častěji zastupovány PCR technikami.

Southern & Northern Blotting

Typical Southern Blot Using Biotinylated Probe

North2South Substrate added: Enzyme acts on substrate to give LIGHT

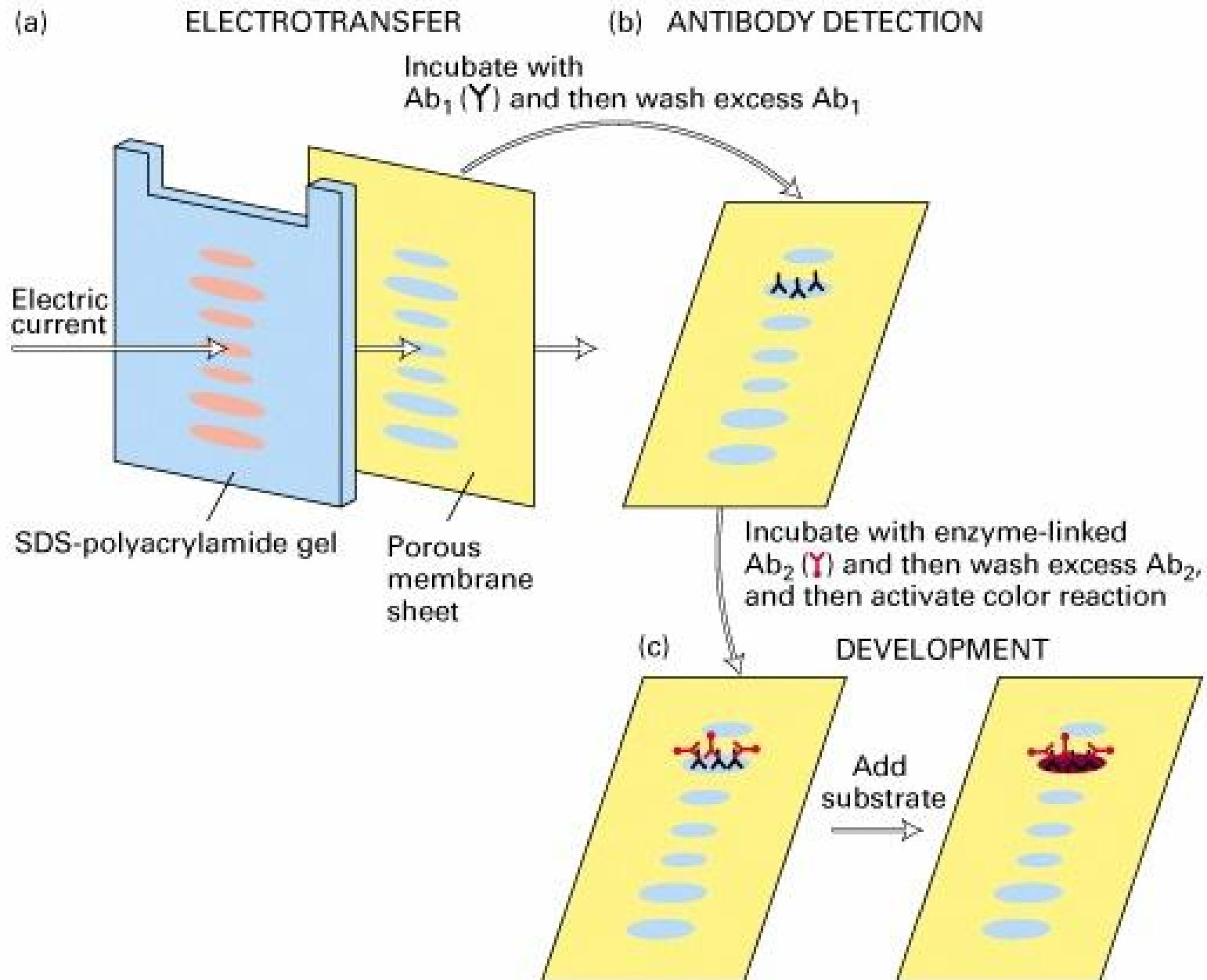


North2South™, Blocker™ and SuperBlock® are trademarks of Pierce Chemical Company.

Western blotting

Proteiny jsou separovány SDS-PAGE a následně přeneseny na nitrocelulózovou nebo polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu. Barvení na membráně se provádí pomocí Ponceau S, Fast Green nebo Amidočerni10 B.

Specifická detekce proteinů se provádí použitím primárních protilátek; vzniklý imunokomplex se vizualizuje vazbou značené sekundární protilátky nebo značeného proteinu A či G (značení nejčastěji *vazbou enzymu* - např. alkalické fosfatasy a peroxidasy, ale i *koloidním zlatem*, *radioaktivně*, *luminiscenčně* či *fluorescenčně*. Detekce glykoproteinů se děje modifikovanou Schiffovou reakcí, alcianovou modří, vazbou lektinů. Některé enzymy lze prokázat běžnou reakční směsí neboť při blottingu často dochází k renaturaci již denaturovaných bílkovin.



Blokování

Vzhledem k tomu, že většina používaných detekčních systémů po blottingu obsahuje jako indikační složky proteiny, je nutné po vlastním přenosu blokovat zbývající vazebná místa na membráně, aby zde nedocházelo k nespecifické vazbě těchto bílkovin. Nesmí však dojít k vytěsnění vzorku, jeho modifikaci nebo k interferenci s detekční reakcí. Používají se: inertní proteiny BSA, kasein, hemoglobin, želatina příp. nízkotučné mléko.

Nespecifické vazbě proteinů na membránu při detekci brání v některých aplikacích použití neionogenních detergentů.

Obdobně je nutné inaktivovat volné reaktivní skupiny diazotovaných membrán a membrán aktivovaných CNBr. To se dělá použitím 10% roztoku ethanolaminu.

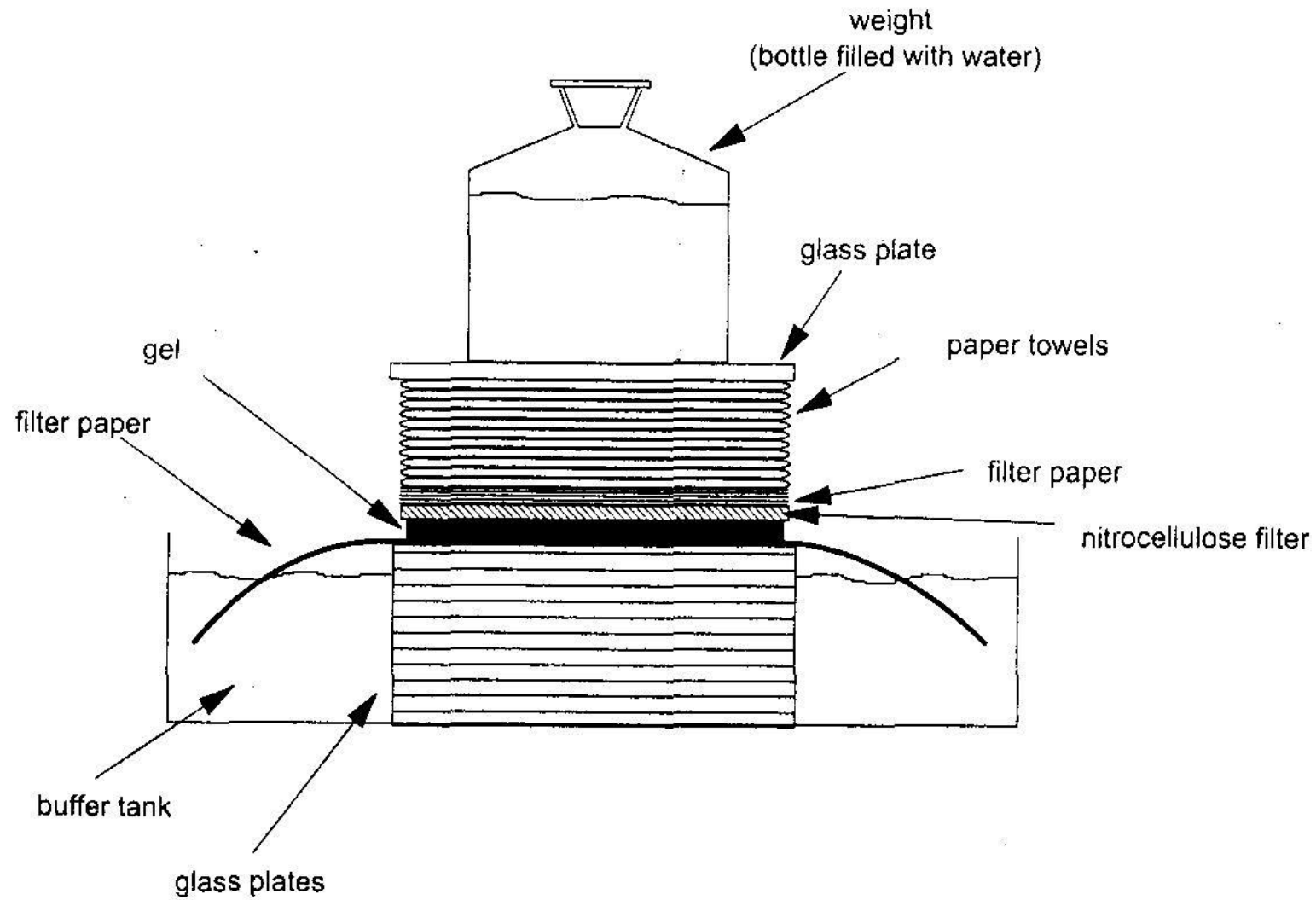
Rozdělení metod blottingu podle provedení

Difuzní blotting - prostá difuze v tanku s přenosovým pufrem, dlouhá doba 36-48 hodin, velkou nevýhodou difuze do stran - zhoršení rozlišení vlastní elektroforetické separace.

Kapilární blotting - blotovací membrána umístěna na povrchu gelu, který leží na porézní podložce v nádobě s přenosovým pufrem, na ní pak vrstva vlhkého filtračního papíru a řada vrstev suchých filtračních papírů. Celá jednotka je zatížena. Suchý papír nasává kapilárními silami pufr, vzorek je tak tažen z gelu na membránu. Trvá zhruba 12 hodin.

Vakuový blotting - obdobné uspořádání jako u kapilárního blottingu, místo kapilárních sil vzorek tažen vakuem. Podstatně rychlejší (30 min). Výhodou též ostřejší pásy (potlačení difuze).

Kapilární blotting



Rozdělení metod blottingu podle provedení

Elektroblotting - nejrychlejší a nejúčinnější metoda. Hnací silou je v tomto případě síla elektrického pole. Podle provedení se rozlišuje tzv. „tankový (tank, wet)“ blotting a „polosuchý (semi-dry)“ blotting. Jediný pro vysokomolekulární biopolymery.

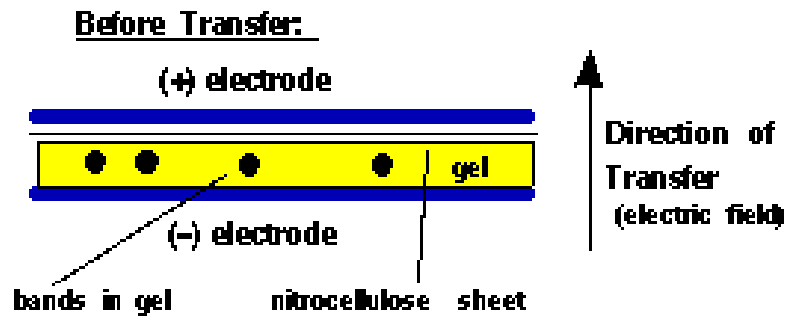
Hlavními výhodami polosuchého blottingu v porovnání s tankovým jsou:

1) homogenní elektrické pole, 2) možnost vyššího napěťového gradientu , 3) menší spotřeba přenosového pufru, 4) možnost simultánního přenosu z několika gelů

Volba přenosového pufru je podmínkou pro úspěšný blotting. Důležitý pro výběr složení je zejména typ použité membrány, u elektroblottingu přistupuje ještě pH pufru a iontová síla.

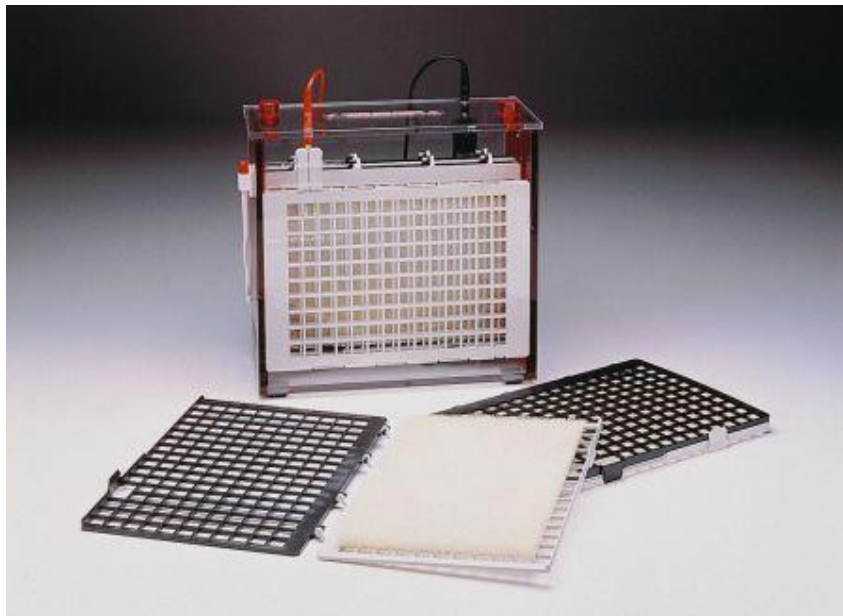
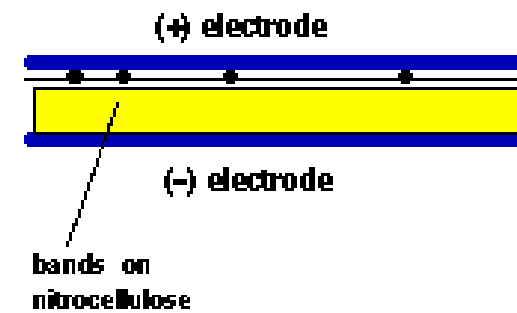
Elektroblotting

Side View:

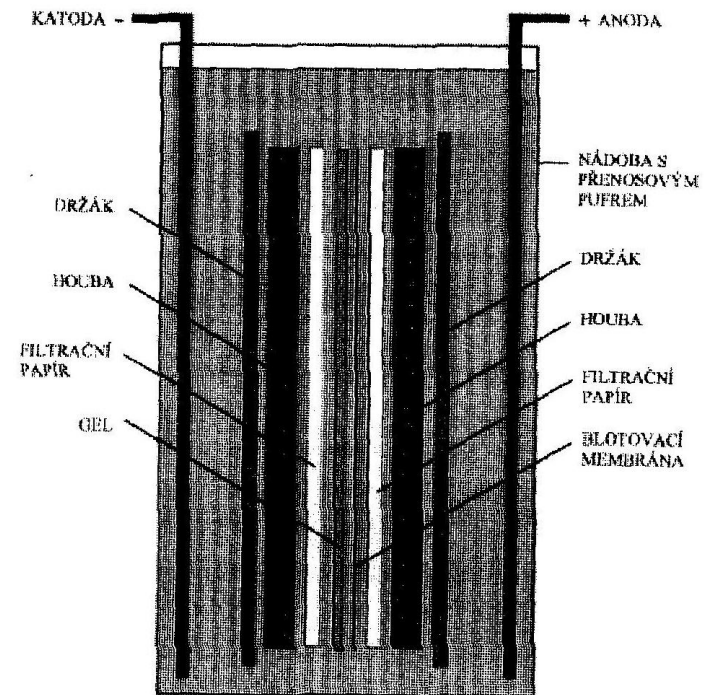
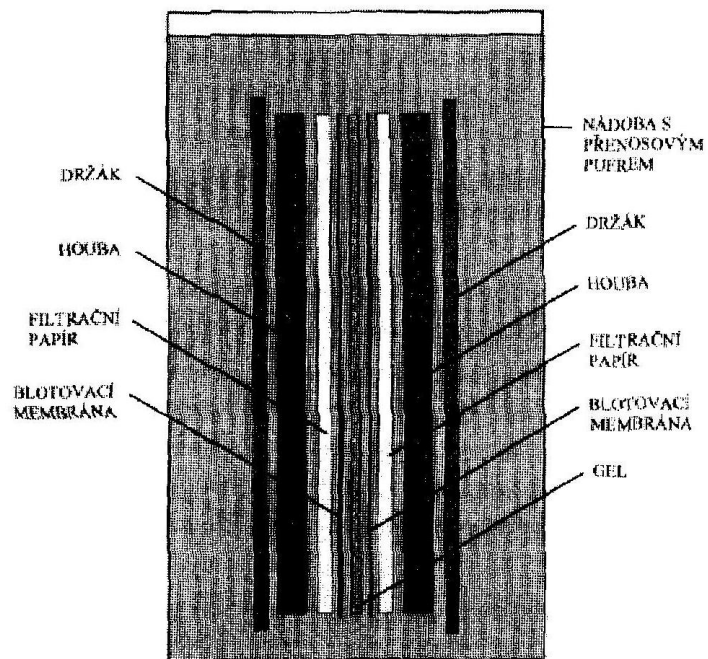


Note: All the layers are pressed tightly together.

After Transfer:



Difuzní blotting a tankový elektroblotting



Polosuchý elektroblotting

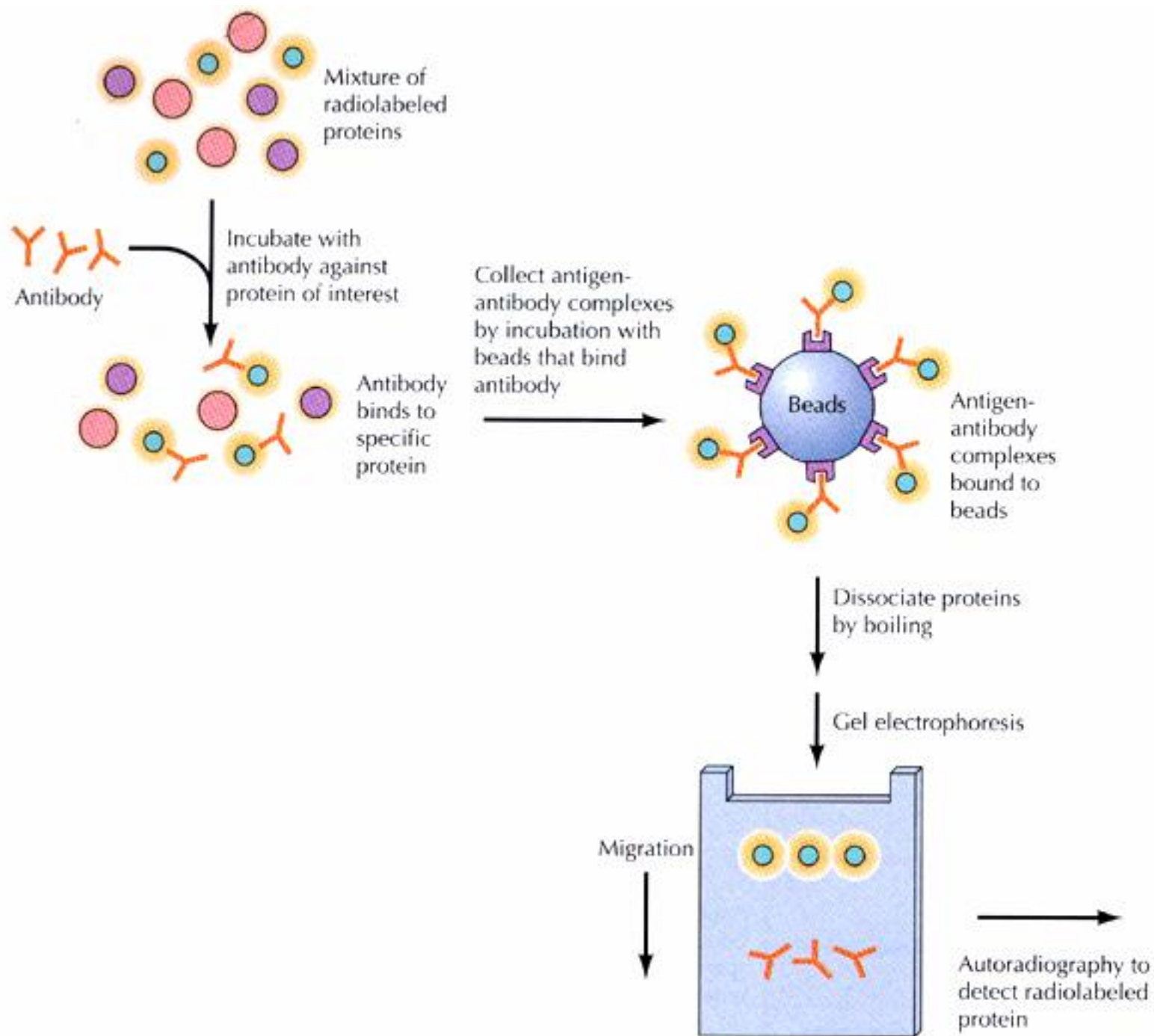


Imunoprecipitace

- technika izolace specifických proteinů z proteinových směsí prostřednictvím protilátek

Obvyklý postup:

- označení buněčných proteinů inkubací buněk za přítomnosti radioaktivně značených aminokyselin (není nutné, pokud jsou k dispozici jiné metody pro detekci vysrážených a od protilátek oddělených proteinů)
- lýze buněk
- inkubace buněčných extraktů, které obsahují značené proteiny s protilátkou specifickou pro cílový protein
- vytvořené komplexy se oddělí od zbytku extraktů prostřednictvím kuliček vážoucích imunoglobuliny
- varem se cílové proteiny oddělí od imunoglobulinů a kuliček
- elektroforéza, autoradiografie (westernový přenos)



Použití imunoprecipitace pro studium meziproteinových interakcí

- technika kombinující imunoprecipitaci za nativních podmínek a westernový přenos

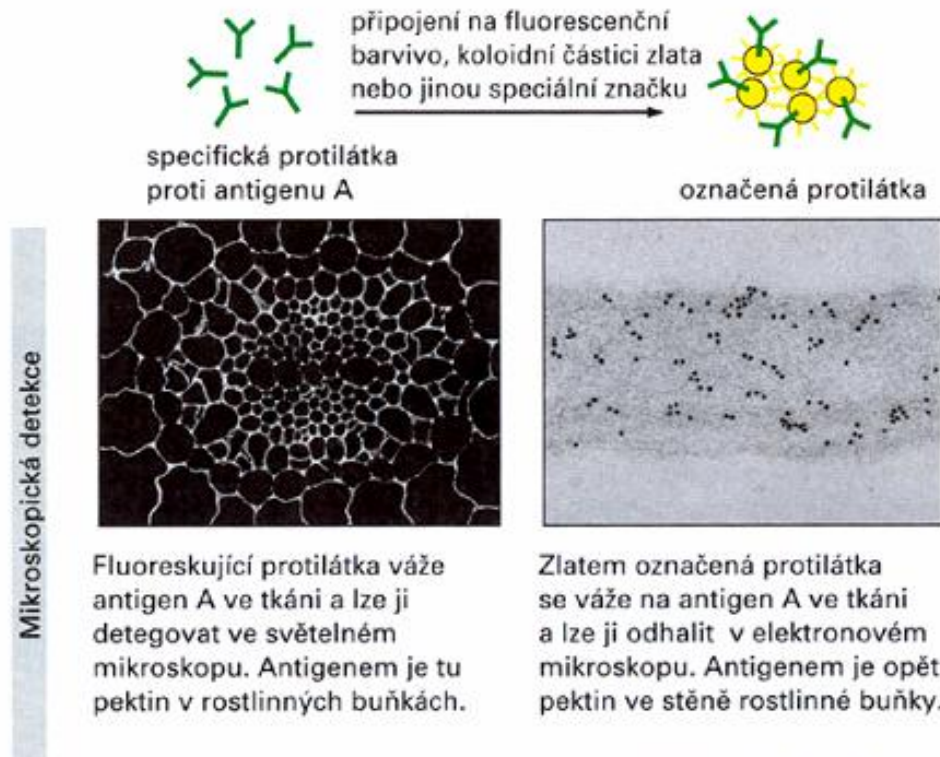
Obvyklý postup:

- precipitace cílového proteinu z buněčných extraktů protilátkou za takových podmínek, které neničí vazby mezi proteiny
- cílový protein bude precipitován v komplexu se svými přirozenými partnery
- purifikované komplexy se denaturují a podrobí SDS-PAGE
- přítomnost současně precipitovaných partnerských proteinů se stanoví westernovým přenosem

Imunohistochemie

Účel:

- n určení, ve kterých buňkách je daný protein přítomen (obdoba hybridizace nukleových kyselin *in situ*)
- n určení, v které části buňky je daný protein přítomen (membránový, cytoplazmatický, jaderný) – lokalizace naznačuje funkci



Izoelektrická fokusace

- varianta elektroforézy, kde podpůrným médiem je polyakrylamidový gel obsahující směs amfolytů

Amfolyty:

- polymery o nízké molekulové hmotnosti, které mají různé poměry pozitivně nabitých aminoskupin a negativně nabitých karboxylových skupin
- při elektroforéze se amfolyty rovnoměrně rozdělují v gelu podle náboje a tak v něm vytvářejí gradient pH

Princip:

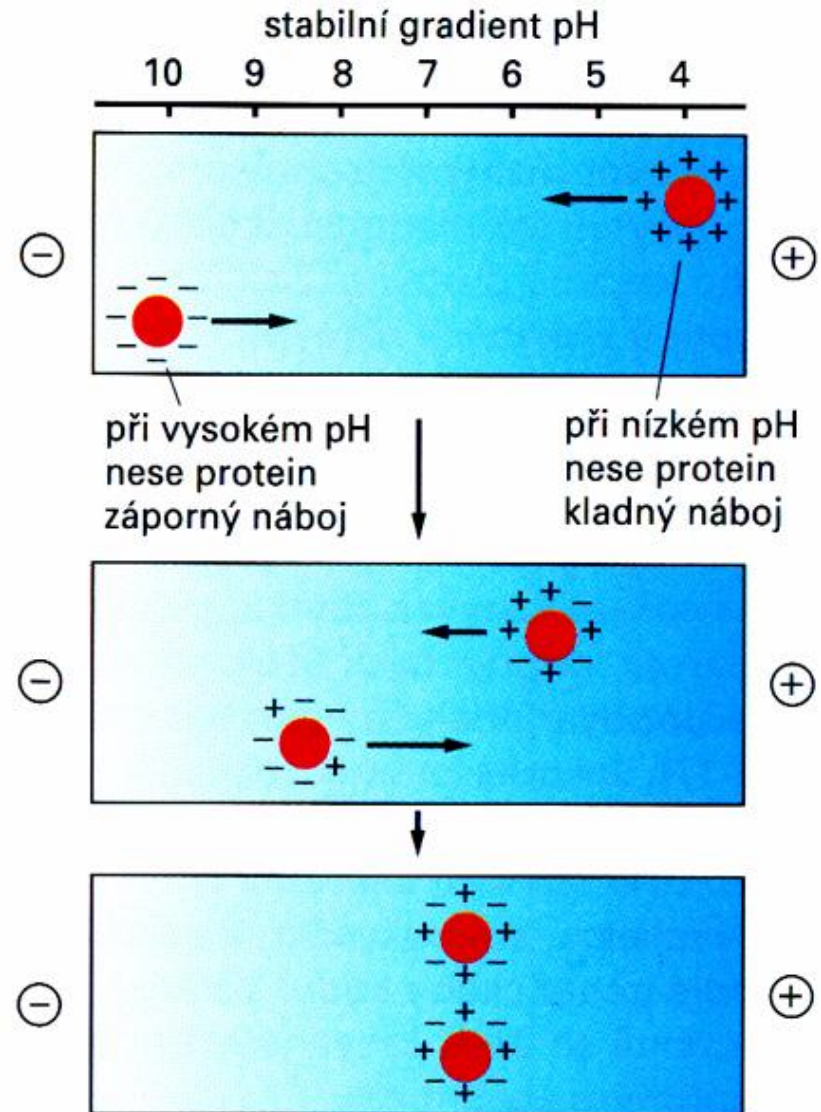
- proteiny se pohybují gelem a jsou vystaveny gradientu pH
- změnou pH se mění iontový náboj, který proteiny nesou
- protein se dostane do oblasti takového pH, při kterém nemá žádný náboj (je v izoelektrickém bodu) a jeho pohyb se zastaví

Výhoda:

- protein je soustředěn do velmi ostrého proužku

IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

Každý protein je charakterizován svým **izoelektrickým bodem**, což je pH, při kterém protein nese žádný výsledný elektrický náboj. V tomto bodě se nebude pohybovat v elektrickém poli. Při **izoelektrické fokusaci** se proteiny dělí elektroforézou v tenké trubičce s polyakrylamidovým gelem, v níž je vytvořen gradient pH ze směsi speciálních pufrů. Každý protein se pohybuje až do vzdálenosti, která odpovídá jeho izoelektrickému bodu, a tam setrvává.



Protein v naší ukázce má izoelektrický bod při pH 6,5

Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

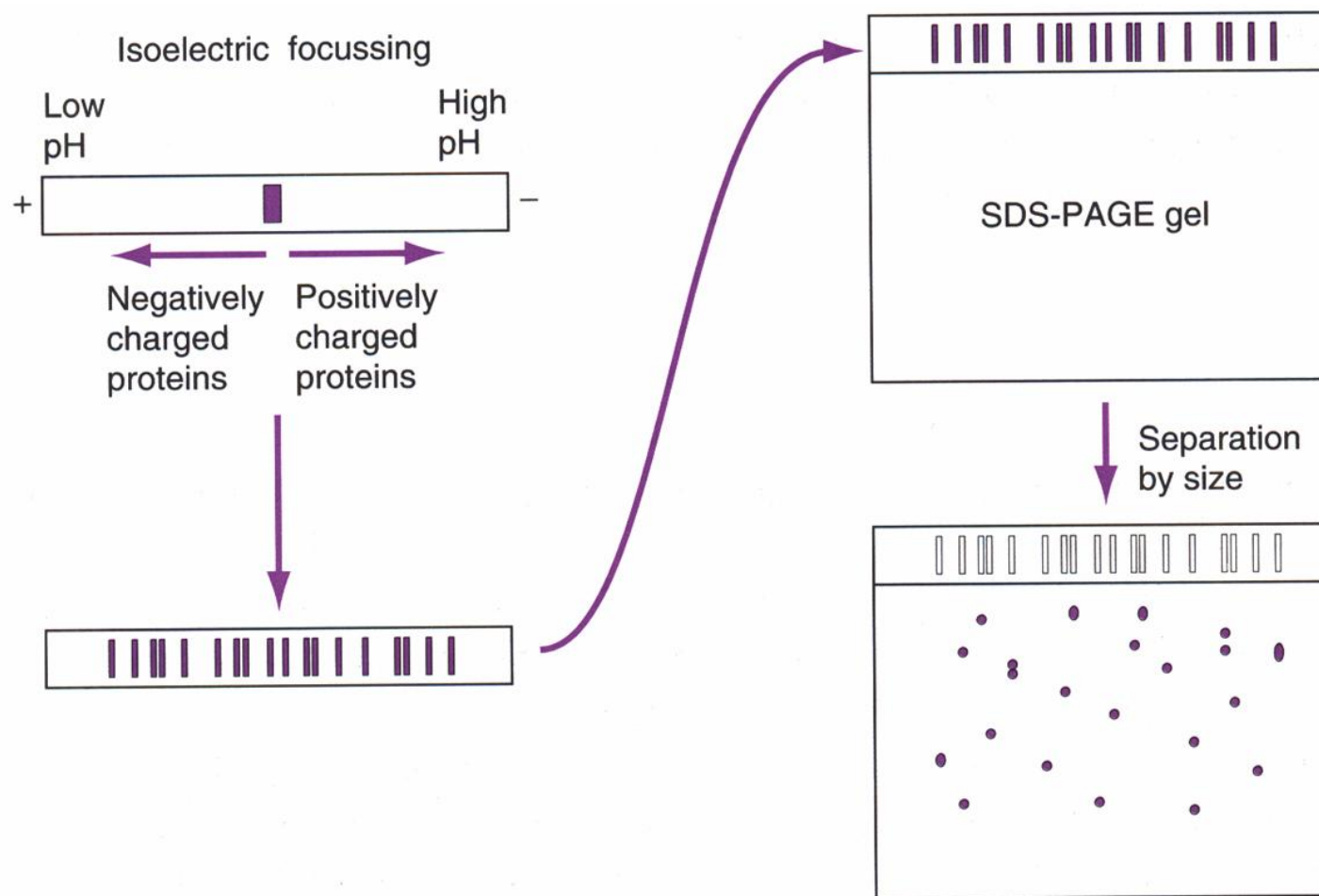
- pro dělení komplexních směsí proteinů, které nelze řádně rozdělit jednorozměrnou elektroforézou
- možno srovnat úplný proteom v buňkách vystavených různým podmínkám, v buňkách zdravých a nemocných, zjistit změny proteomu v průběhu diferenciaci, apod.

Obvyklý postup:

- nativní proteiny se dělí v úzkém pásu gelu podle elektrického náboje izoelektrickou fokusací
- pruh gelu s proteiny se umístí na desku gelu a zapojí se elektrické pole jako u SDS-PAGE ve směru kolmém ke směru fokusace
- každý protein má na ploše gelu jedinečné místo

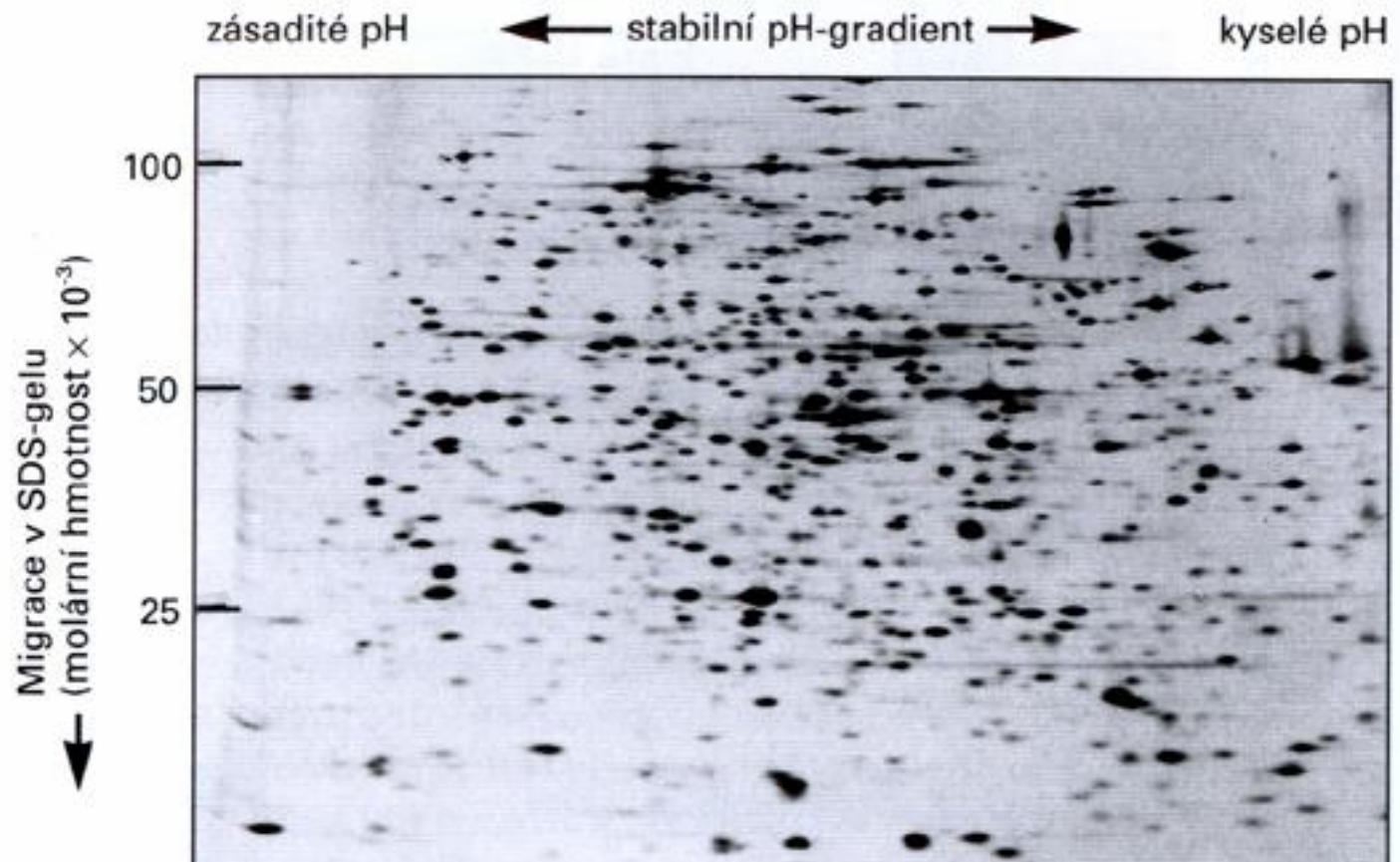
Výhoda: vysoká rozlišovací schopnost - více než 1000 proteinů/gel

Dvourozměrná elektroforéza proteinů



DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU

Všechny proteiny
buňky bakterie
Escherichia coli jsou
rozděleny na tomto
dvourozměrném
gelu, na němž každá
skvrna odpovídá
jinému polypeptidu.
Nejdříve byl vzorek
rozdělen
izoelektrickou
fokusací zleva
doprava a pak
elektroforézou podle
své hmotnosti shora
dolů.



Sloupcová chromatografie

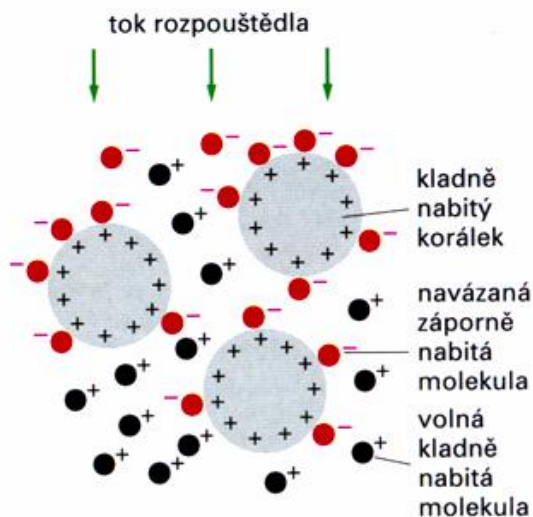
Obvyklý postup:

- směs proteinů v roztoku se pomalu nalévá na válcovou kolonu naplněnou propustnou pevnou matricí ponořenou do rozpouštědla
- kolona se promývá
- různé proteiny mají různou míru afinity s náplní kolony a proto je lze odděleně sbírat při výtoku z kolony
- podle typu náplně můžeme proteiny dělit např. podle velikosti nebo podle schopnosti vázat se na určité chemické skupiny náplně

Tři druhy sloupcové chromatografie

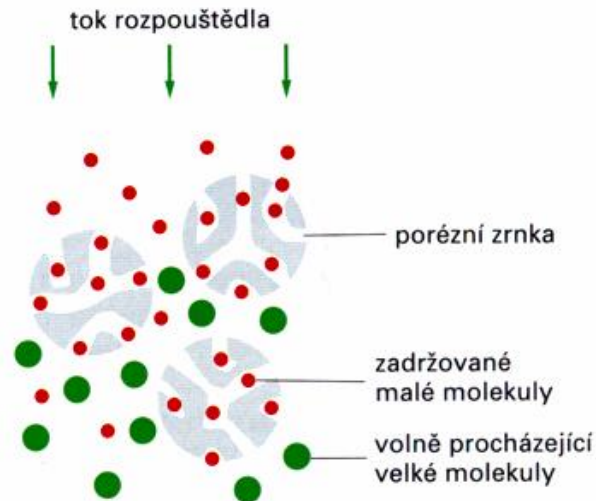
- iontoměničová: podle náboje, vazba mezi proteinem a náplní kolony závisí na pH a iontové síle roztoku
- gelová: podle velikosti
- afinitní: náplň je opatřena molekulami, které specificky interagují s cílovým proteinem (např. protilátka/antigen, enzym/substrát)

Tři druhy sloupcové chromatografie



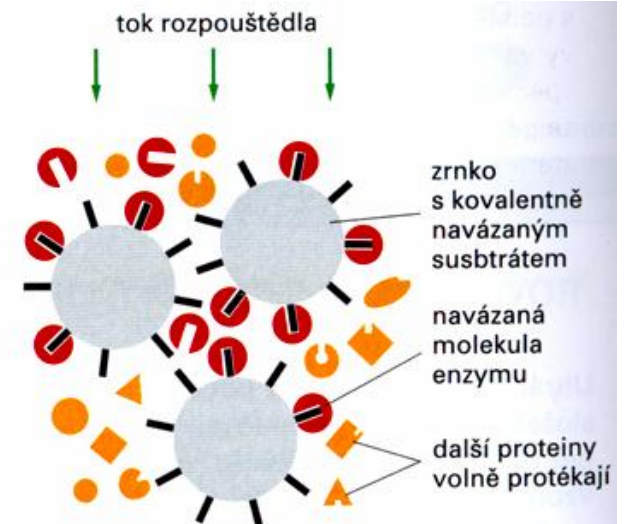
(A) IONTOMĚNIČOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Kolony jsou naplněny iontoměničem s navázanými kladnými nebo zápornými náboji tak, aby zadržovaly proteiny s opačnou polaritou. Vazba mezi proteinem a náplní kolony závisí na pH a iontové síle roztoku, který kolonou protéká. Ty lze regulovat tak, aby se dosáhlo účinné separace.



(B) GELOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Při gelové filtraci se dělí proteiny podle velikosti. Náplň se tady skládá z porézních zrněk, kdy malé molekuly proteinů mohou vstupovat do pórů, a jsou tak zadržovány v postupu kolonou. Proteiny, které jsou větší a nemohou pronikat do porézních zrněk, procházejí kolonou rychleji.



(C) AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

Kolony pro afinitní chromatografii obsahují náplň, která je kovalentně vázána k molekulám, jež specificky reagují se studovaným proteinem (např. protilátkou nebo substrátem enzymu). Proteiny specificky navázané v koloně lze pak uvolnit změnou pH nebo koncentrace solného roztoku, kterým se kolona promývá. Proteiny pak získáme zcela čisté.