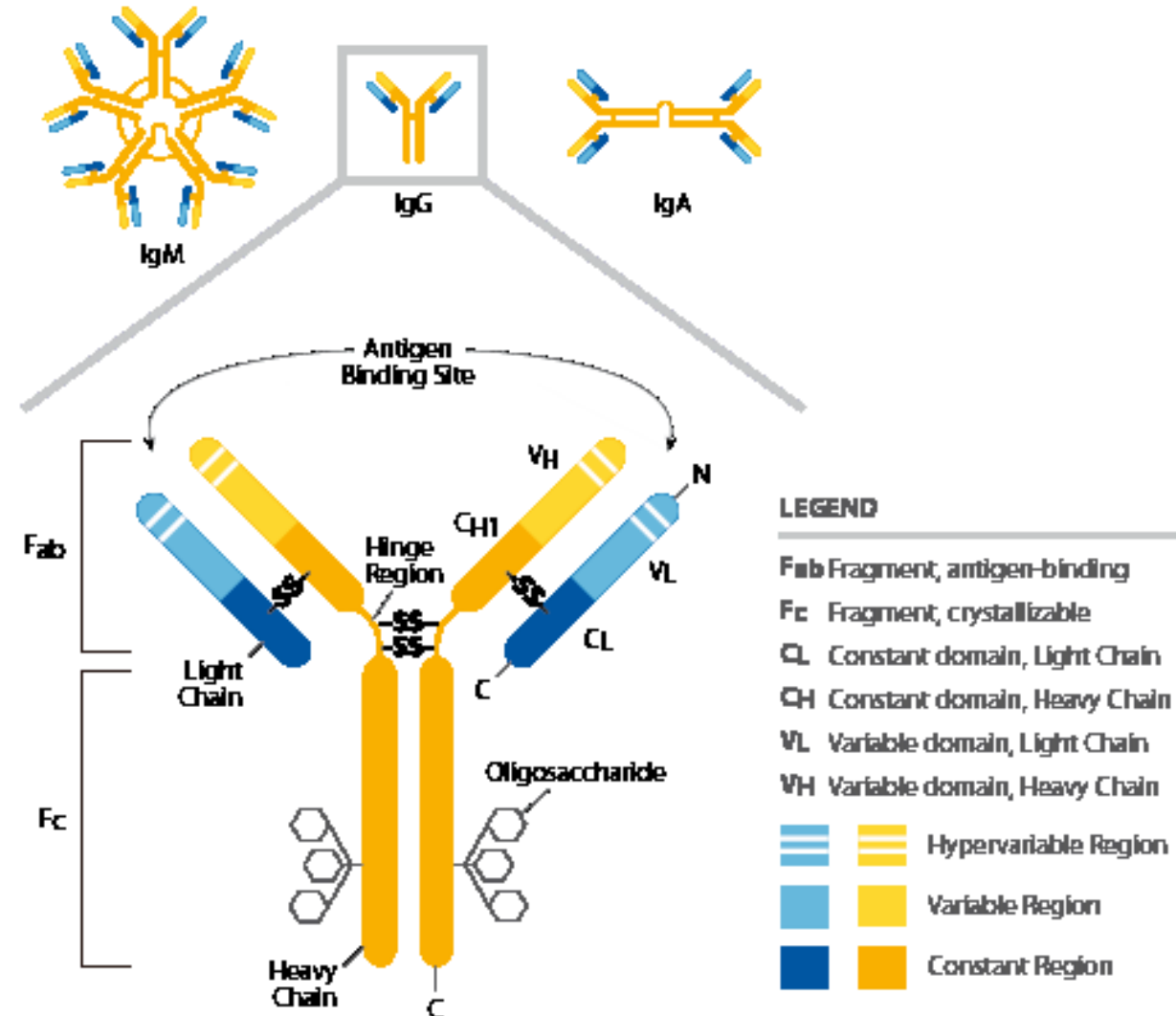


Imunoprecipitace

- technika izolace specifických proteinů z proteinových směsí prostřednictvím protilátek
- protilátky jsou v komplexu se svými antigeny odděleny od ostatních molekul pomocí proteinů A nebo G (zdroj bakterie), které vážou imunoglobuliny a současně jsou imobilizovány na pevném podkladu („beads“)
- proteiny A a G se vážou na oblast Fc těžkých řetězců
- oblast Fab je stále k dispozici pro vazbu antigenu



Využití imunoprecipitace

Přímá

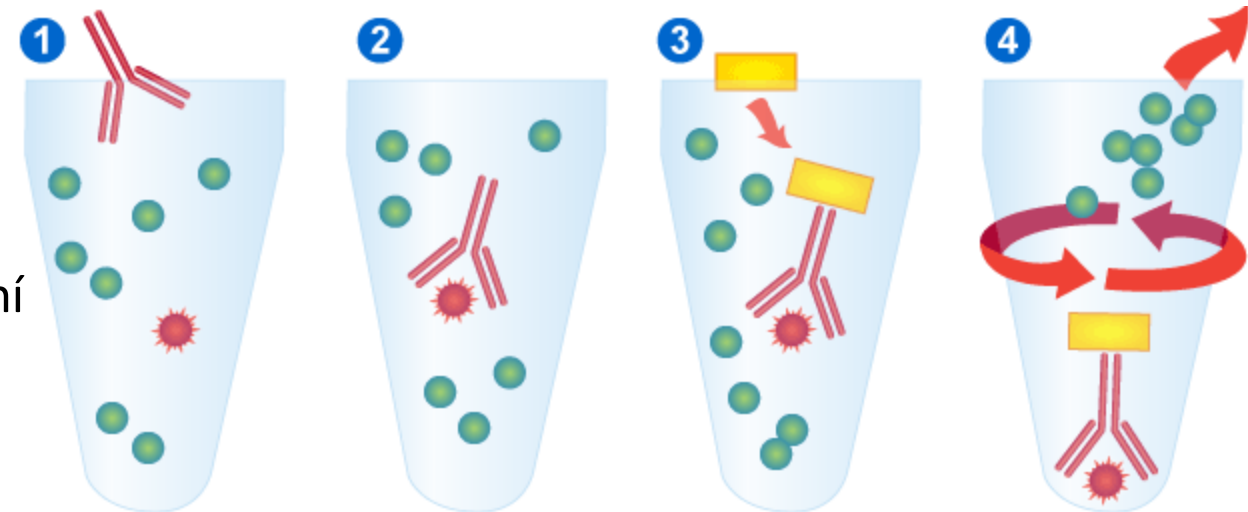
- protilátka je imobilizována na pevném podkladu (např. paramagnetických nebo agarózových/nemagnetických kuličkách), váže antigen a vysráží jej ze směsi

Nepřímá

- protilátka je volně rozpustná, váže antigen ze směsi, následně jsou přidány kuličky pokryté proteinem A nebo G a dojde k vysrážení antigenu

Postup:

- lýze buněk
- inkubace buněčných extraktů s protilátkou
- precipitace
- varem se cílové proteiny oddělí od imunoglobulinů a kuliček
- elektroforéza, western



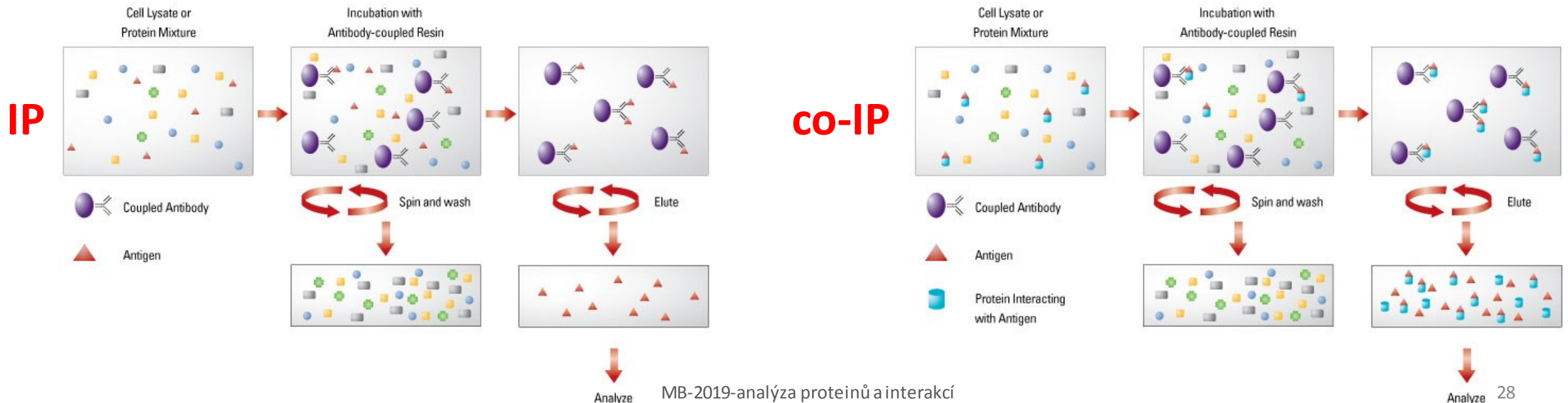
- 1 Suitable antibody is added.
- 2 Antibody binds to protein of interest.
- 3 Protein A or G added to make antibody-protein complexes insoluble.
- 4 Centrifugation of solution pellets antibody-protein complex. Removal of supernatant and washing.

Použití imunoprecipitace pro studium meziproteinových interakcí

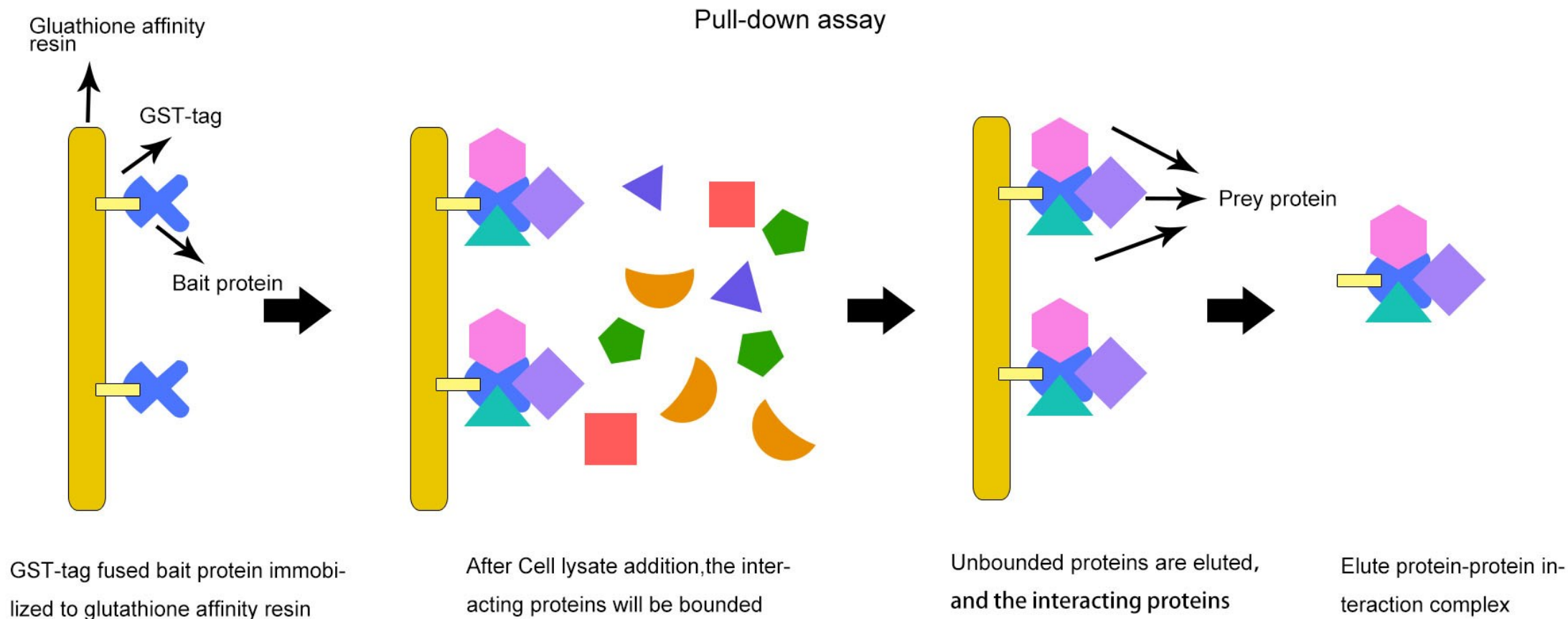
technika kombinující imunoprecipitaci za nativních podmínek a westernový přenos („co-immunoprecipitation“)

Postup:

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



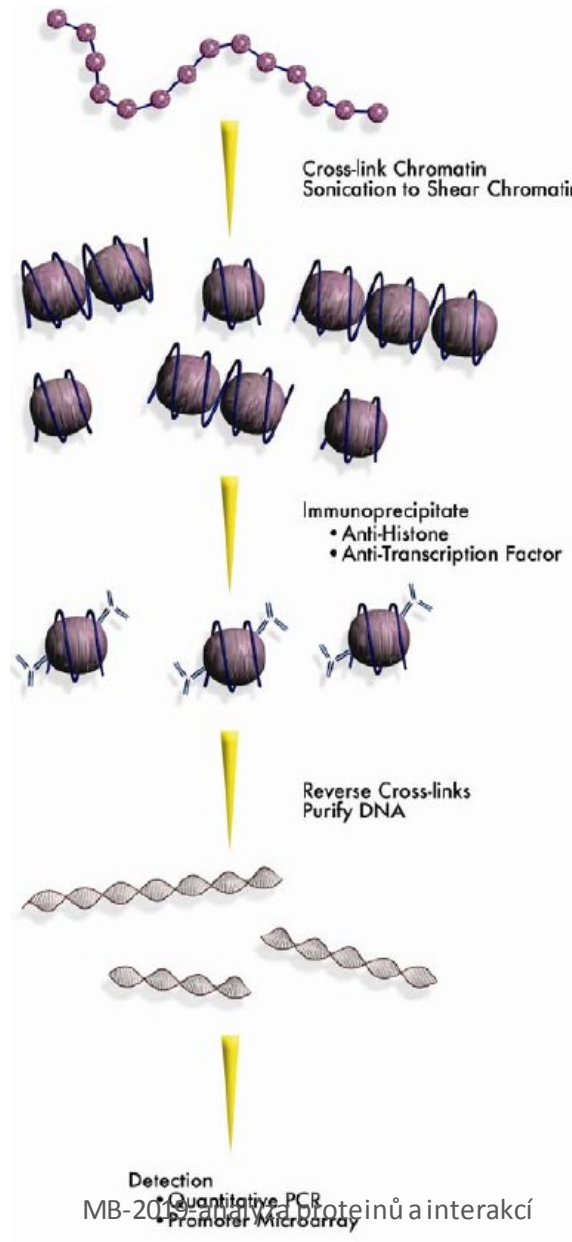
Izolace specifických proteinů (tzv. pull-down assay)



<https://www.youtube.com/watch?v=euHjpUs20YE>

Detekce DNA/RNA vazebných míst

(např. ChIP =
Chromatin Immunoprecipitation)



ChIP

<https://www.youtube.com/watch?v=fQYJnDxZktM>

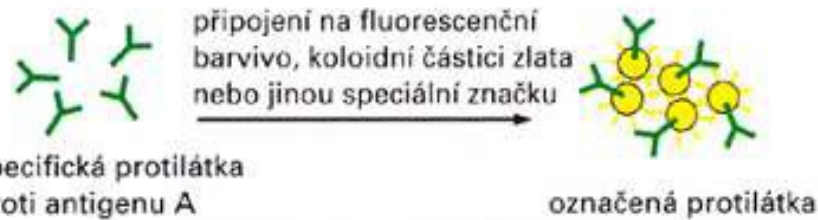
ChIP-seq

https://www.youtube.com/watch?v=7_-Or4ARyH0

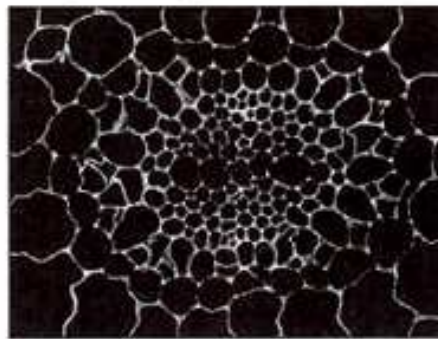
<https://www.youtube.com/watch?v=rInN0DkIF40>

Imunohistochemie

- určuje, ve kterých buňkách je daný protein přítomen (obdoba hybridizace nukleových kyselin *in situ*)
- určuje, ve které části buňky je daný protein přítomen (membránový, cytoplazmatický, jaderný) – lokalizace naznačuje funkci
- buňky se fixují, penetruje se membrána a inkubují se s konkrétní Ab



Mikroskopická detekce



Fluoreskující protilátka váže antigen A ve tkáni a lze ji detegovat ve světelném mikroskopu. Antigenem je tu pektin v rostlinných buňkách.



Zlatem označená protilátka se váže na antigen A ve tkáni a lze ji odhalit v elektronovém mikroskopu. Antigenem je opět pektin ve stěně rostlinné buňky.

