

Izoelektrická fokusace

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

Amfolyty:

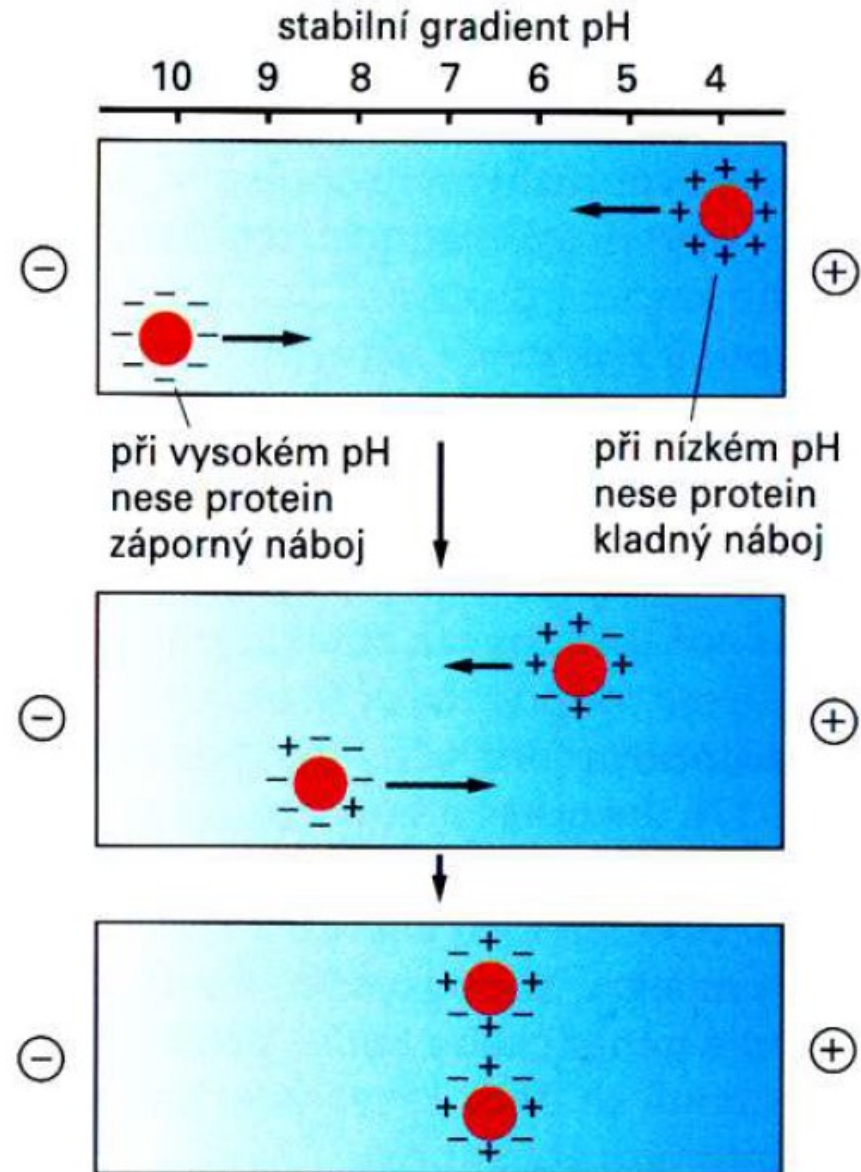
- polymery o nízké molekulové hmotnosti, které mají různé poměry pozitivně nabitých aminoskupin a negativně nabitých karboxylových skupin
- při elektroforéze se amfolyty rovnoměrně rozdělují v gelu podle náboje a tak v něm vytvářejí gradient pH

Princip:

- proteiny se pohybují gelem s velkými póry (nenastává efekt síta) 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
- protein je soustředěn do velmi ostrého proužku
- používá se jako první krok dvourozměrné elektroforézy

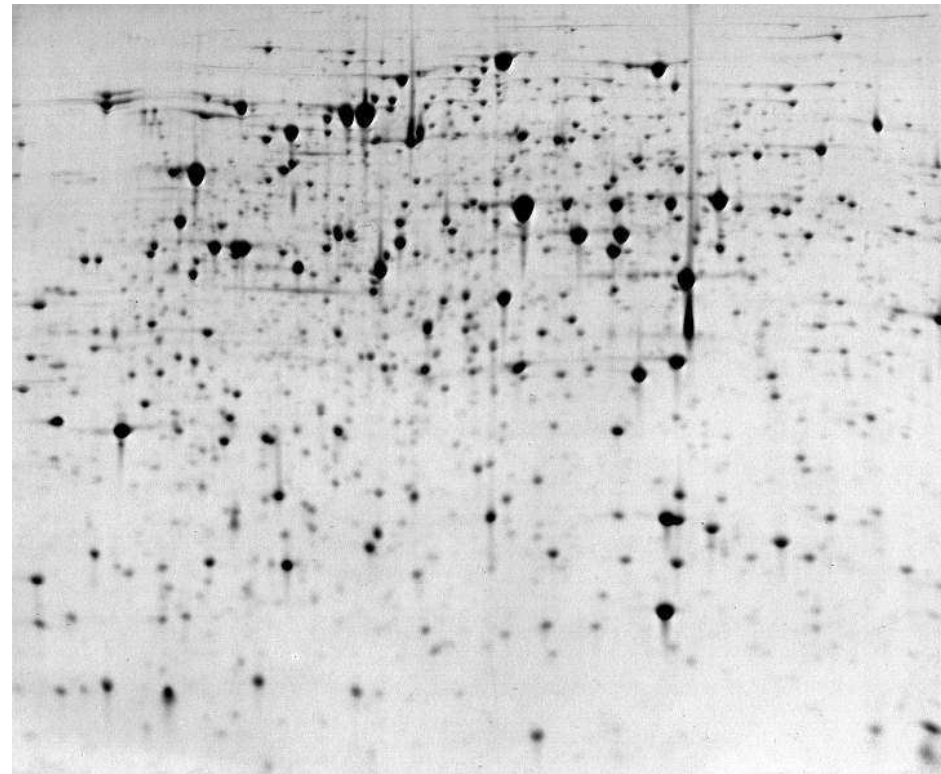
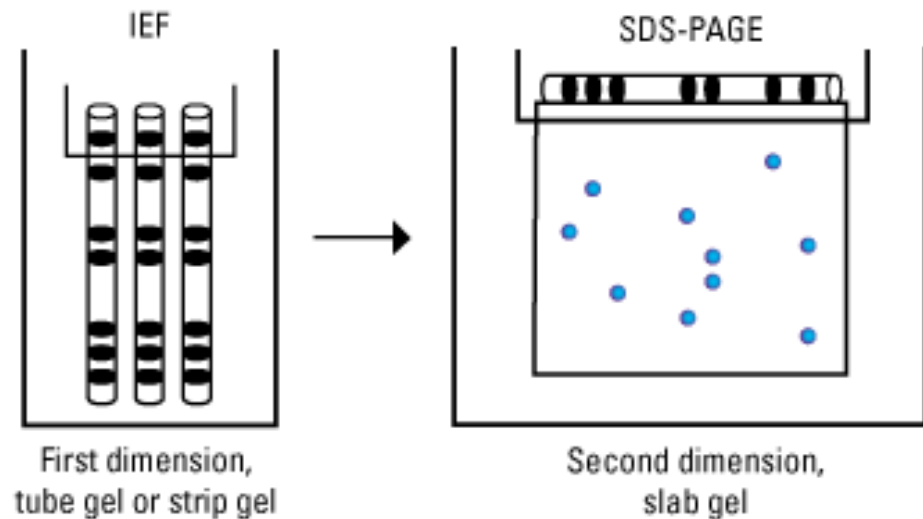
IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

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 isoelektrickému bodu, a tam setrvá.



Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

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

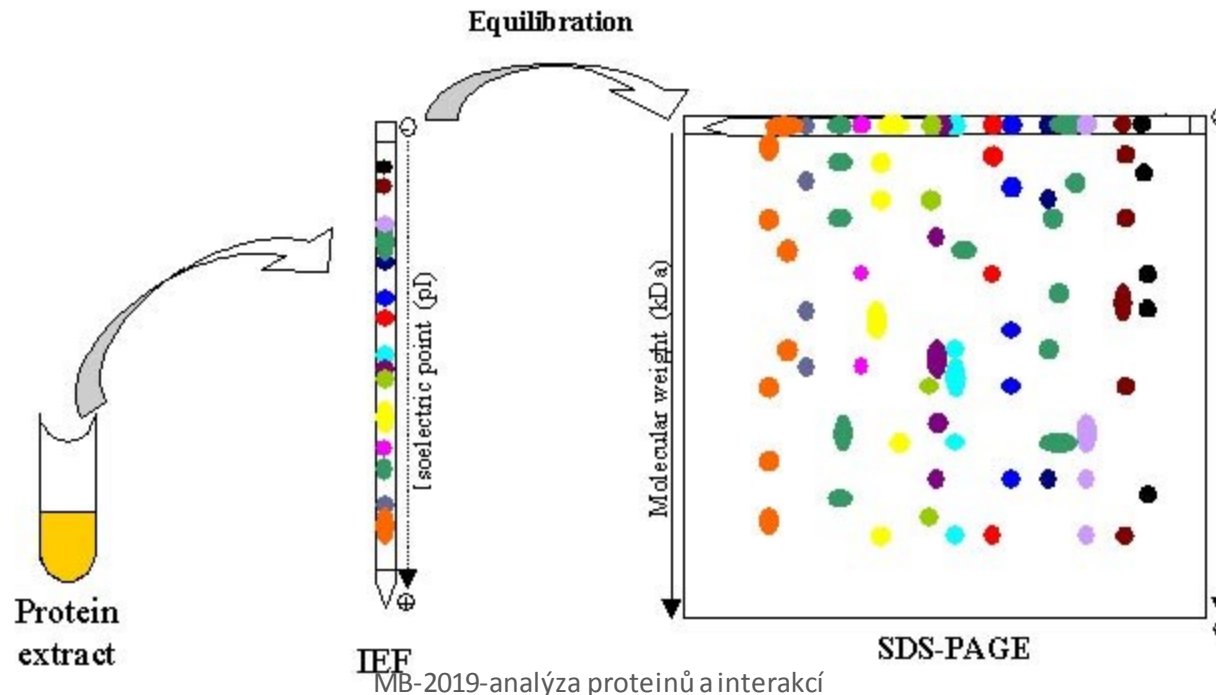


Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

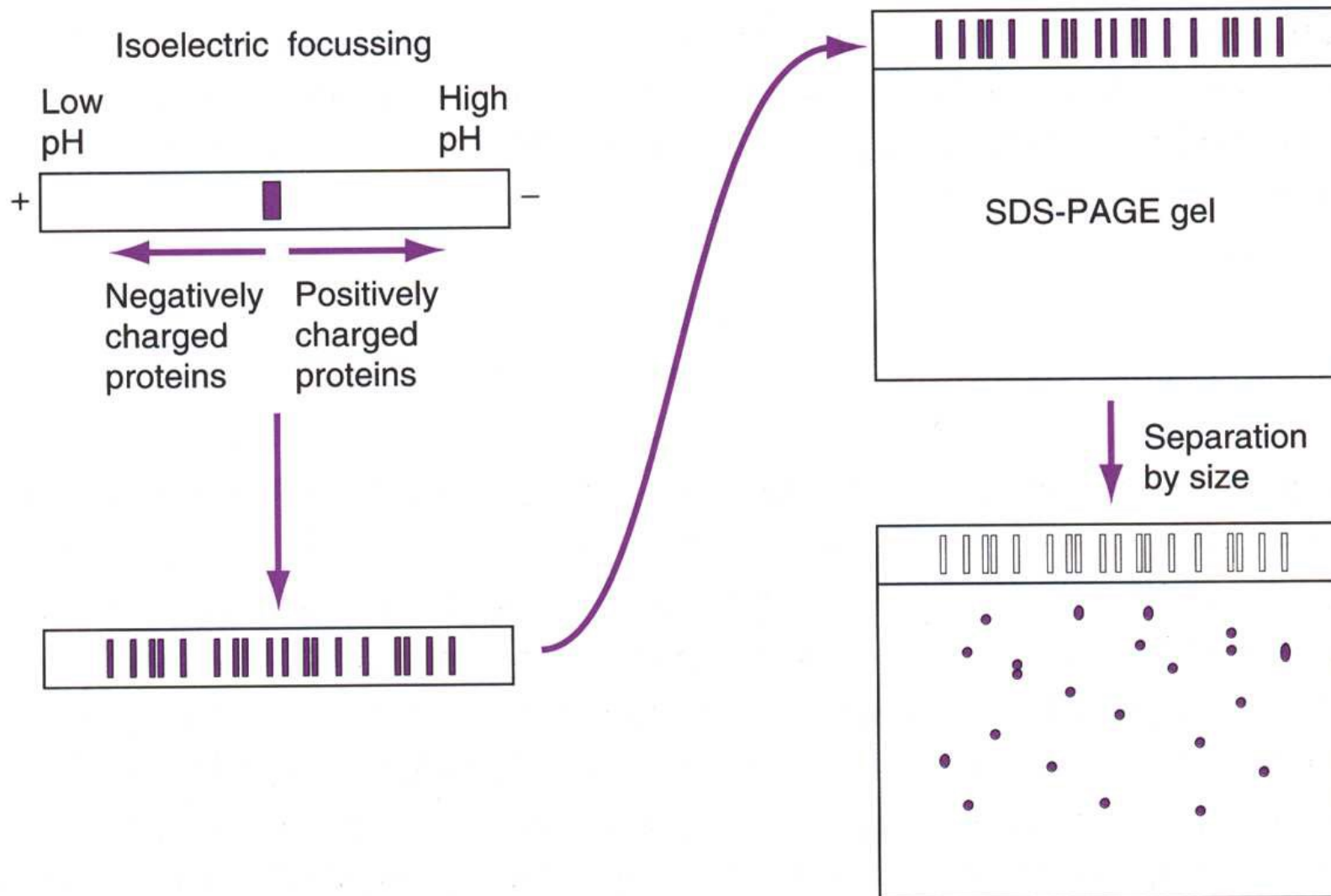
Postup:

- 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



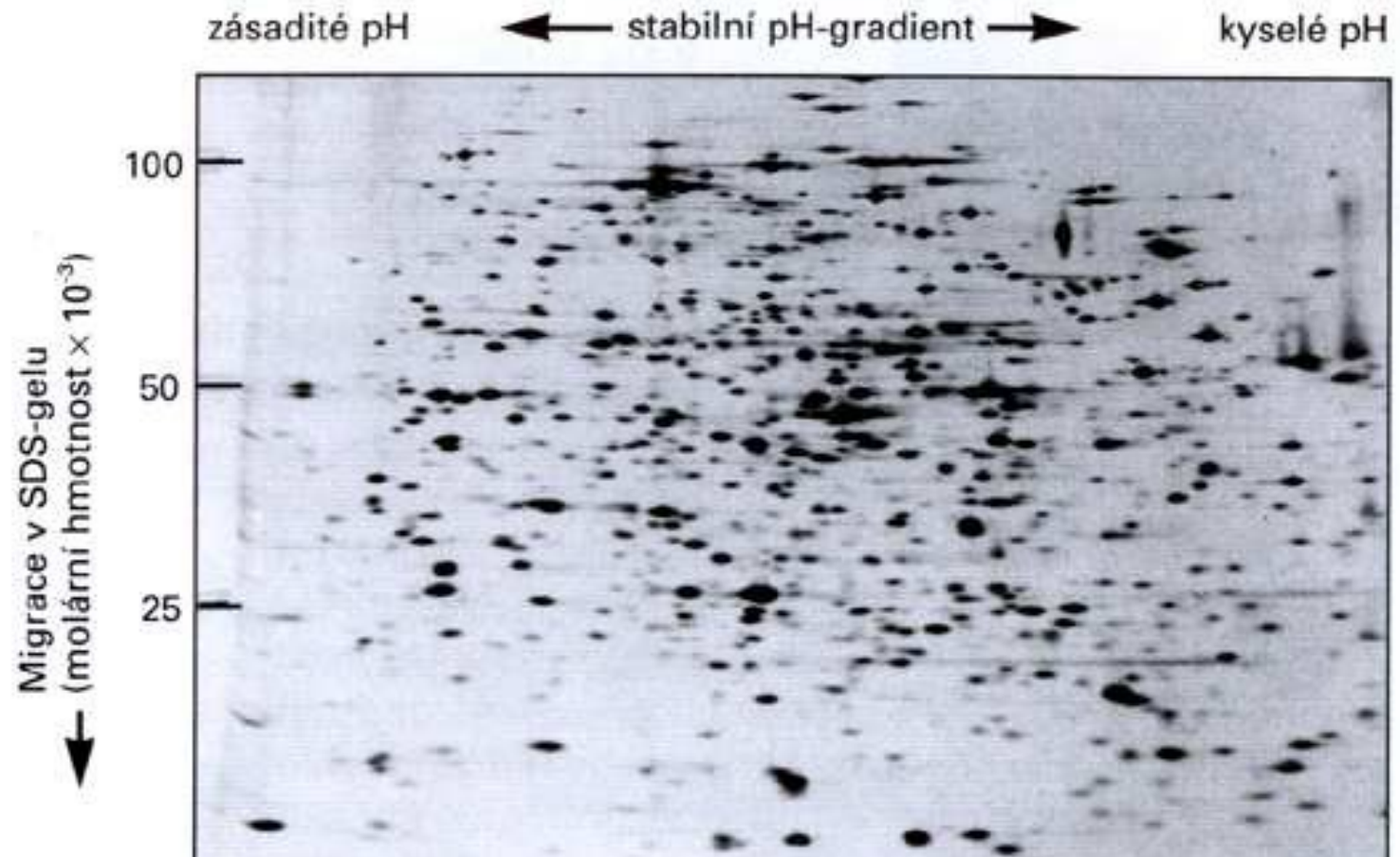
Dvourozměrná elektroforéza proteinů



DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU

<https://www.youtube.com/watch?v=YqFApyvZh0E>

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.



Interpretace 2D-elektroforetogramů

<https://www.youtube.com/watch?v=FHvblg338Gg>

- obtížná
- výsledky nepřehledné
- nutné opakování
- analýza obrazu, software

Hlavní proteomické přístupy

dvourozměrná elektroforéza

definování proteinů rozdělených v gelu:

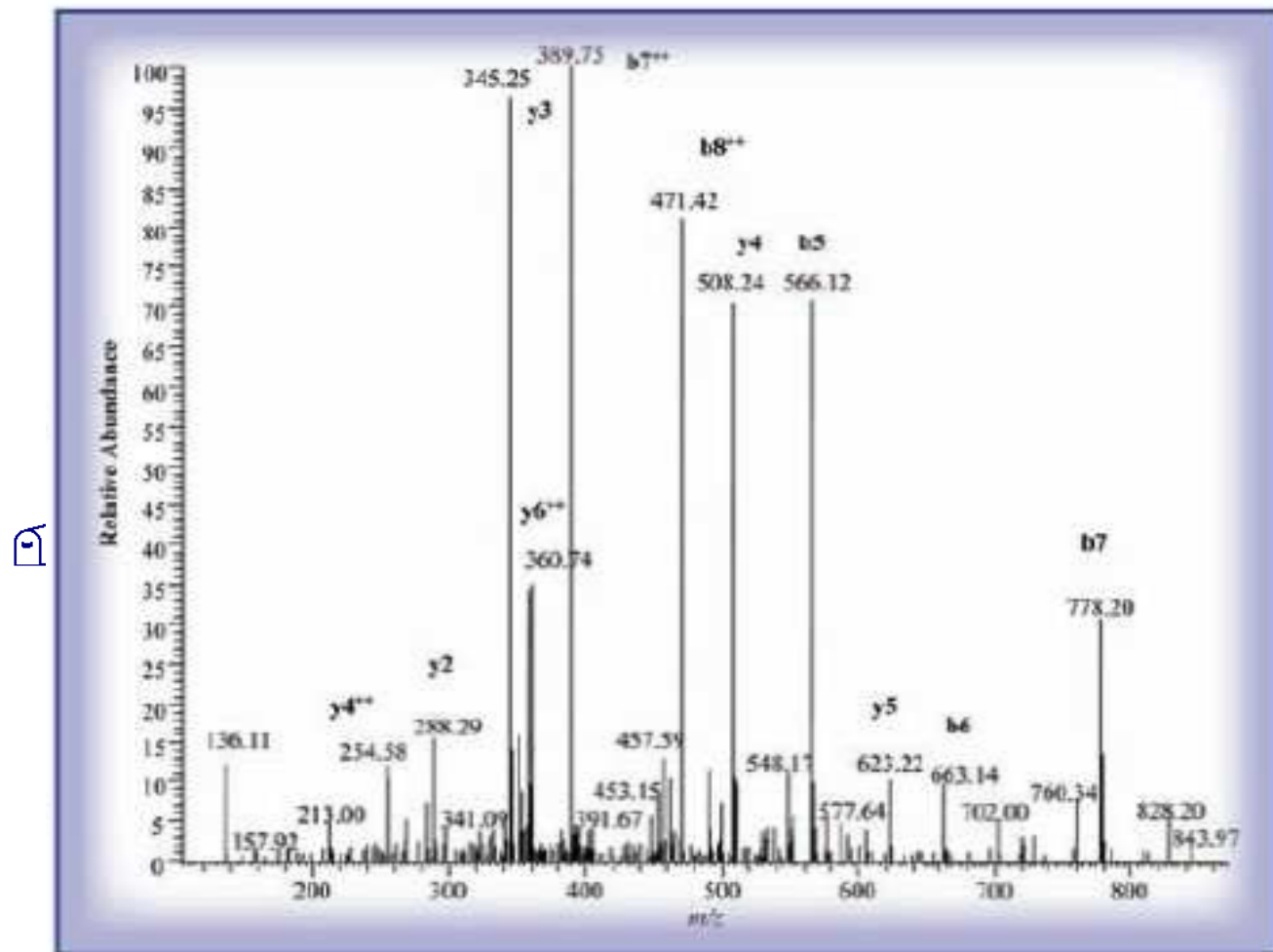
- určení sekvence aminokyselin
- westernový přenos
- štěpení eluovaných proteinů proteolytickým enzymem a stanovení molekulové hmotnosti vzniklých **peptidů hmotnostní spektrometrií, srovnání hmotnostních spekter s databázemi**



Hmotnostní spektrometrie

umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu látek
principem je tvorba pozitivně
či negativně nabitých částic
(iontů), které se rozliší na
základě poměrů jejich
hmotnosti a náboje (m/z) a
poté jsou zaznamenány
detektorem

výsledkem je hmotnostní
spektrum, které graficky
znázorňuje četnost iontů na
hodnotě m/z



Hmotnostní spektrometr

obsahuje

iontový zdroj, ve kterém dochází k ionizaci a převodu vzorku do plynné fáze

hmotnostního analyzátoru, kde probíhá separace iontů na základě poměru m/z

detektoru
vyhodnocovacího zařízení

Základní části hmotnostního spektrometru

1/ iontový zdroj - slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace), konstrukce se liší podle použité ionizační techniky

2/ hmotnostní analyzátor - slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)

3/ detektor - slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle m/z a k určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů

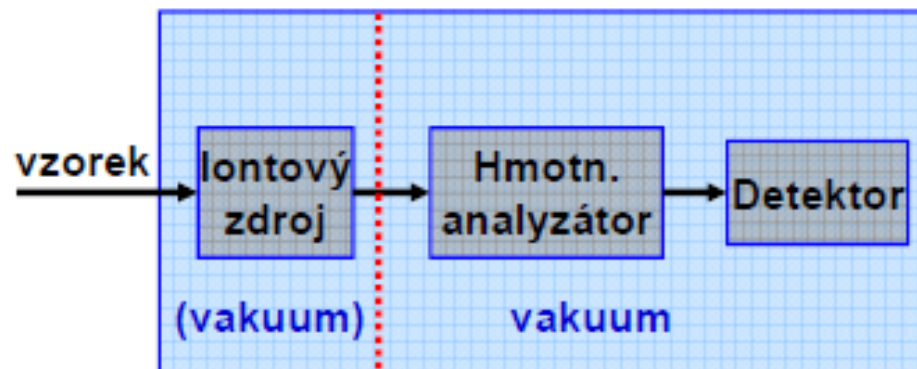
• další důležité části přístroje:

- vakuový systém

- iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů

- počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat, porovnání spekter s knihovnou

Hmotnostní spektrometr



Využití hmotnostní spektrometrie

hlavní výhoda - vysoký stupeň analytické spolehlivosti

- využití základní výzkum/medicína

- diagnostika identifikace metabolických onemocnění (analýza obsahu metabolitů a malých molekul v moči a krvi)
- identifikace alergenů v potravě
- identifikace infekčních agens (např. bakteriálních ribozomových
- proteinů)
- analýza bioaktivních peptidů a malých regulačních molekul (např.
- hormonů)
- analýza toxických látek (pesticidů, bakteriálních toxinů, kontaminantů)
- léčiv a drog v biologických tekutinách, potravinách a životním prostředí
- expresní profilování

<https://www.youtube.com/watch?v=mBT73Pesiog>

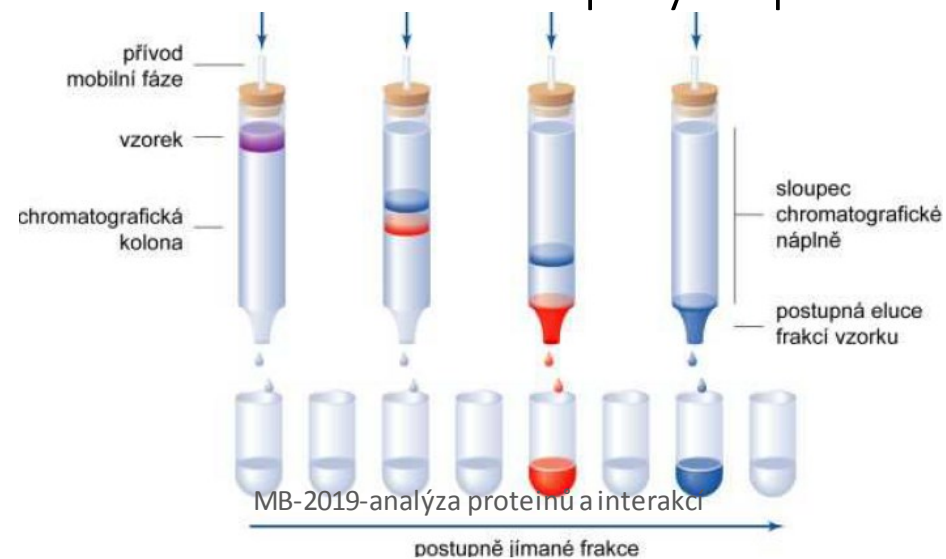
Chromatografie

- cílem je separace sledovaného analytu od dalších látek ve vzorku, tak aby mohl být následně jednoznačně identifikován a kvantifikován
- široké použití, např. základní výzkum, stanovení léčiv a drog v tělesných tekutinách, atd.
- princip: interakce složek směsi se dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi – pohyblivou (mobilní fází) a nepohyblivou (stacionární fází)
- vzorek se po nanesení pohybuje společně s mobilní fází a jeho složky v různé míře interagují s oběma fázemi
- látky, které se stacionární fází interagují silněji, jsou více zadržované (retence) a v koloně setrvávají déle
- retenční čas (doba pro výstup z kolony) je jedním ze sledovaných
- Parametrů

Sloupcová chromatografie

Postup:

- směs proteinů v roztoku prochází válcovou kolonou naplněnou propustnou pevnou matricí ponořenou do rozpouštědla
- kolona se promývá
- různé proteiny mají různou míru afinity k náplni 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

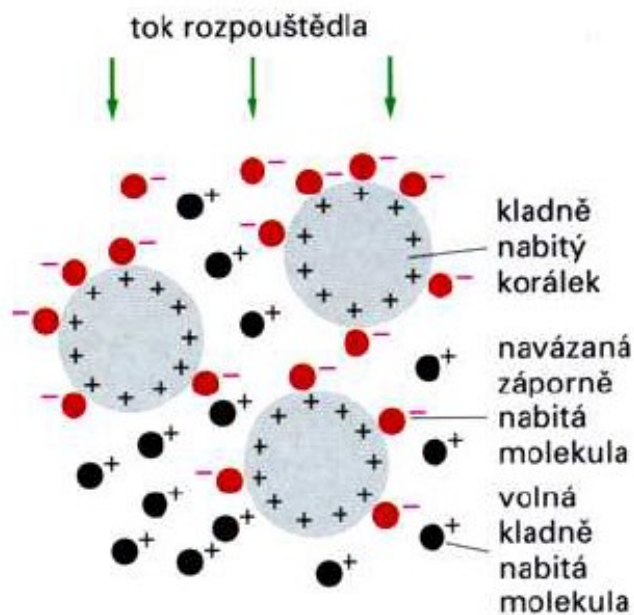


Tři druhy sloupcové chromatografie

iontoměničová: podle náboje, vazba mezi proteinem a náplní kolony závisí na pH a iontové síle roztoku

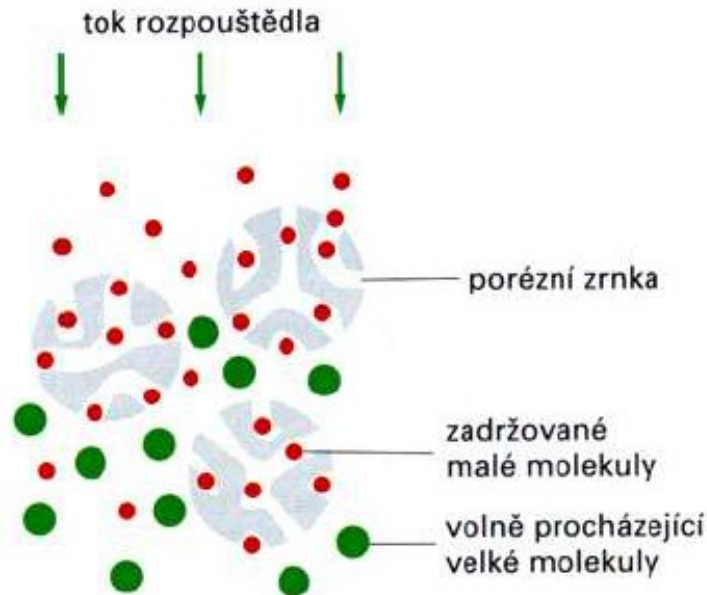
gelová: podle velikosti proteinů

afinitní: náplň je opatřena molekulami, které specificky interagují s cílovým proteinem (např. protilátka/antigen, enzym/substrát)



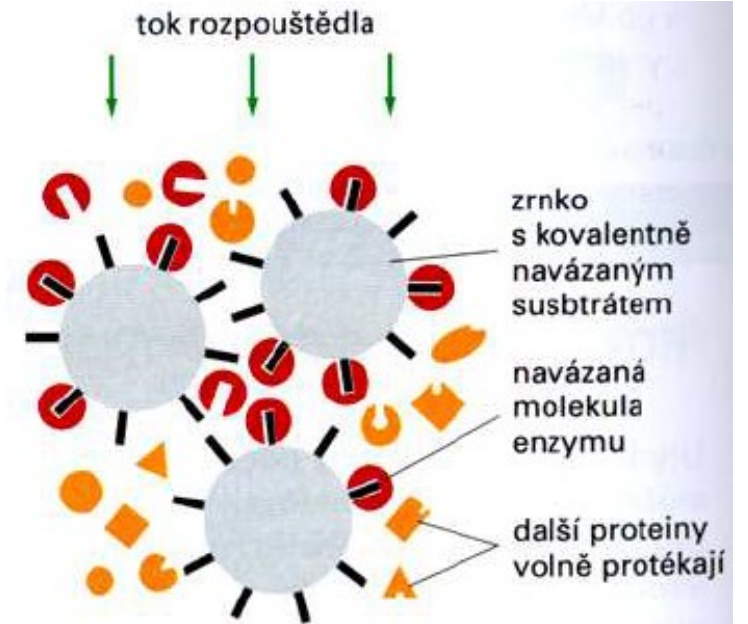
(A) IONTOMĚNIČOVÁ CHROMATOGRRAFIE

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.

<https://www.youtube.com/watch?v=L-xIHihOGKs>

Chromatografie usnadňuje purifikaci značených proteinů

- „polyhistidinový tag“: aminokyselinový motiv složený z alespoň 6 zbytků histidinu, připojený obvykle na N- nebo C-konec proteinů
- nukleotidové sekvence kódující His-tag se technikou rekombinantní DNA připojují k sekvenci genu, jehož produkt má být purifikován
- rekombinantní konstrukt se přenesse do E. coli nebo jiného expresního systému
- sklizení a lýze bakteriálních buněk
- nanesení buněčného extraktu na kolony s náplní obsahující dvojmocné ionty niklu nebo kobaltu, které vážou polyhistidinové značky s vysokou afinitou
- po promytí kolony a eluci lze v jednom kroku purifikovat
- protein a relativně vysoké čistotě

Možnosti zapojení histidinové značky

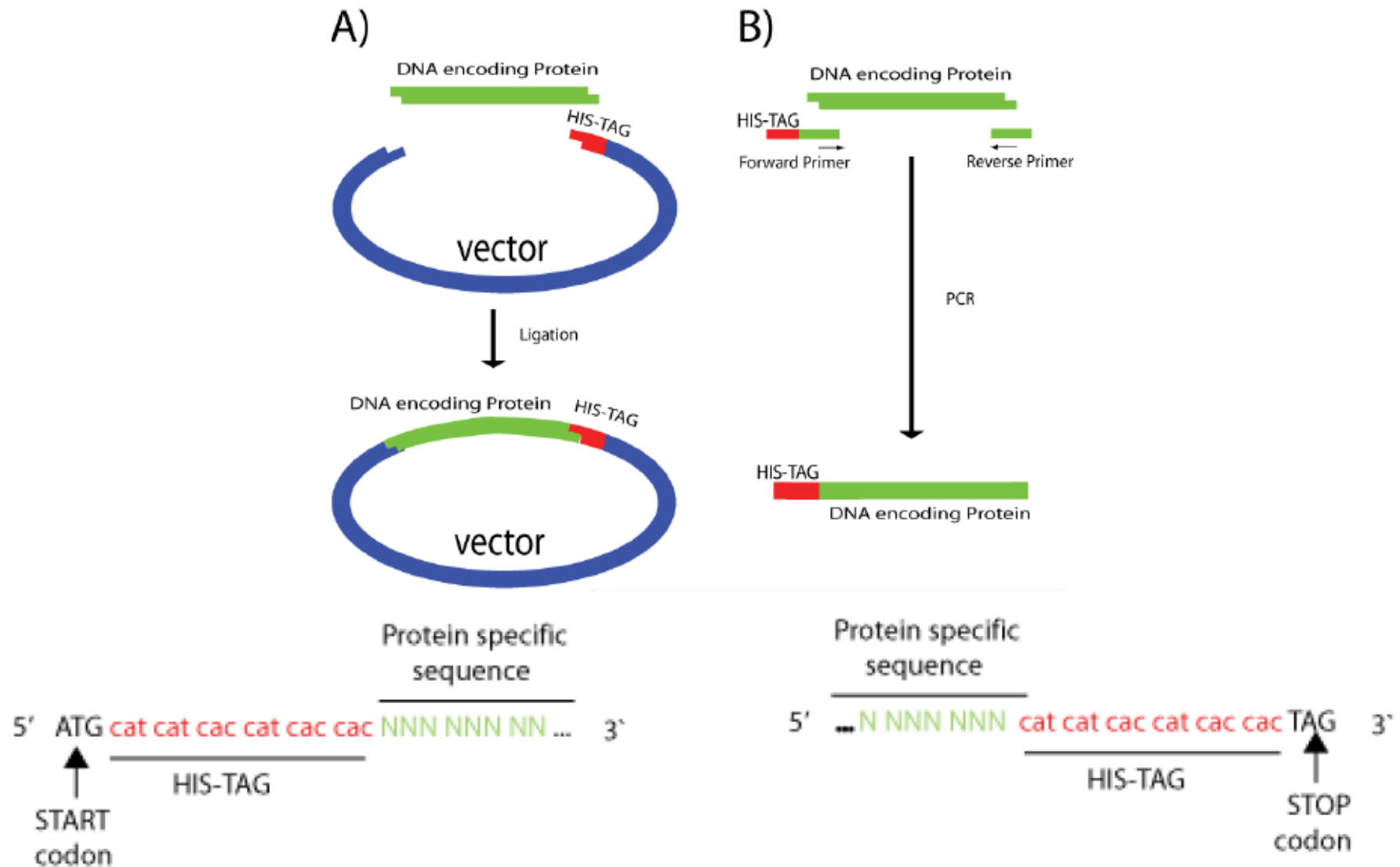
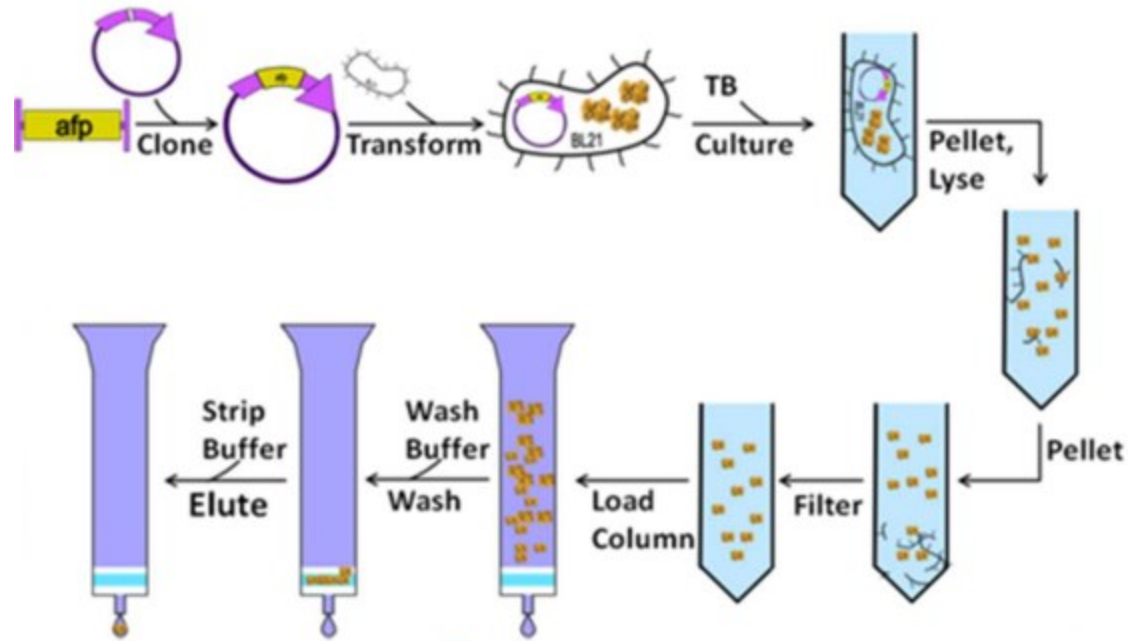
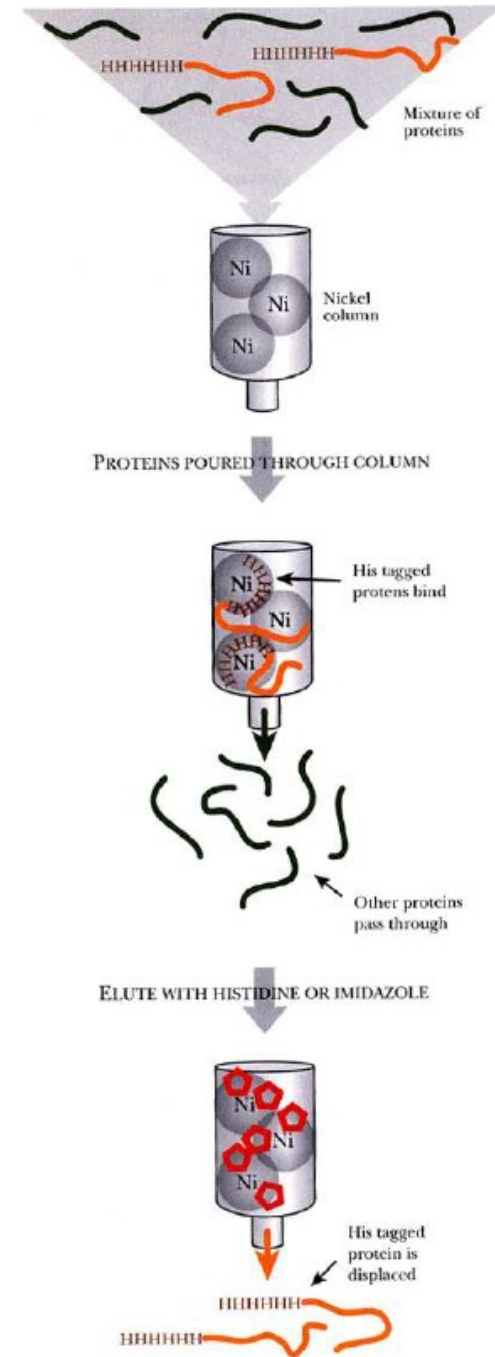


Schéma a výsledek purifikačního postupu



MB-2019-analýza proteinů a interakcí



- <https://www.youtube.com/watch?v=ZN7euA1fS4Y>

Metody analýzy proteomu

- určuje úplný profil všech proteinů, které daný organismus (buňka) vytváří za definovaných podmínek
- na rozdíl od genomu, který se neliší v buňkách téhož organismu, je proteom (podobně jako transkriptom) proměnlivý podle vnějších a vnitřních faktorů

Hlavní proteomické přístupy

- dvourozměrná elektroforéza
- definování proteinů rozdělených v gelu:
 - určení sekvence aminokyselin
 - westernový přenos
 - štěpení eluovaných proteinů proteolytickým enzymem a stanovení molekulové hmotnosti vzniklých peptidů hmotnostní spektrometrií, srovnání hmotnostních spekter s databázemi



Průtoková cytometrie

bioanalytická metoda založená na interakcích mezi světlem a fluorochromy, která kombinuje jevy rozptylu a odrazu světla s detekcí fotonů emitovaných aktivovaným fluorochromem



Průtoková cytometrie

- Hlavní výhoda: Umožňuje studium vlastností **individuálních buněk v buněčné populaci**
- Co dokáže?
 - např.
 - zhodnotit míru emitované fluorescence, která koreluje s mírou přítomnosti sledovaného znaku
 - frakcionovat buňky podle určitých vlastností, které korelují s mírou fluorescence
 - rozlišit živé buňky od mrtvých
 - vyhodnotit více než 100 buněk za 1 minutu

Průtoková cytometrie – aplikace

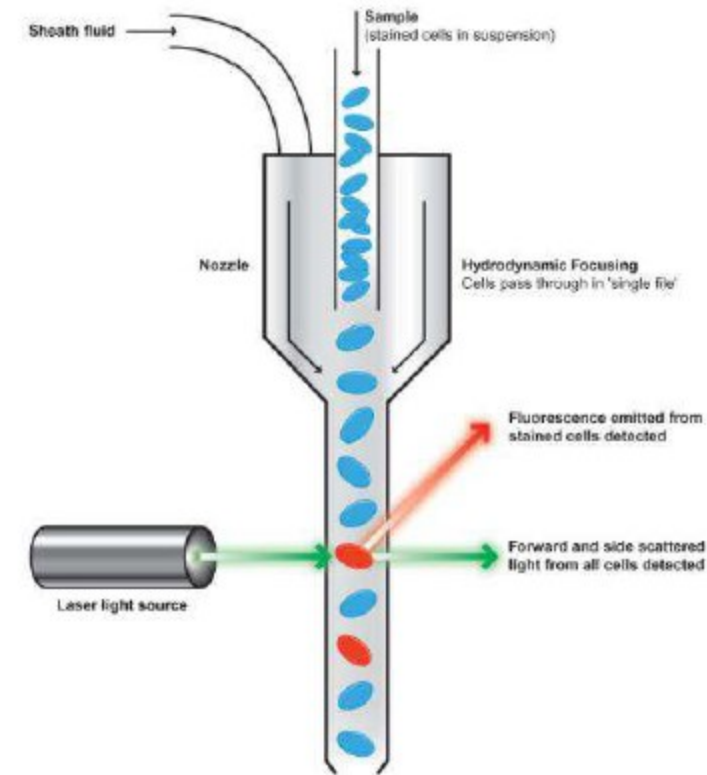
- míra přítomnosti určitých antigenů (např. sledování diferenciací buněk)
- míra přítomnosti DNA (např. sledování buněčného cyklu, apoptózy)
- velikost buněk, přítomnost granulí v cytoplazmě (determinace buněčných typů ve směsích buněk)
- možno využít k frakcionaci buněk dle určitých vlastností (FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorter)

Průtoková cytometrie

- **Princip:** Počítačové zpracování míry fluorescence jednotlivých buněk
- **Předpoklad:** Míra fluorescence odpovídá sledovanému parametru (antigen, DNA...)
- **Pojmy:**
 - „Flow cytometry“ - měření určité vlastnosti buněk v průběhu jejich toku přístrojem
 - „Flow sorting“ (Fluorescence-activated cell sorting FACS) oddělování buněk podle jejich vlastností zjištěných v průběhu průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie – principy

- koncentrovaná suspenze buněk je opatřena **fluorescenční značkou** specifickou pro cílovou molekulu (pro DNA - propidium jodid, pro protein - fluoreskující protilátka)
- buněčná suspenze je rozdělena na malé kapičky (každá z nich obsahuje jednu buňku)
- jednotlivé kapičky jsou ozářeny **laserovým paprskem** – dojde k ohybu a rozptylu světla a zároveň k excitaci fluorochromu a **emisi fluorescence**
- měření míry fluorescence pro každou buňku (určuje míru přítomnosti cílové molekuly)
- měření míry ohybu a rozptylu světla pro každou buňku (určuje míru granulace cytoplazmy, velikost a tvar buňky)
- data jsou uložena ve formě datového souboru (lze je opakovaně analyzovat a kombinovat („gatování“))



Průtokový cytometr – technické složky

- optický systém: zdroj záření (různé typy laserů, UV lampa)
- systém fluidiky: pro transport analyzovaných částic do měřicí komory
- výpočetní systém: analýza a archivace naměřených hodnot
- sortovací modul (oddělení cílové populace z analyzovaného vzorku na základě prováděných měření v reálném čase)

Průtokový cytometr – optický systém

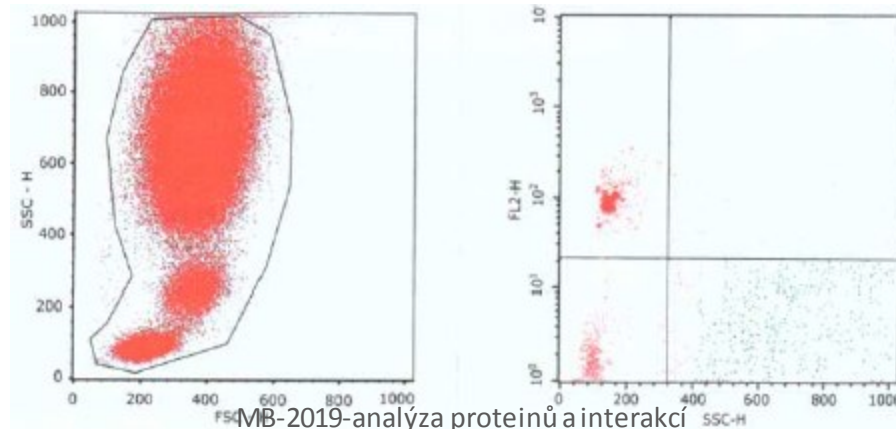
- excitační optiku tvoří zdroj světla a optické členy, které transportují a zaostřují paprsek do bodu měření
- obvykle laser, nejčastěji vzduchem chlazený argonový laser, který vyzařuje světlo o vlnové délce 488 nm (výhoda: umožňuje excitaci několika důležitých fluorochromů současně)
- může být více laserů, jejichž kombinace umožňuje excitovat více fluorochromů a tak sledovat více parametrů současně

Průtokový cytometr – detekce a zpracování signálu

- současné vyhodnocení interakce záření s fluorescenční značkou navázanou na protilátku a ohyb, odraz a absorpce světla (tzv. „light scatter“)
- spojení imunochemického principu s fluorescenčním značením umožňuje přesně definovat příslušný antigen
- jevy sledované pomocí „light scatter“ závisejí na fyzikálních parametrech částice (buňky) – velikosti, vnitřní komplexitě a hustotě obsahu (parametry jádra, membránových organel a granulí)
- 2 typy „light scatter“ – „forward scatter“ (FSC) a „side scatter“ (SSC)

„Forward scatter“ a „Side scatter“

- FSC – měření v rovině procházejícího světla, odpovídá povrchu analyzované částice
- SSC – měření interference světla s hustými strukturami uvnitř buňky (ohyb a odraz světelného paprsku)
- sloučením hodnot FSC a SSC do histogramu (osa x = FSC, osa y = SSC) lze získat dvojrozměrné uspořádání analyzovaných částic dle jejich velikosti a hustoty vnitřního obsahu



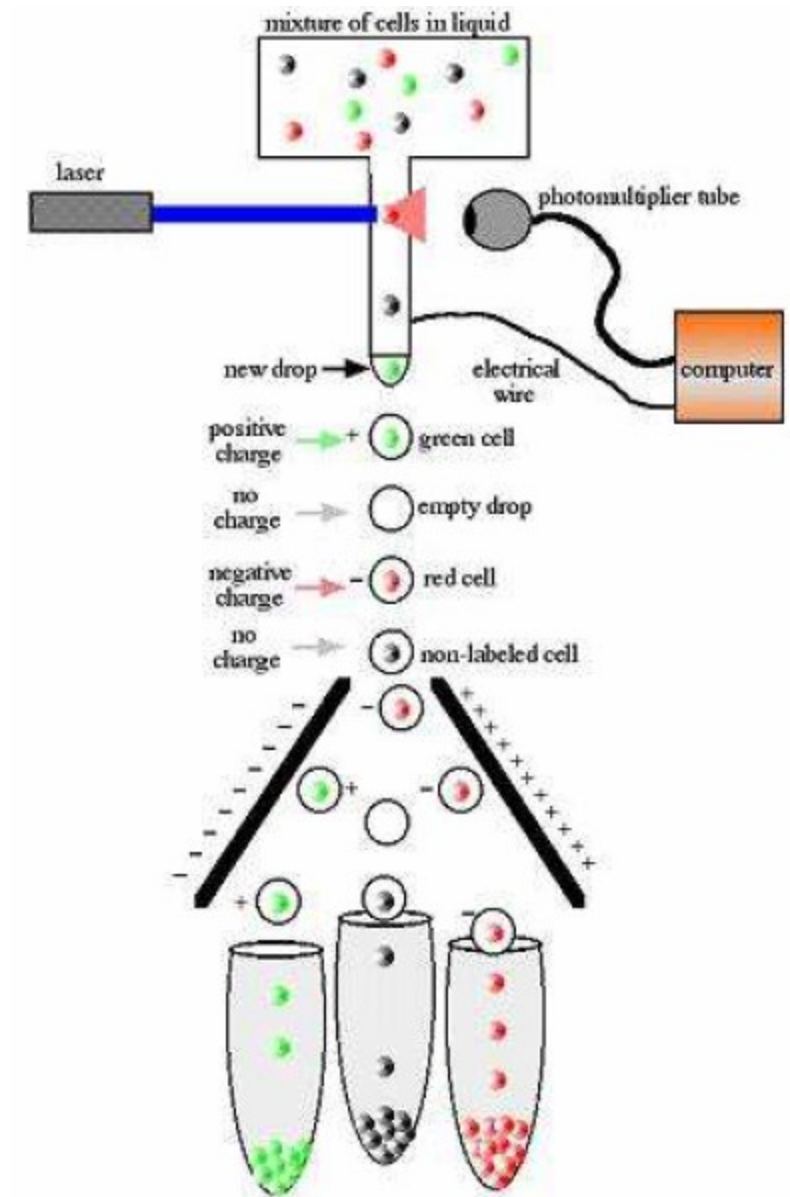
Frakcionace buněk - FACS

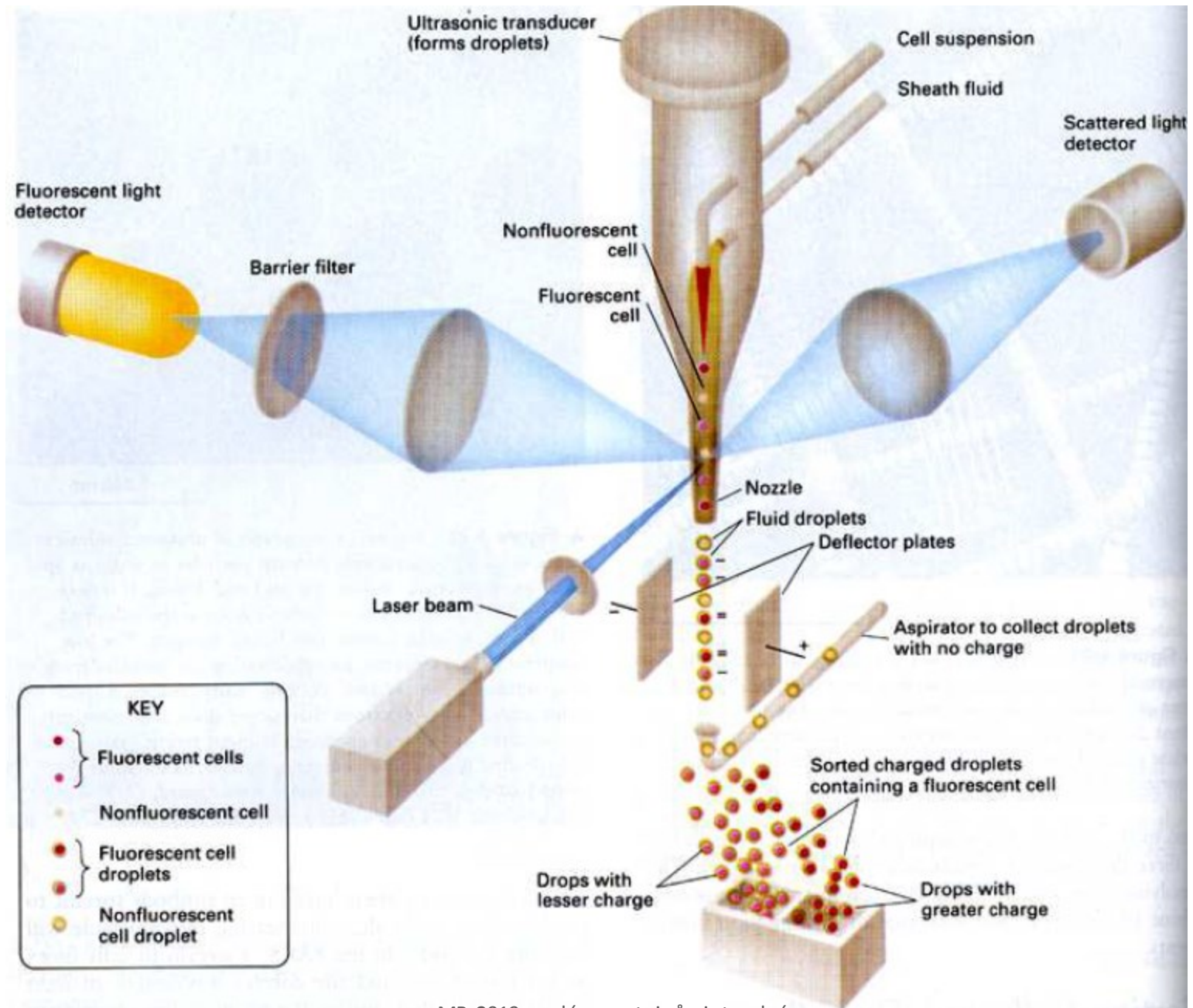
- **Princip:**

- podle míry fluorescence je každé kapičce s jednotlivou buňkou udělen proporcionální elektrický náboj
- kapičky procházejí prostorem mezi dvěma elektrodami a dochází k jejich frakcionaci podle náboje

- **Výhoda**

- buňky nejsou průtokovou cytometrií poškozeny - udržují si životaschopnost
- buňky nejsou kontaminovány - lze je dále kultivovat





Biomedicínské aplikace průtokové cytometrie

- široké – významné postavení v imunologických a onkologických oborech (často diagnostický standard)
- nejlepší uplatnění u tekutých tkání (krev, kostní dřeň, mozkomíšní mok, bronchoalveolární laváž) méně u pevných tkání (lymfatických uzlin, solidních nádorů)

Hematoonkologie

- imunofenotypizace buněk (kvalitativní a kvantitativní stanovení přítomnosti specifických buněčných markerů (na povrchu, cytoplazmě i v jádře):
klasifikace onemocnění, odlišení nádorových buněk od zdravých, určení prognózy, stanovení minimální residuální nemoci, atd.)

Imunologie

- sledování aktivity subpopulací lymfocytů (produkce cytokinů, fagocytóza, oxidační vzplanutí)

Další aplikace průtokové cytometrie

- analýza buněčného cyklu
- vyšetření a sortování chromozomů
- studium apoptózy (mitochondriální membránové potenciály, aktivace apoptotických drah, degradace DNA)
- vyšetření viability spermií
- analýze exprese a fosforylace proteinů

Využití průtokové cytometrie pro analýzu buněčného cyklu

- **Princip:**

měření obsahu DNA jednotlivých buněk, který se v průběhu cyklu periodicky mění

- **Postup:**

- obarvení DNA fluorescenčním barvivem - propidium jodidem
- měření míry fluorescence emitované jednotlivými buňkami
- počítačové zpracování dat a grafické vyhodnocení

