

Přístupy k analýze buněčných proteinů

Metody pro studium buněčných proteinů

Stanovení fyzické přítomnosti buněčných proteinů:

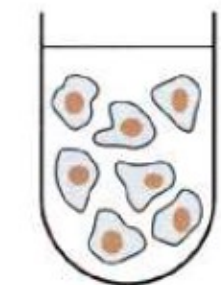
- polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)
- westernový přenos
- ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay)
- imunoprecipitace
- imunohistochemie
- izoelektrická fokusace
- dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

ROZBÍJENÍ BUNĚK A TKÁNÍ

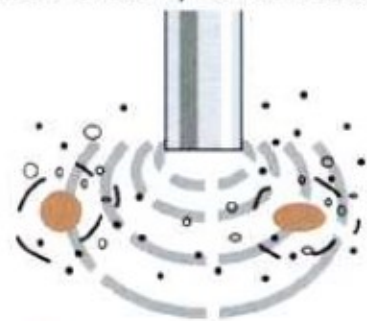
Prvním krokem purifikace většiny proteinů je rozbití buněk nebo tkáně

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.



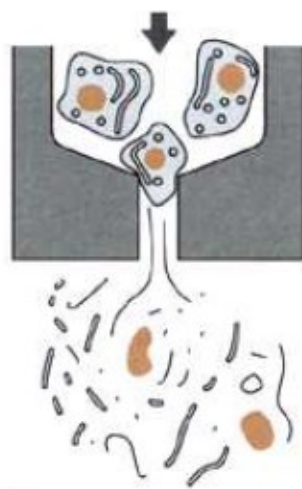
suspenze buněk nebo tkáň



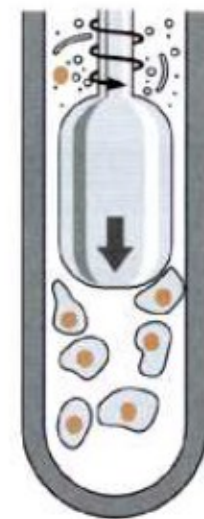
1 rozbití buněk ultrazvukem



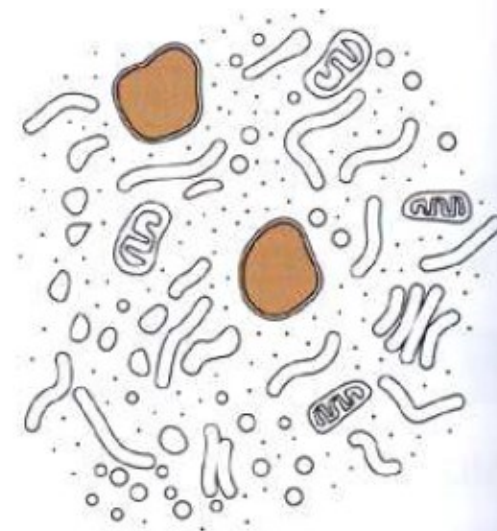
2 použití mírného detergentu na perforaci plasmatické membrány



3 protlačení buněk malým otvorem



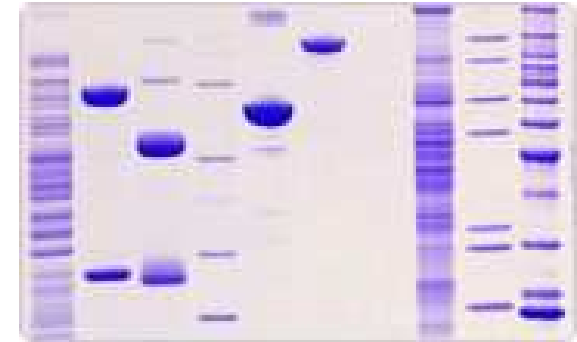
4 rozbití buněk dobře těsnícím rotačním píštěm v tlustostěnné nádobce



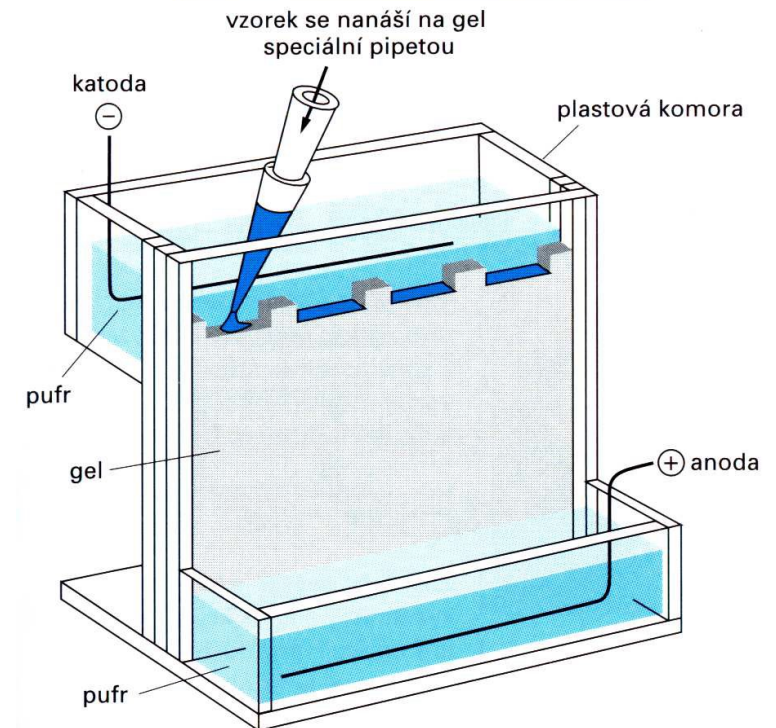
Při opatrné práci lze získat téměř všechny organely v neporušeném stavu.

Elektroforetické techniky

- založeny na schopnosti pohybu elektricky nabitých molekul v elektrickém poli
- proteiny se obvykle rozdělují vertikální **polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (PAGE)**
- polymerovaný gel se vloží mezi dvě nádoby naplněné pufrům, do kterých se ponoří elektrody
- u deskové varianty se vzorky nanesou do jamek na horní straně gelu
- používají se alkalické pufrы, které proteinům udělají **negativní náboj** - v elektrickém poli se pohybují směrem k anodě



GELOVÁ ELEKTROFORÉZA



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 běžně zaujímají různé tvary a disponují různými náboji (na rozdíl od molekul DNA, které jsou uniformní z hlediska tvaru a rozdělení náboje)
- interpretace elektroforetogramu v nativní podobě je obtížná
- pro separaci proteinů se běžně používá **denaturační** varianta PAGE zvaná **SDS-PAGE**:
- proteiny se rozpouštějí v roztoku obsahujícím negativně nabitou molekulu **SDS**
- disulfidové vazby v proteinech se eliminují redukčním činidlem (**β -merkaptoetanolem**)
- Příprava vzorků proteinů je dokončena **varem**

SDS-PAGE

Ulrich K. Laemmli
University of Geneva

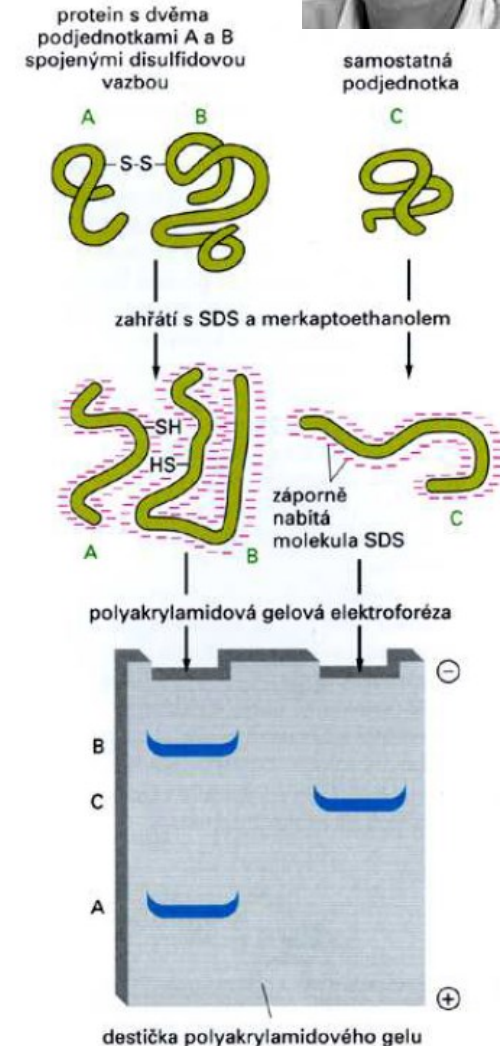
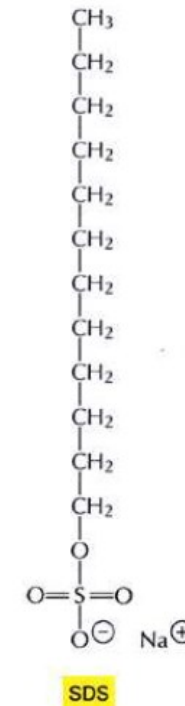


Negativní náboj SDS a jeho vazba k proteinům způsobí:

- **zamaskování vlastního náboje** proteinu
- **natažení proteinu** (denaturaci) a eliminuje tak vliv tvaru proteinu na pohyblivost (díky elektrostatickému odpuzování molekul SDS)
- 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).

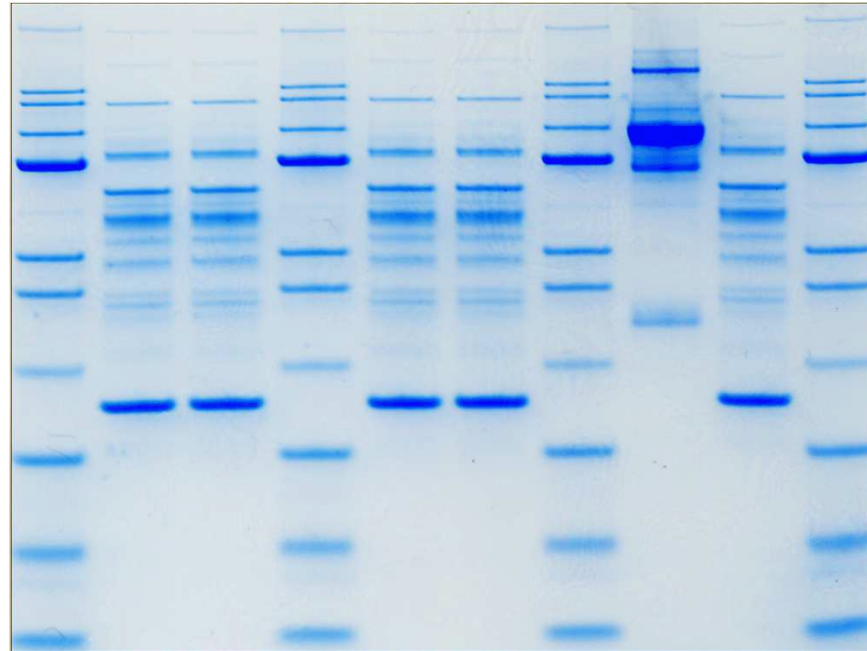
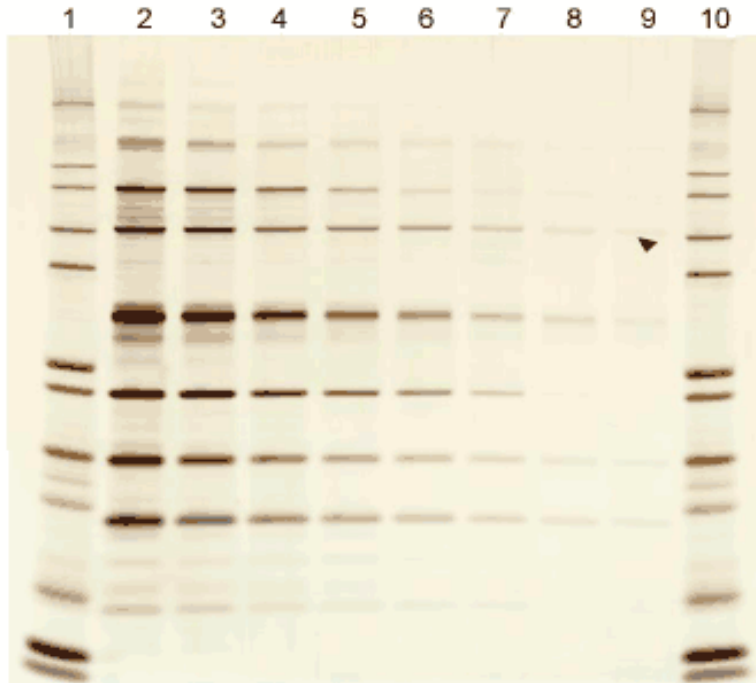
Proteiny se při SDS-PAGE separují pouze podle jediné vlastnosti: **molekulové hmotnosti**.

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



Zviditelnění proteinů separovaných PAGE

- **nespecificky:** obarvení všech proteinů v gelu proteinovými barvivy
- stříbrem, „coomassie brilliant blue“

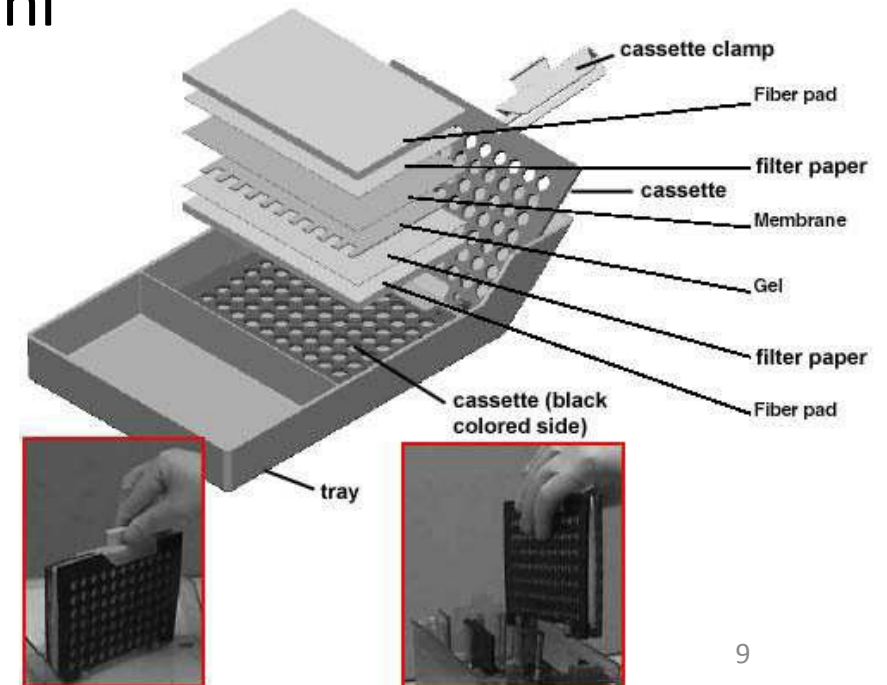
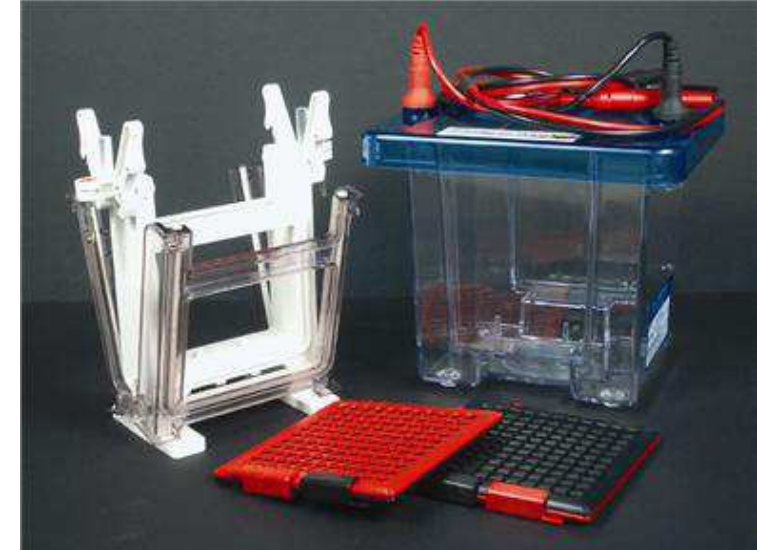


Zviditelnění proteinů separovaných PAGE

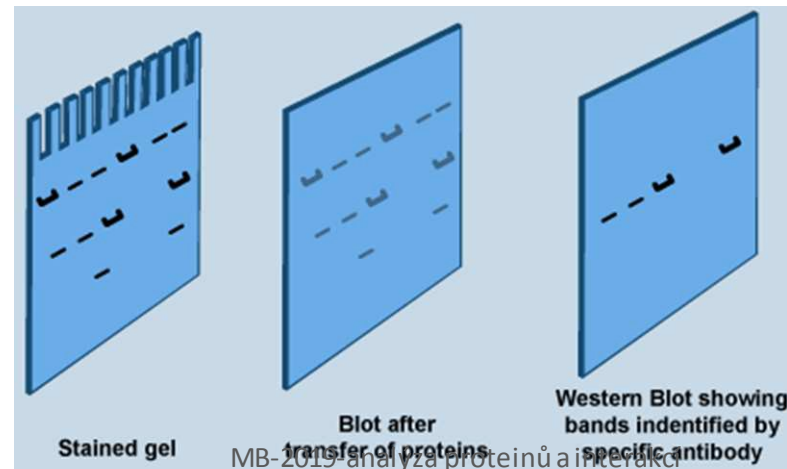
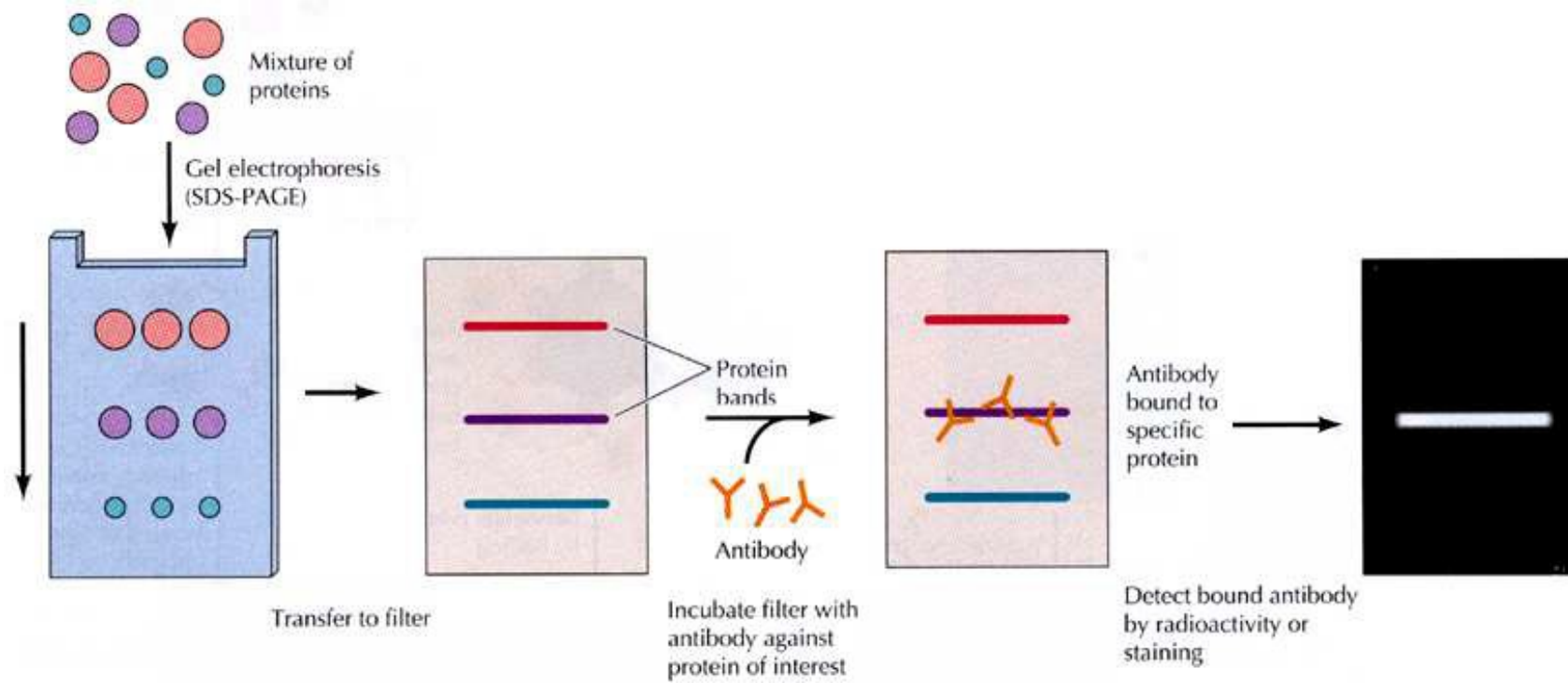
specificky:

- **westernový přenos** (=„immunoblotting“), tj. detekce proteinů rozdělených elektroforézou protilátkami
- přenos rozdělených proteinů z gelu na pevný filtr
- navázání protilátky na příslušný antigen při promývání filtru roztokem specifické primární protilátky (protilátka musí rozeznat lineární epitop – protein je obvykle denaturován)
- zviditelnění protilátky na filtru např.

radioaktivní sondou nebo sekundární protilátkou konjugovanou s určitým enzymem

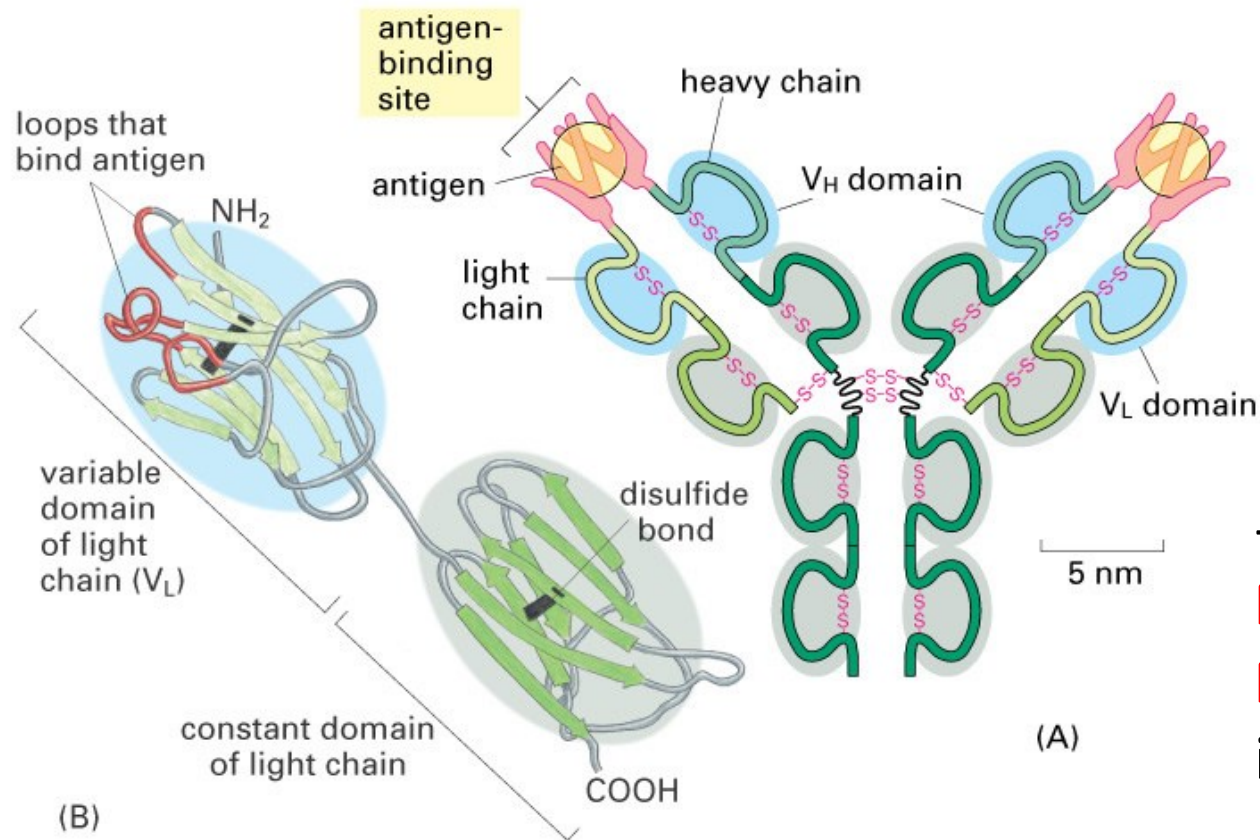


Zviditelnění proteinů westernovým přenosem



Základem jsou protilátky (Ab)

- konkrétní epitopy proteinů se detekují pomocí specifických protilátek, které slouží jako sondy

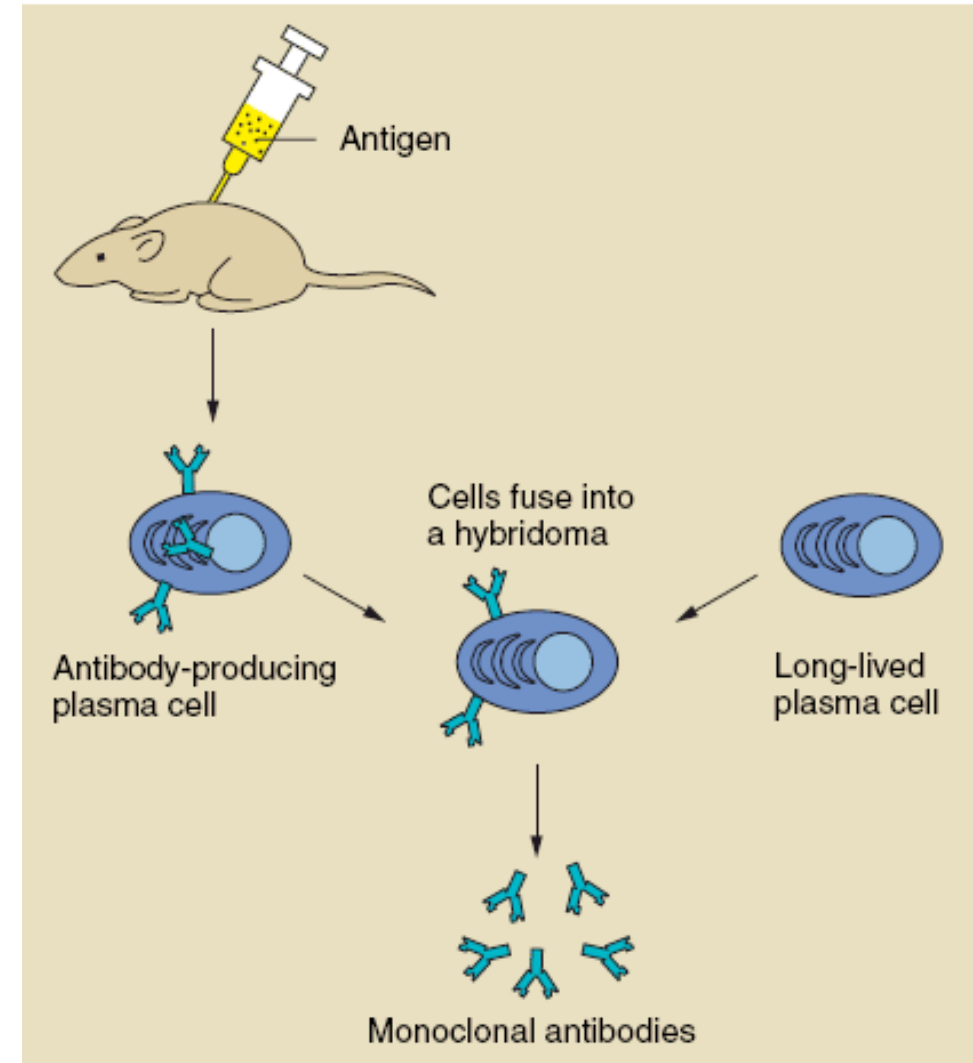


- protilátky mohou být:
 - Monoklonální** - získávají se z hybridomů
 - Polyklonální** - získávají se z krve imunizovaných zvířat

Příprava monoklonálních Ab

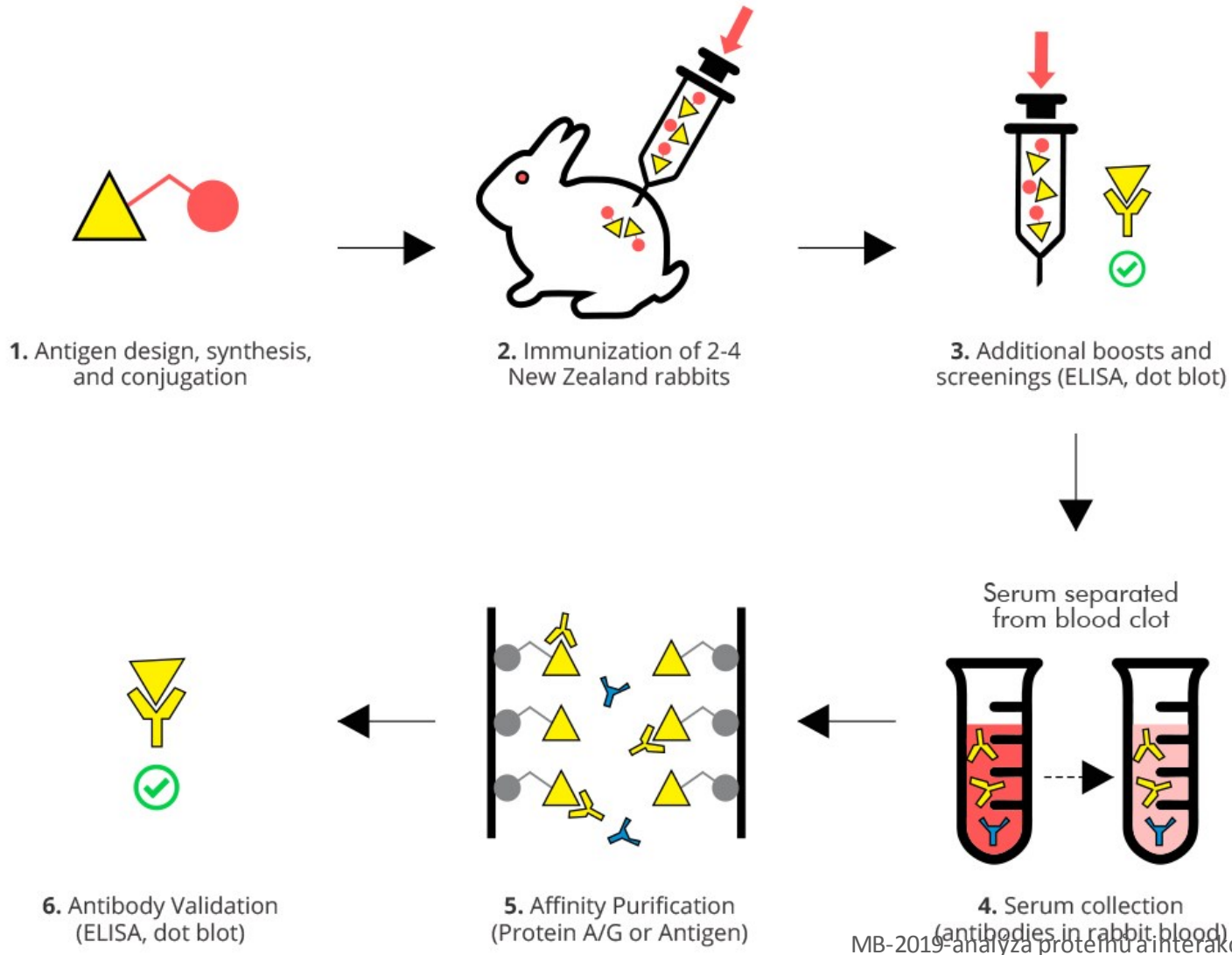
Produkuje se pomocí hybridomů

- hybridom vzniká fúzí:
- **nádorové leukemické buňky** → nesmrtelnost
- **B-lymfocytu imunizovaného zvířete** → produkce Ab
- drahá příprava, ale na konci téměř neomezený zdroj Ab
- specifické pouze k jednomu epitopu



Příprava polyklonálních Ab

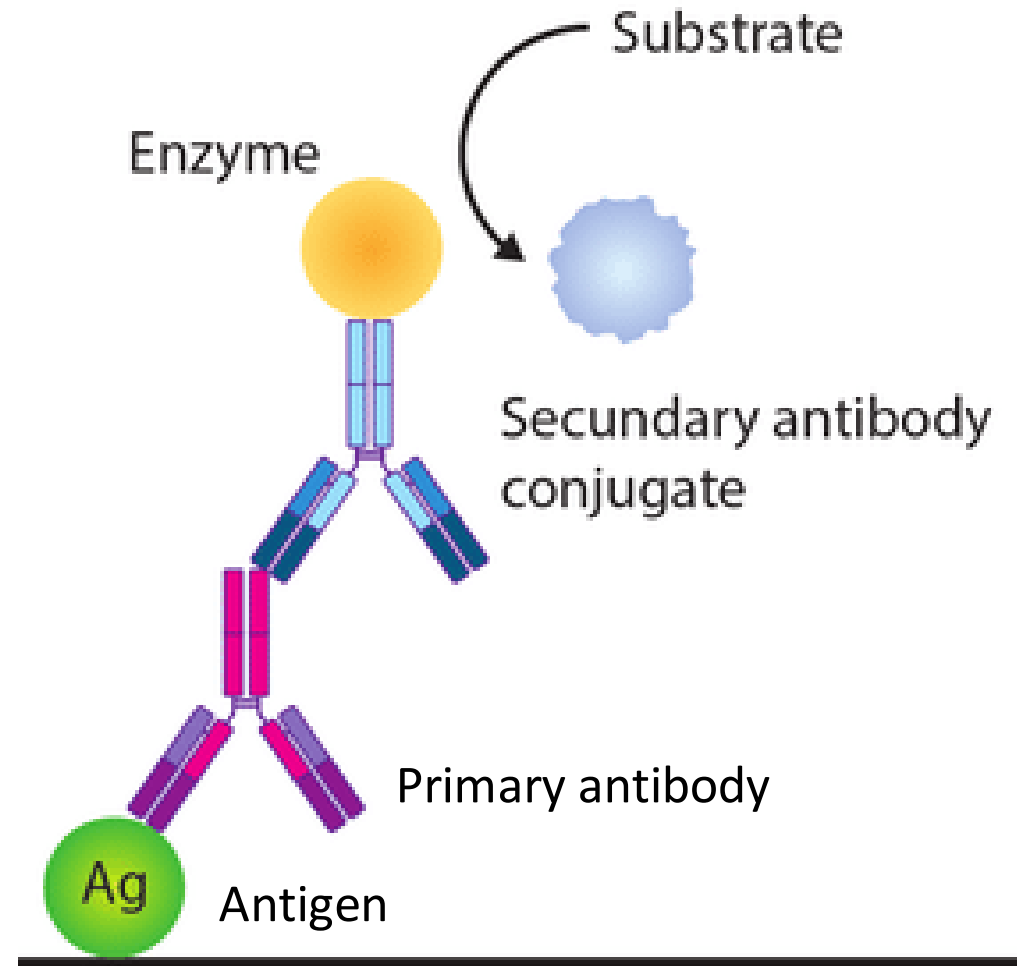
Získávají se ze séra imunizovaných laboratorních zvířat



- relativně levná a rychlé příprava
- reagují s více epitopy

Sendvičové uspořádání Ab

- **primární Ab** se váže na specifický epitop antigenu
- **značená sekundární Ab** se váže na primární protilátku
- výhoda – výroba drahých značených Ab pouze proti malému počtu primárních Ab (anti-myší IgG, anti-králičí IgG,...)

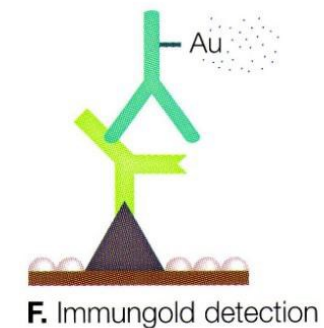
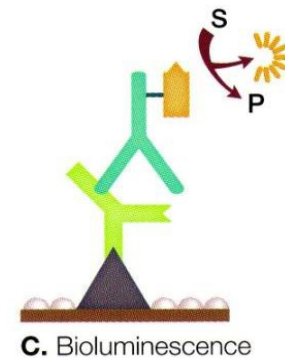
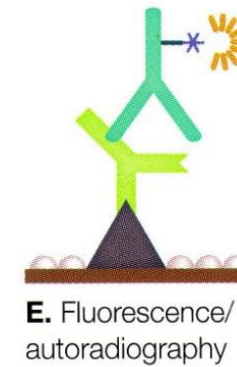
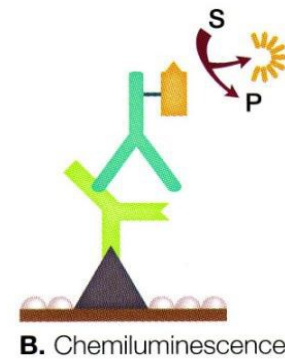
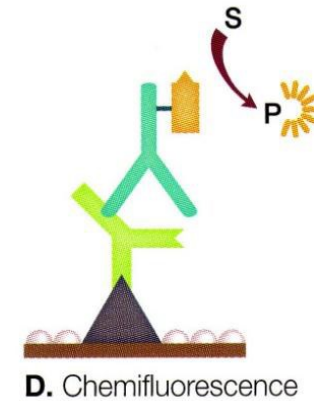
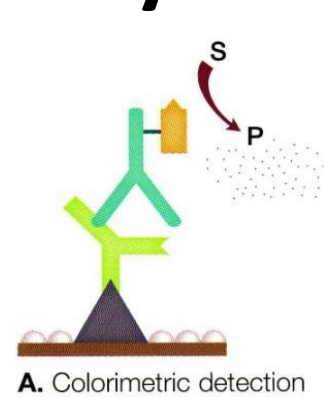


Typy značení sekundární Ab

- radioaktivně
- křenová peroxidáza (horseradish peroxidase – HRP)
- alkalická fosfatáza
- biotin
- fluorescenční značka

Detekční metody

- kolorimetrické metody
- chemiluminiscence
- bioluminiscence
- chemifluorescence
- fluorescence / autoradiografie
- zlatem značené Ab

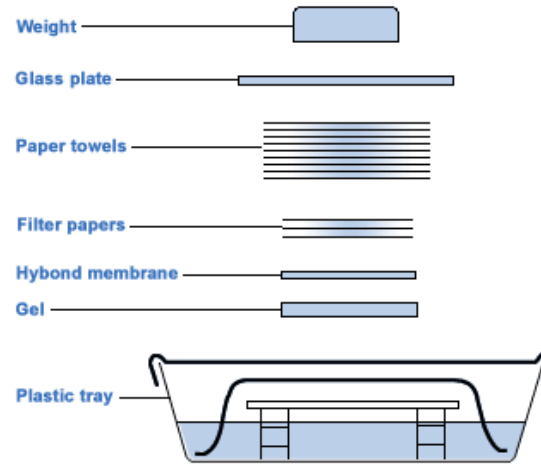


Imunobloting

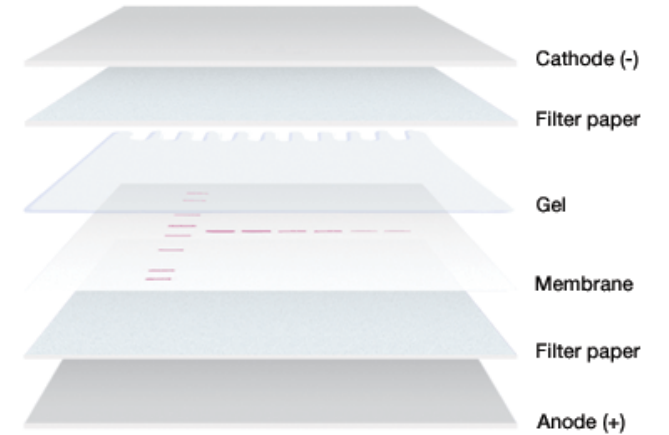
- **rozdělení proteinů** daného vzorku gelovou elektroforézou
- **přenos** proteinů na membránu („westernblotting“ - přesávka)
- **inkubace membrány** se specifickou protilátkou
- **inkubace membrány** se sekundární značenou protilátkou
- **detekce** navázané **protilátky**

Způsoby přenosu („blotingu“)

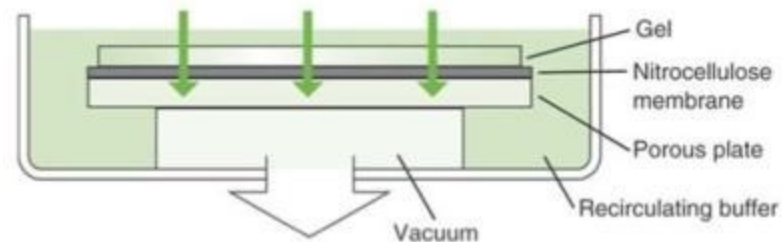
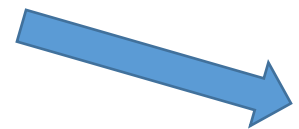
- kapilární přenos



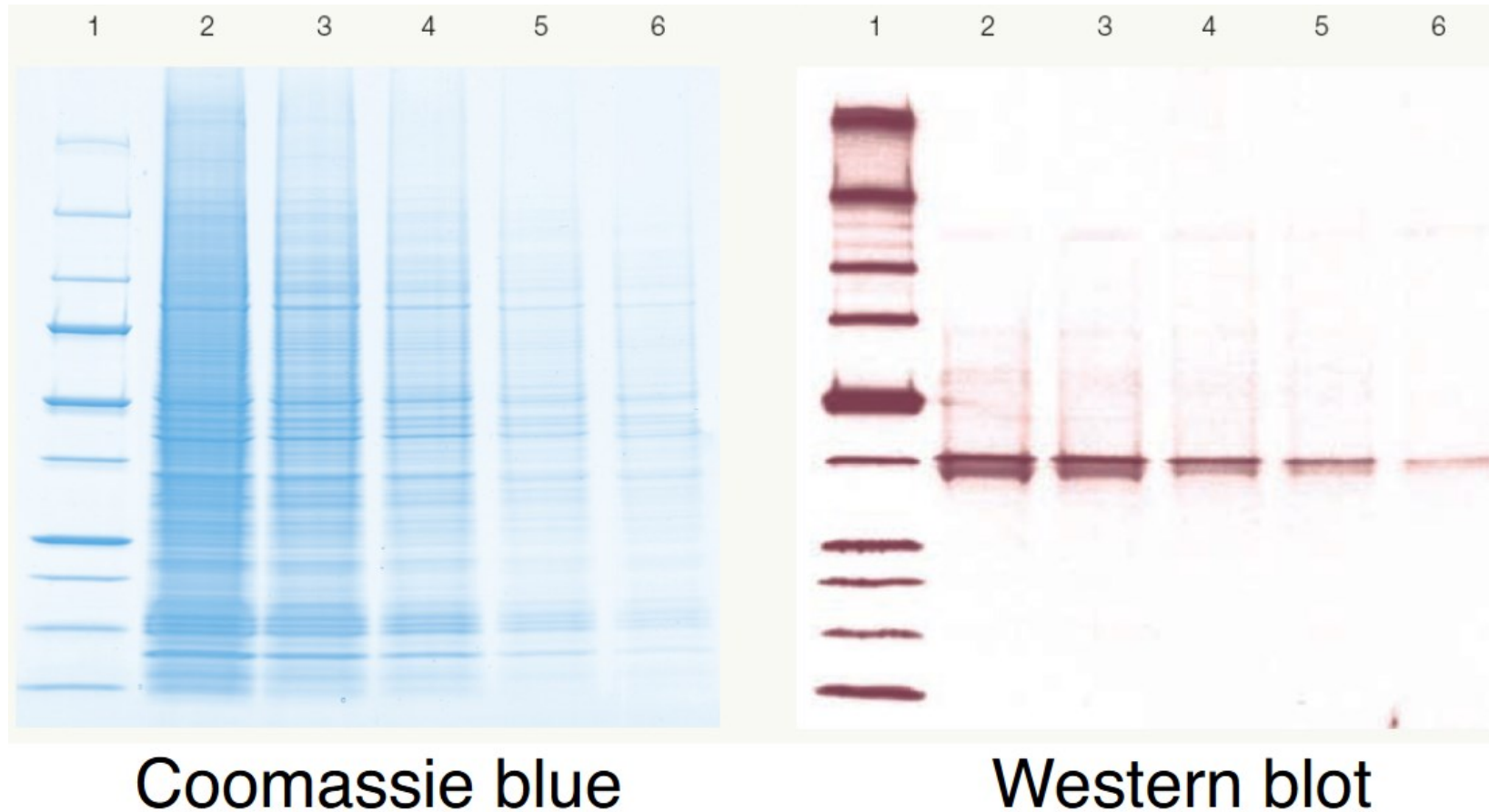
- elektroforetický přenos



- vakuový přenos



Výsledek Westernova přenosu

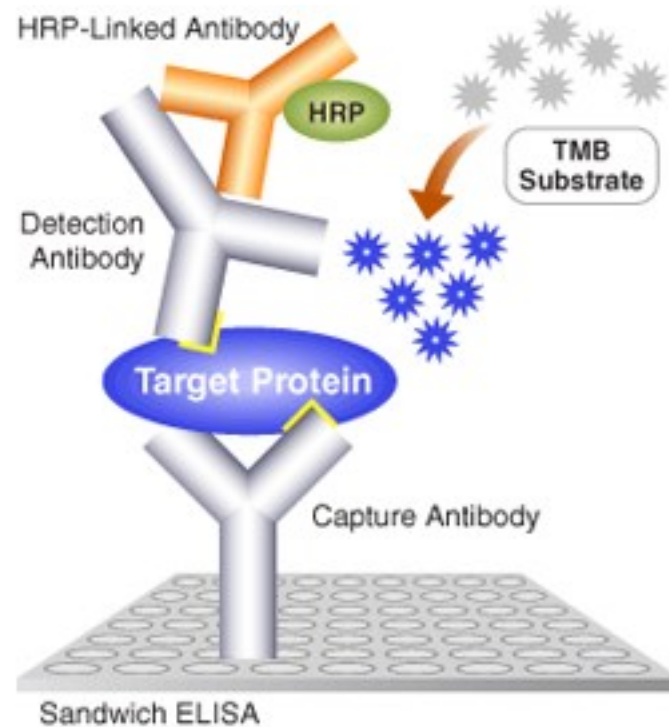


Sample: HeLa cell lysate.

Antibody: Specific for human CDK7 protein

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Využívá 2 Ab proti jednomu proteinu (2 různé epitopy), jedna Ab je vázaná na nosiči – nejčastěji na stěně reakční nádoby



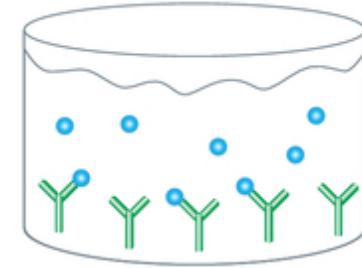
ELISA

- vysoká citlivost – pg/ml => potřeba malého množství vzorků
- možnost využití poloautomatických systémů

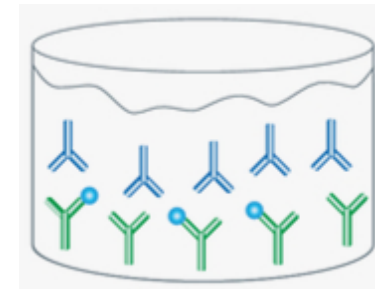


Provedení ELISA

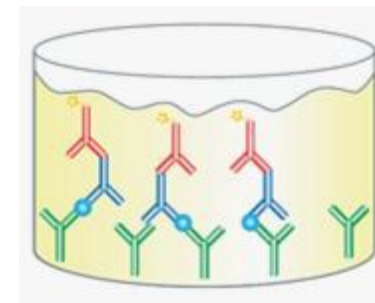
Vazba proteinu na 1. Ab



Promytí a vazba 2. Ab na protein

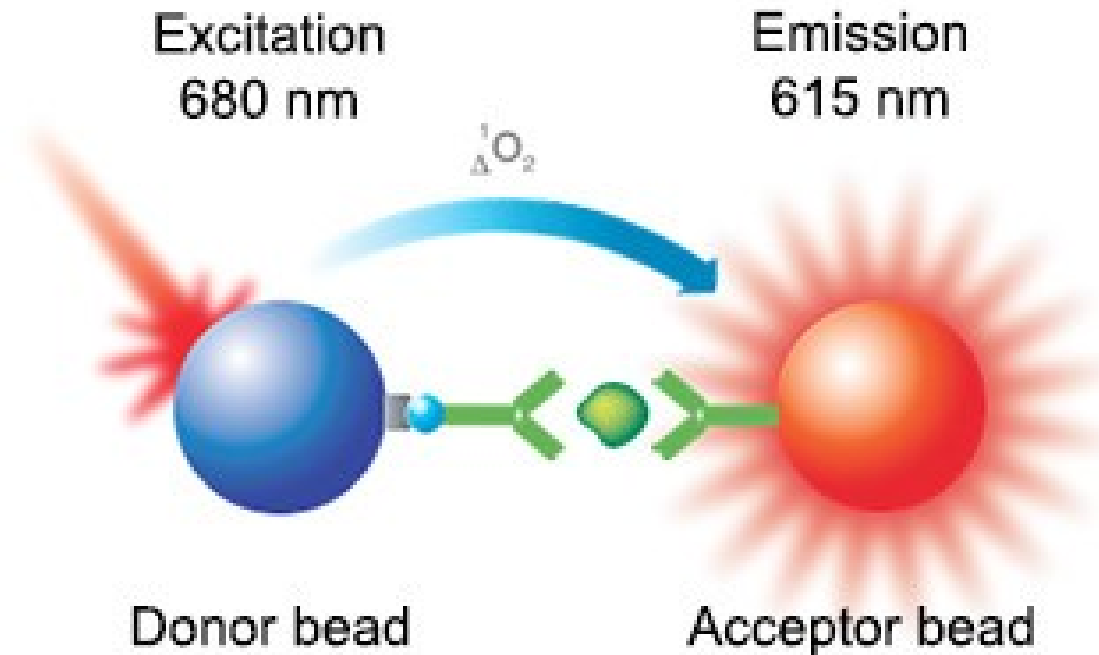


Promytí a detekce 2. Ab



AlphaLISA

- modifikace ELISA
- „ELISA v roztoku“



SDS-PAGE

<https://www.youtube.com/watch?v=iqTHx9aUVcY>

Western blotting

<https://www.youtube.com/watch?v=VgAuZ6dBOfs>

ELISA

<https://www.youtube.com/watch?v=849HN1ueUhs>