



***Metody analýzy proteinů.
Chromatografické stanovení
mikrobiálních metabolitů a
složek bakteriálních stěn.***

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

Bartos.Milan@atlas.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2017

Obsah přednášky

- 1) Separační metody – izoelektrická fokusace, dvourozměrná elektroforéza, chromatografie**
- 2) Plynová chromatografie v mikrobiologii**
- 3) Identifikační metody - hmotnostní spektrometrie, využití protilátek, western blotting, imunoprecipitace, imunocytochemie a imunohistochemie**
- 4) Průtoková cytometrie**

Doporučená literatura



Základní přednáška + odkazy na odborné publikace

Analýza produktů translace

Kolekce proteinů v buňce = proteom

- **Proteom studuje proteomika**
- **Poskytuje informace nedosažitelné studiem transkriptomu**

Dva výchozí postupy proteomiky

- **Separace proteinů v proteomu**
- **Identifikace jednotlivých proteinů po separaci**

Metody separace proteinů

Izoelektrická fokusace

- **Pohyb proteinů v gradientu pH po aplikaci elektrického pole**
- **Proteiny migrují do tzv. „izoelektrického bodu“**

Dvourozměrná elektroforéza

- **Separace izoelektrickou fokusací – na základě elektrického náboje**
- **Separace elektroforézou – na základě velikosti**

Chromatografie

- **Separace na základě odlišné propustnosti proteinů náplní chromatografické kolony**

Metody identifikace proteinů

Hmotnostní spektrometrie

- **Na základě poměru hmotnosti a náboje ionizovaných molekul (MALDI-TOF)**

Detekce protilátkami

- **Protilátky polyklonální**
- **Protilátky monoklonální**

Další „imunologické“ metody

- **Western blot**
- **Imunoprecipitace, imunocytochemie a imunohistochemie**

Další metody identifikace proteinů

ICAT

- **Isotope coded affinity tag**
- **Srovnávání dvou proteomů po označení různými izotopy (např. normální H a deuterium)**

Proteinové mikročipy

- **Detekce na imobilizovaných markerech**
- **Purifikace proteinů, stanovení expresních profilů nebo meziproteinových interakcí**

Průtoková cytometrie

- **Studium míry přítomnosti určitých antigenů v jednotlivých buňkách v závislosti na čase**

Separáční metody

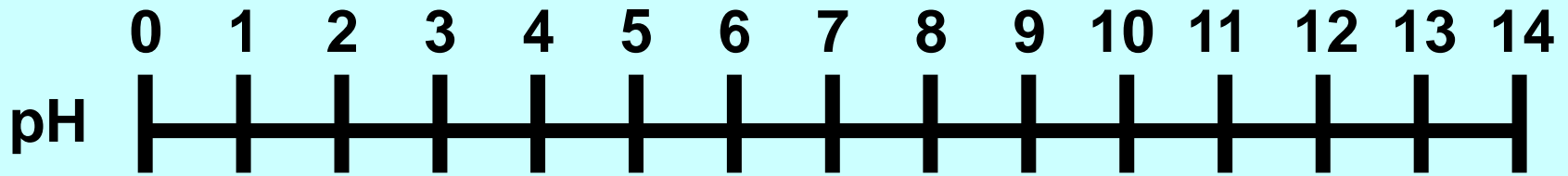
Izoelektrická fokusace

Aplikace elektrického pole napříč stabilním gradientem pH

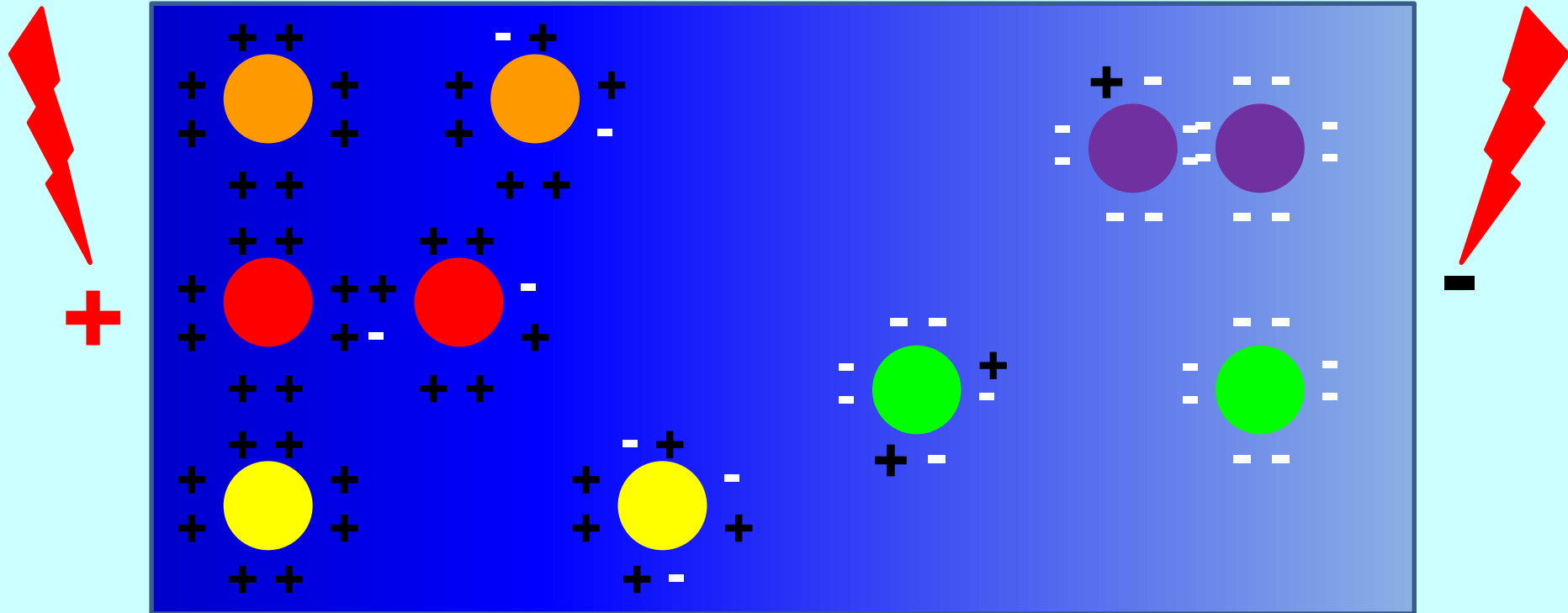
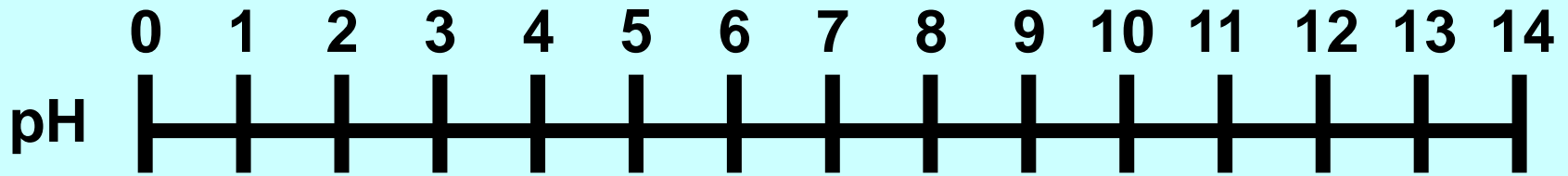
- proteiny mají specifický izoelektrický bod (pI), který odpovídá takovému pH, při kterém nemají ani pozitivní ani negativní náboj
- Je-li pH **vyšší** než pI, pak protein nese **negativní** náboj
- Je-li pH **nižší** než pI, pak protein nese **pozitivní** náboj

Proteiny se v gradientu pH pohybují tak dlouho, dokud nedosáhnou pH odpovídající pI, pak se jejich pohyb zastaví

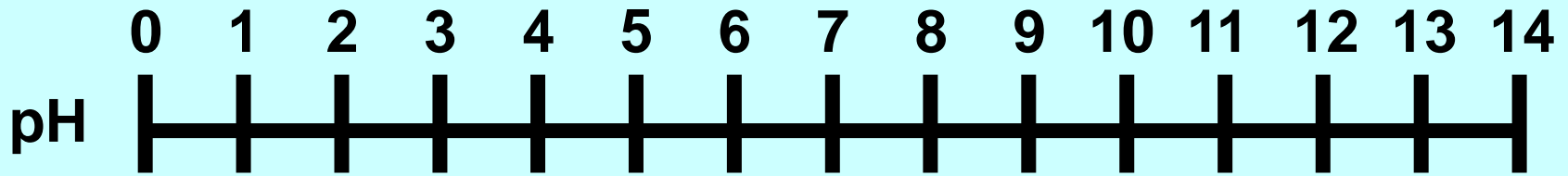
Izoelektrická fokusace



Izoelektrická fokusace



Izoelektrická fokusace

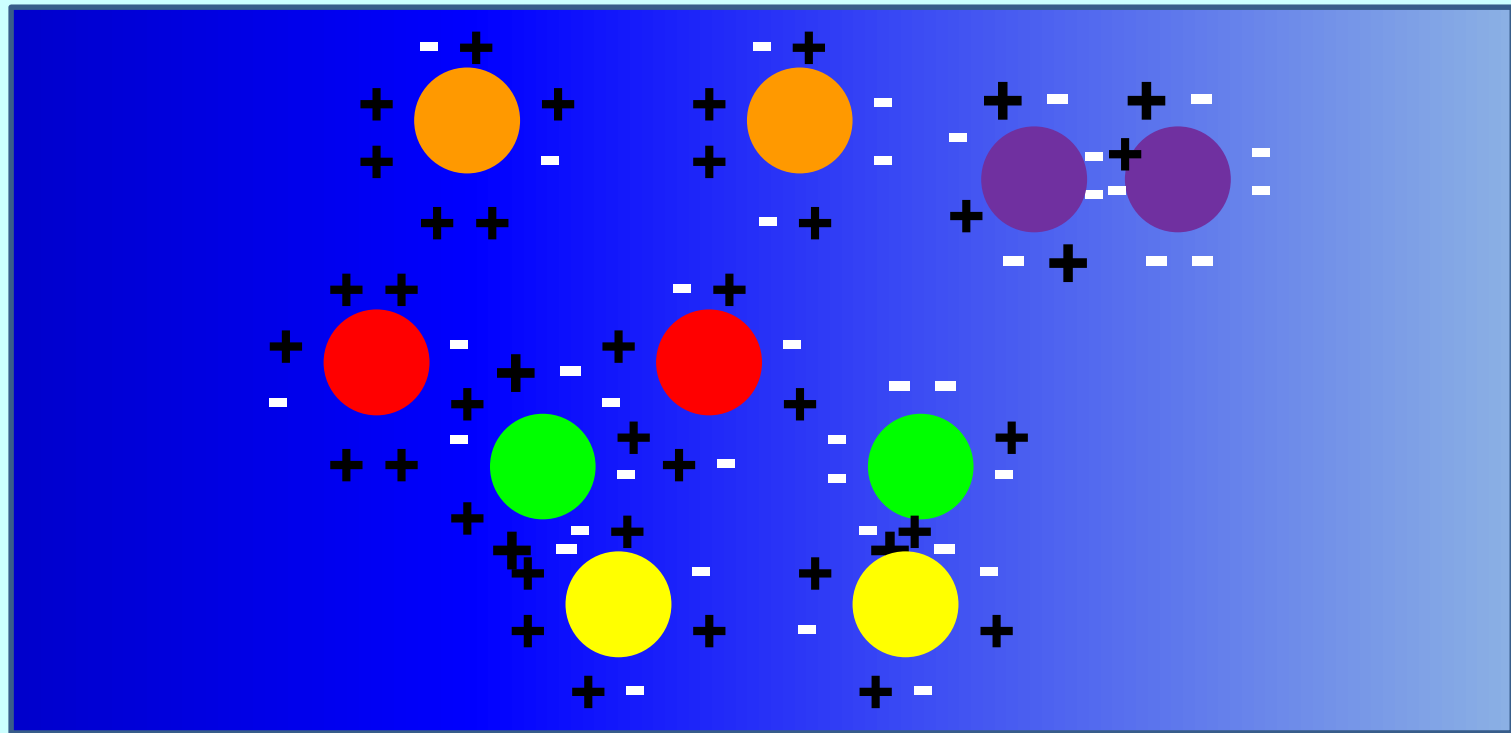


5,0

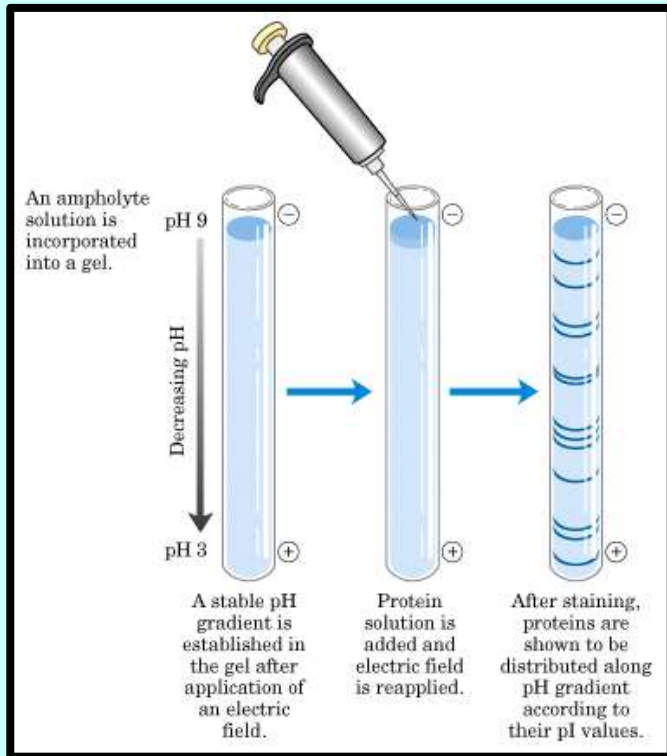
6,8

7,5

8,5 9,8



Aparatury na izoelektrickou fokusaci



Izoelektrická fokusace v živých buňkách?

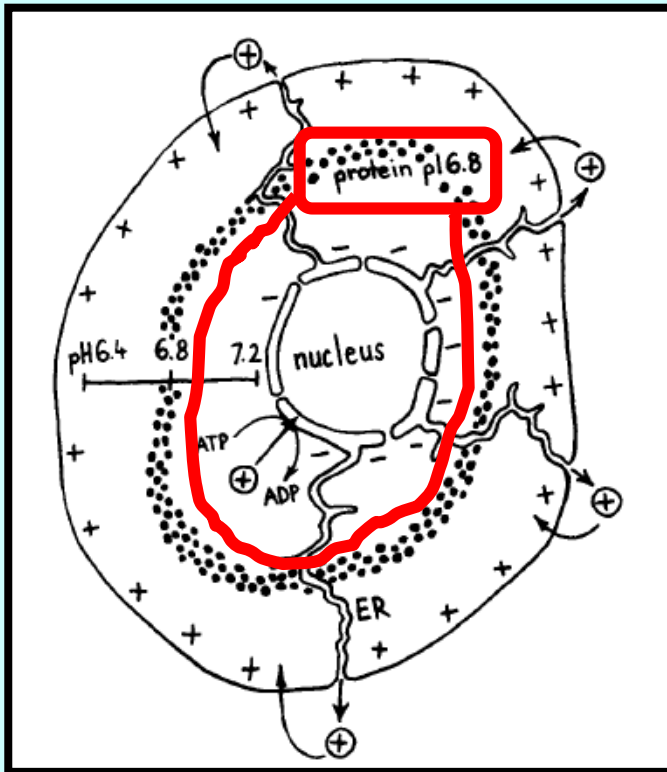


Eukaryotické buňky provádějí izoelektrickou fokusaci ve vnitřním prostředí

- **Slouží ke spuštění, zastavení nebo regulaci rychlosti metabolických reakcí difúzí enzymů a jejich substrátů**
- **Buňky modifikují izoelektrický bod např. fosforylací nebo defosforylací**

Flegr, J. (1990): "Does a cell perform isoelectric focusing?". BioSystems 24 (2): 127–133.

Model vytváření elektrického pole v buňce

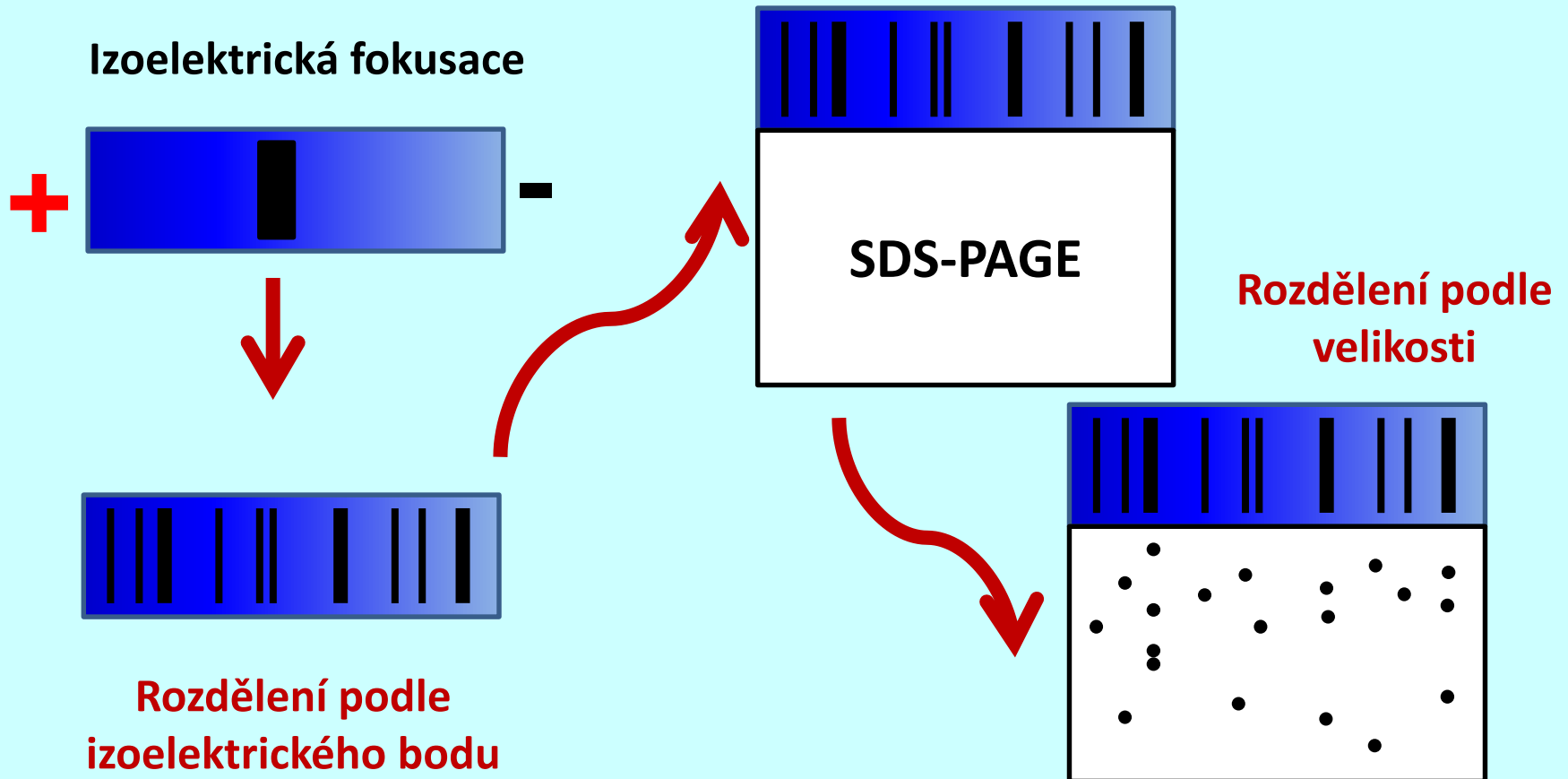


Všimněte si teoretické pozice proteinu o $pI=6,8$

- Střed buňky *S. cerevisiae* má $pH=7,2$, periferie pak $pH=6,4$
- Střed tedy nese negativní náboj
- Pozitivně nabité ionty jsou pumpovány do cisteren ER a odtud transportními vezikuly a kanály do extracelulárního prostředí
- Výsledné pole je ovlivněno cytoskeletem a obsahem jednotlivých organel (lysozomy, mitochondrie, ...)

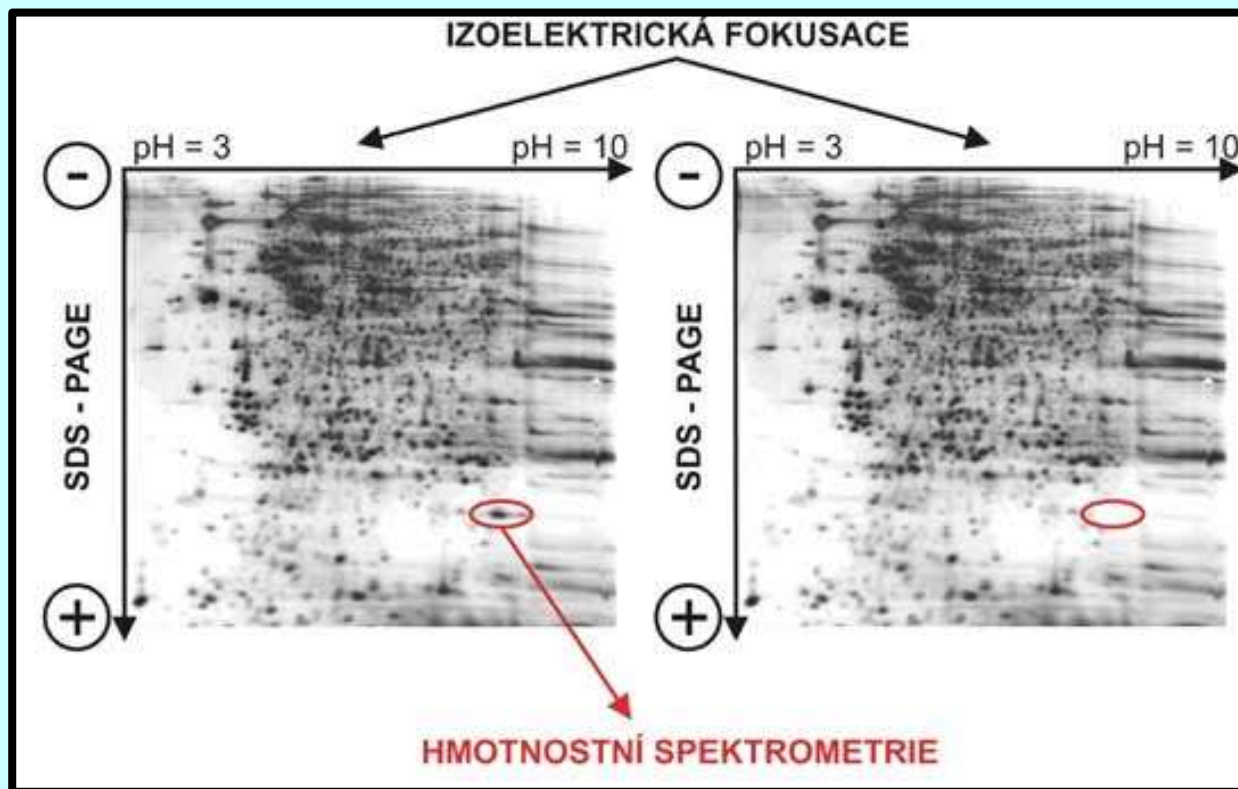
Dvourozměrná elektroforéza

- 1) V jednom směru jsou proteiny děleny izoelektrickou fokusací
- 2) Následuje ve druhém směru SDS-PAGE



Výsledek dvourozměrné elektroforózy

Specifické uspořádání proteinových skvrn
ze vzorku



Analýza dvourozměrné elektroforézy

Záznam lze porovnat s jinými a tím

- **Identifikovat proteiny přítomné v jednom vzorku a ne ve druhém**
- **Identifikovat proteiny, které se syntetizují v různé míře podle změn v okolních podmínkách nebo podle růstové fáze**

2D elektroforézou lze rozlišit až 10 000 proteinových skvrn



Chromatografické metody



Zopakujme si

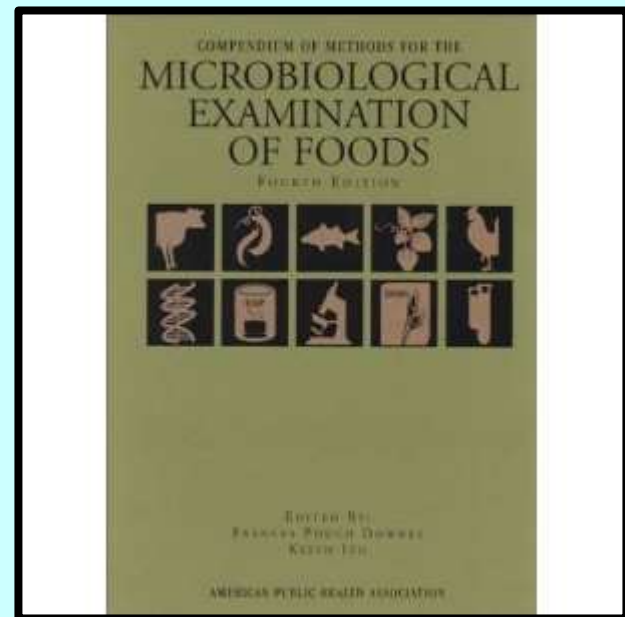
- Je souhrnné označení pro skupinu fyzikálně-chemických separačních metod
- Slouží k **separaci** a **analýze** složitých směsí látek
- Molekuly analyzované látky se u všech typů chromatografických separací rozdělují mezi tzv. **stacionární** a **mobilní** fázi
- Dělení je založeno na rozdílné distribuci složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi

Plynová chromatografie v mikrobiologii

- **Metoda používána od 60. let 20. století**
- **Použití k analýze produktů bakteriálního metabolismu**

Rok 2001

Chapter 11



Princip plynové chromatografie

Mobilní fáze je plyn, pevná fáze pak kapalina zakotvená na pevném povrchu.

Dělené látky se neustále rozpouštějí v pevné fázi a odpařují do mobilní fáze.

- **jako nosný plyn se používají plyny He, Ar, N₂, H₂, CO₂**
- **mobilní fáze je film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry**
- **jako mobilní fáze se používají polyethylenglykoly, polypropylenglykoly, polyethylenglykoladipáty, methylpolysiloxany a další**

Plynová chromatografie v mikrobiologii

Komerčně dostupný systém je založen na analýze metyl esterů mastných kyselin (fatty acid methyl ester (FAME) analysis)

**Sherlock Microbial
Identification System firmy
Microbial ID, Inc, od roku
1991**



Více najdete na http://www.midi-inc.com/pages/microbial_id.html

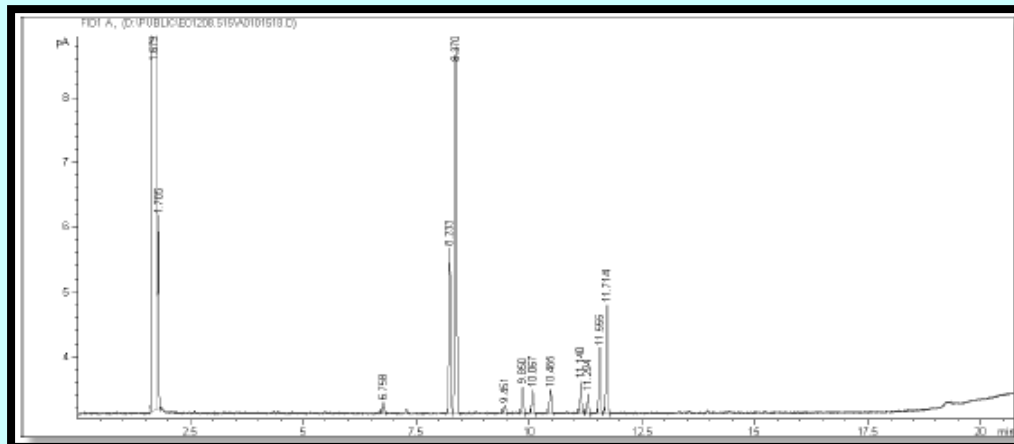
Princip FAME

- **Metoda vychází z předpokladu, že některé mikroorganismy mají typické spektrum buněčných mastných kyselin**
- **Toto spektrum se porovnává se spektrem u podobných druhů**
- **Původní databáze pro identifikaci aerobních bakterií vyvinul M. Sasser v roce 1990**

Více na

http://natasha.eng.usf.edu/gilbert/courses/Biotransport%20Phenomena/pdf/bacteria_gc_1.pdf

Příklad spektra



Volume: DATA File: E012085.15A Seq Counter: 10 ID Number: 1518

Type: Samp Bottle: 20 Method: TSBA40

Created: 2/8/01 4:07:34 PM

Created By: rodding

Sample ID: UN-Company X-5E(1728-010692B)

Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.679	3.453E+8	0.027	—	7.012	SOLVENT PEAK	—	< min rt	
1.785	—	—	—	7.225		—	< min rt	
6.758	771	0.034	1.004	13.619	ISO	1.17	ECL deviates 0.000	Reference 0.009
8.233	12955	0.041	0.973	14.823	15:0 ISO	19.11	ECL deviates 0.000	Reference 0.009
8.370	28869	0.040	0.971	14.713	15:0 ANTEISO	42.48	ECL deviates 0.000	Reference 0.008
9.451	663	0.039	0.954	15.387	16:1 w7c alcohol	0.96	ECL deviates 0.000	
9.850	2118	0.041	0.949	15.627	16:0 ISO	3.05	ECL deviates 0.000	Reference 0.008
10.067	1936	0.040	0.946	15.758	16:1 w11c	2.78	ECL deviates 0.001	
10.465	1913	0.040	0.941	15.999	16:0	2.73	ECL deviates -0.001	Reference 0.007
11.140	2839	0.046	0.934	16.390	ISO 17:1 w10c	4.02	ECL deviates 0.002	
11.294	1631	0.042	0.933	16.479	Sum In Feature 4	2.31	ECL deviates 0.003	17:1 ISO I/ANTEI B
11.555	5794	0.046	0.930	16.631	17:0 ISO	8.17	ECL deviates 0.001	Reference 0.008
11.714	9398	0.043	0.929	16.723	17:0 ANTEISO	13.23	ECL deviates 0.000	Reference 0.007
—	1631	—	—	—	Summed Feature 4	2.31		17:1 ANTEISO B&I

ECL Deviation: 0.001

Reference ECL Shift: 0.008

Number Reference Peaks: 7

Total Response: 68887

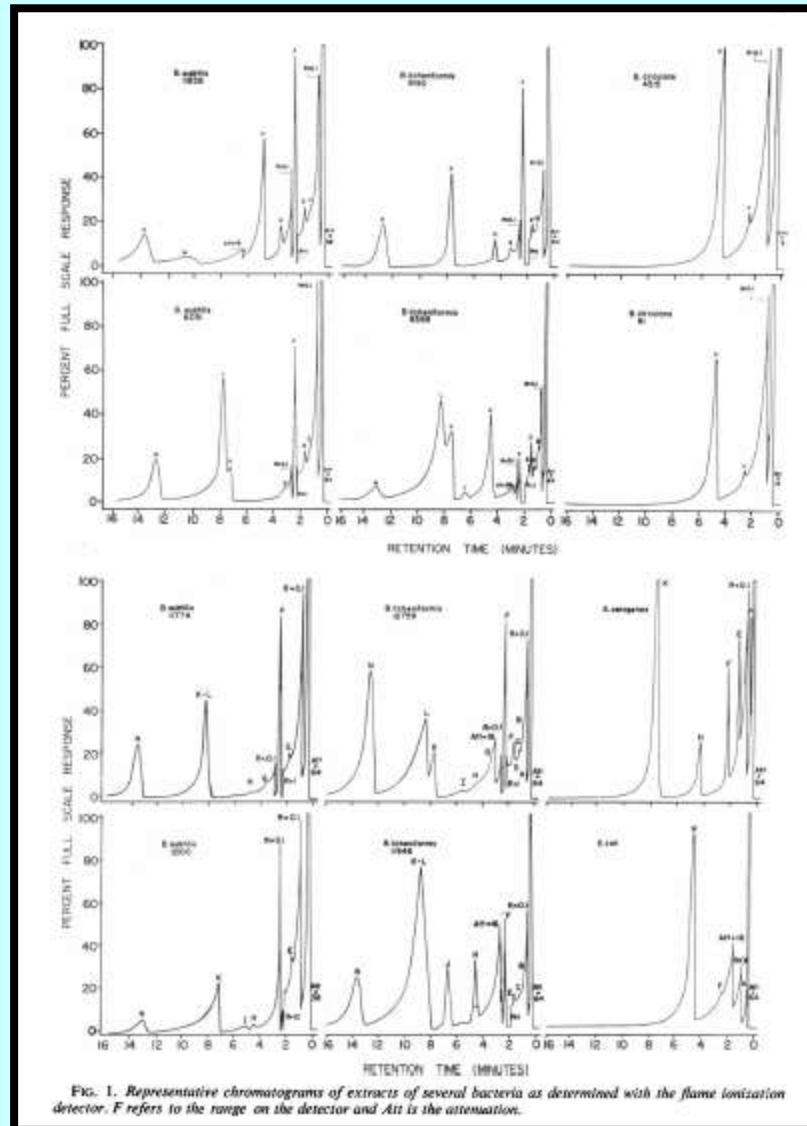
Total Named: 68887

Příklad porovnání spekter

B. subtilis

B. licheniformis

B. circulans



B. subtilis

B. licheniformis

B. circulans

B. subtilis

B. licheniformis

Aerobacter aerogenes

B. subtilis

B. licheniformis

E. coli

podle Henis et
al. 1966

Využití FAME

- Mastné kyseliny s krátkými řetězci (těkavé mastné kyseliny) k identifikaci anaerobních bakterií



Které to jsou ty těkavé mastné kyseliny?

**Kyselina octová, propionová,
máselná, isomáselná, valerová,
isovalerová, hexanová**



Využití FAME

- **Mastné kyseliny s krátkými řetězci (těkavé mastné kyseliny) k identifikaci anaerobních bakterií**
- **Mastné kyseliny o délce 9-20 uhlíků pro nefermentativní Gramnegativní organismy**
- **Na kapilárách s křemičitými kuličkami (umožňují dělit hydroxy-kyseliny a řadu izomerů) je metoda rozšiřitelná na celé spektrum čistých mikrobiálních kultur**

Metodologie FAME

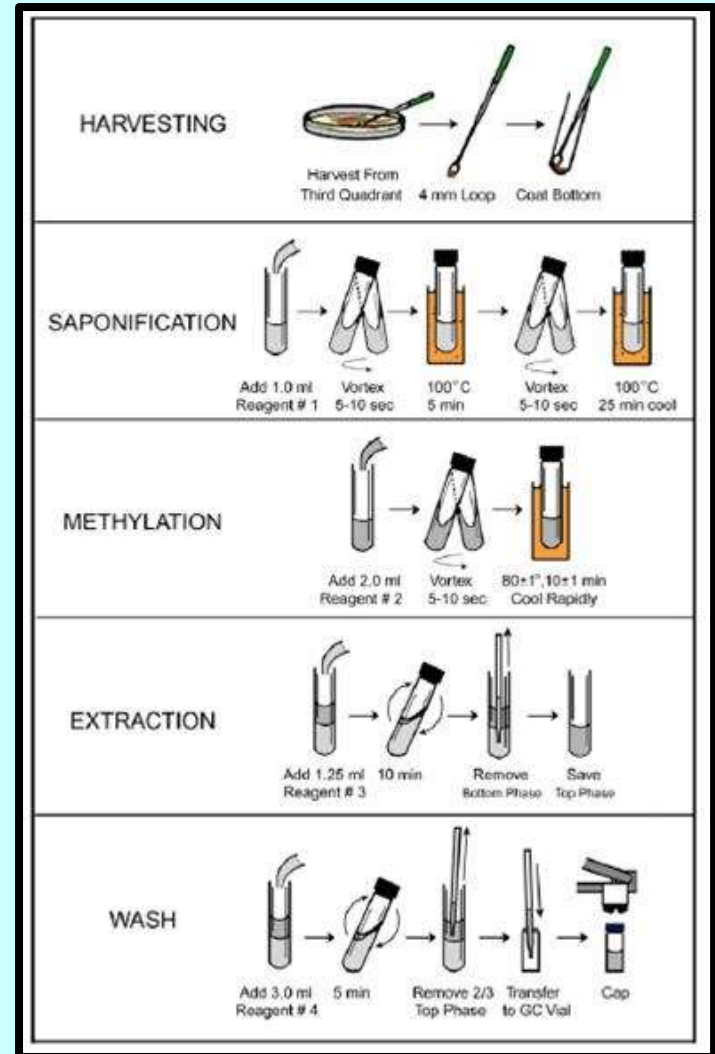
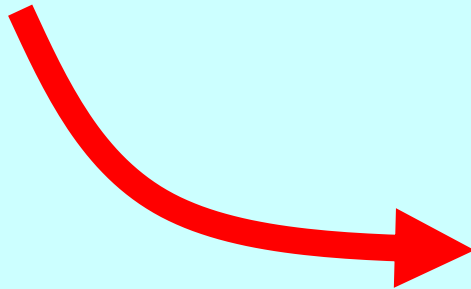
- **Specifický postup přípravy vzorku**
- **Sofistikovaný chromatografický systém**

This system was developed for microbiologists and it does not require extensive knowledge of gas chromatography!



Příprava vzorku pro plynovou chromatografii

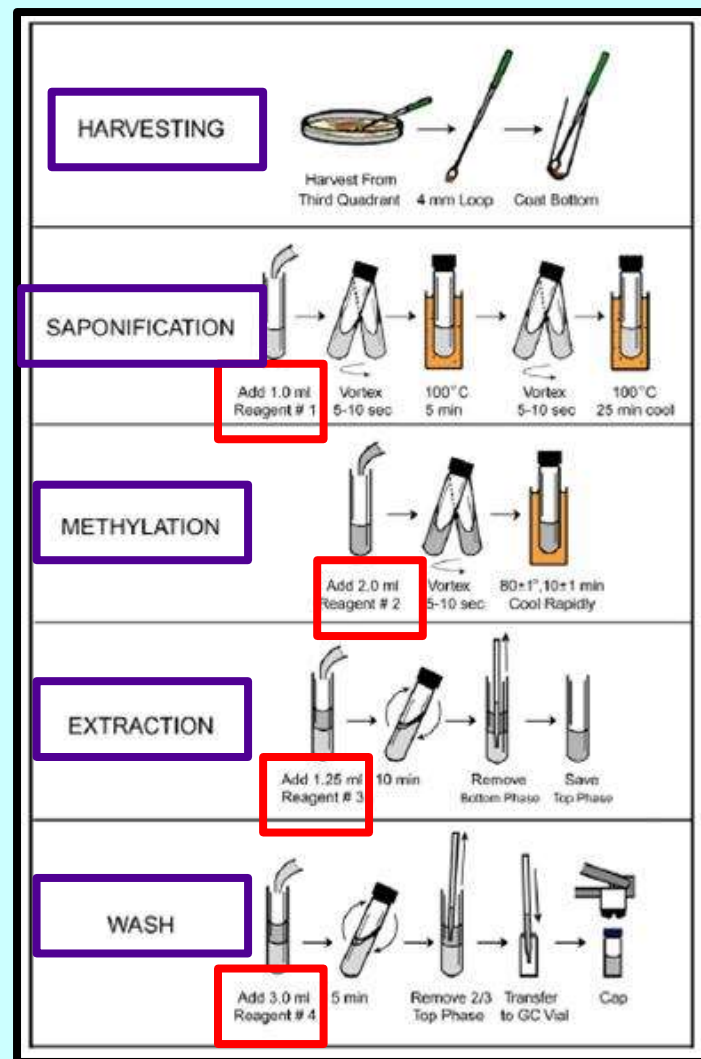
- Subkultivace bakterií (celkem 2x) na pevném médiu = získání čisté kultury
- Aerobní kultivace při 28°C po dobu 24 h
- Kontrola čistoty kultury
- Extrakce mastných kyselin



Příprava vzorku pro plynovou chromatografii

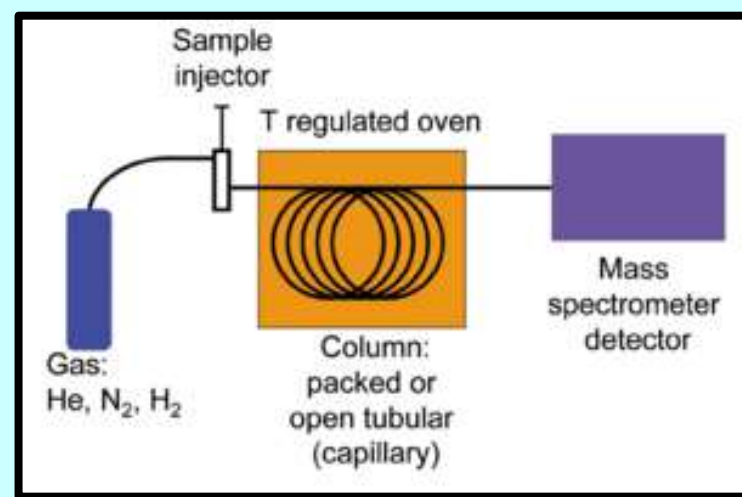
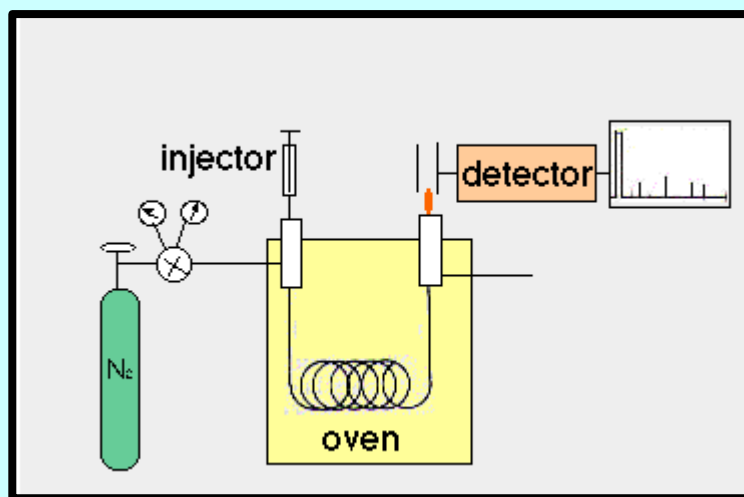
- R1: NaOH v metanolu
- R2: 6N HCl v metanolu
- R3: hexan v metyl tert-butyl eteru
- R4: vodný roztok NaOH

Roztoky o vysoké puritě,
nové sklo, kontakt
s reagensiiemi jen sklo a
teflon



Plynová chromatografie + hmotnostní spektrometrie

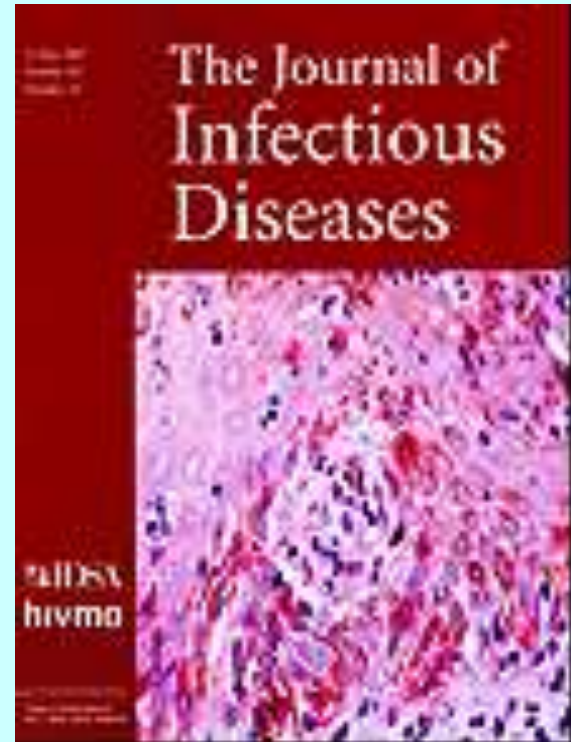
[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0307-4412\(85\)90155-4/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0307-4412(85)90155-4/abstract)



Mallet, A. I. (1985), Gas chromatography mass spectrometry; Applications in microbiology: Edited by G Odham, L Larsson and P-A Mardh. pp 444. Plenum Press, New York and London, 1984.

Úloha chromatografie v klinické mikrobiologii

<http://www.jstor.org/discover/10.2307/30102348?uid=3737856&uid=2129&uid=2&uid=70&uid=4&sid=50279540154377>



Cherry a Moss (1969): The Role of Gas Chromatography in the Clinical Microbiology Laboratory. *The Journal of Infectious Diseases* 119 (6), pp. 658-662

Příklady aplikací I

Henis et al. (1966): Detection and Identification of Bacteria by Gas Chromatography. Applied Microbiology 14 (4), 513-524.

<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m81-066>

Fedorak a Westlake (1981): Microbial degradation of aromatics and saturates in Prudhoe Bay crude oil as determined by glass capillary gas chromatography. Canadian Journal of Microbiology, 1981, 27(4): 432-443

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00168.x/abstract>

Robertson (2006): Confirmation of 'aerobic denitrification' in batch cultures, using gas chromatography and ¹⁵N mass spectrometry. FEMS Microbiology Ecology 18 (2), 113-120.

Příklady aplikací II

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00278.x/abstract>

Richardson et al. (2008): Simultaneous determination of volatile and non-volatile acidic fermentation products of anaerobes by capillary gas chromatography. Letters in Applied Microbiology 9 (1), 5-8.

Müller et al. (1998): Improved Identification of *Mycobacteria* by Using the Microbial Identification System in Combination with Additional Trimethylsulfonium Hydroxide Pyrolysis. Journal of Clinical Microbiology 36 (9), 2477-2480.

Metody identifikace proteinů

Hmotnostní spektrometrie

Metoda stanovení molekulové hmotnosti

- **Rozděluje proteiny (peptidy) podle poměru jejich hmoty a náboje**
- **Molekula se nejprve ionizuje metodou MALDI nebo ESI (electrospray ionization)**
- **Vzniklé ionty jsou vtaženy do analyzátoru elektrickým polem, kde se rozdělují podle poměru hmotnosti a náboje**
- **Následuje počítačové zpracování dat**

Princip MALDI-TOF

matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight

- varianta hmotnostní spektrometrie
- peptidy jsou ionizovány a stanoví se poměr hmoty k náboji na základě doby letu (time-of-flight) k detektoru
- vypočte se M/z a ta je specifická pro každou aminokyselinu

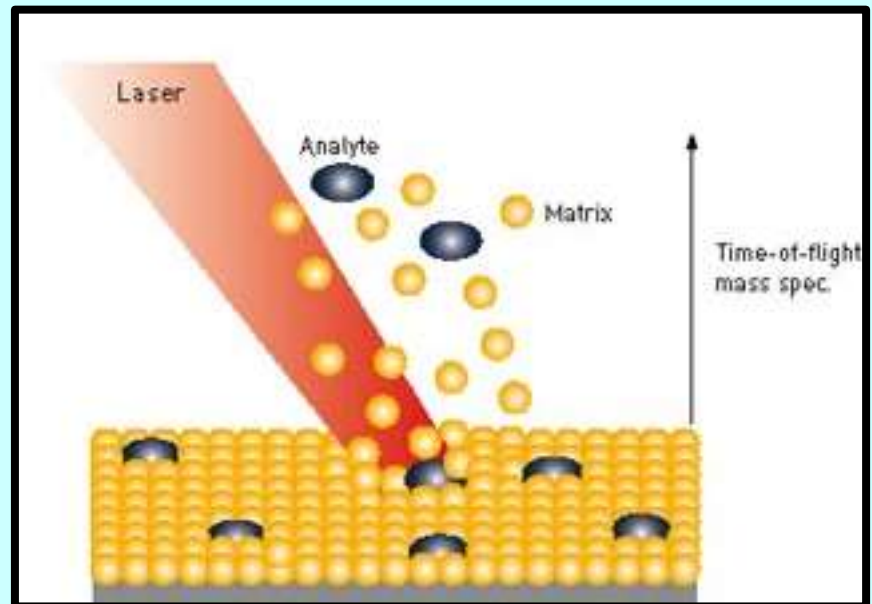
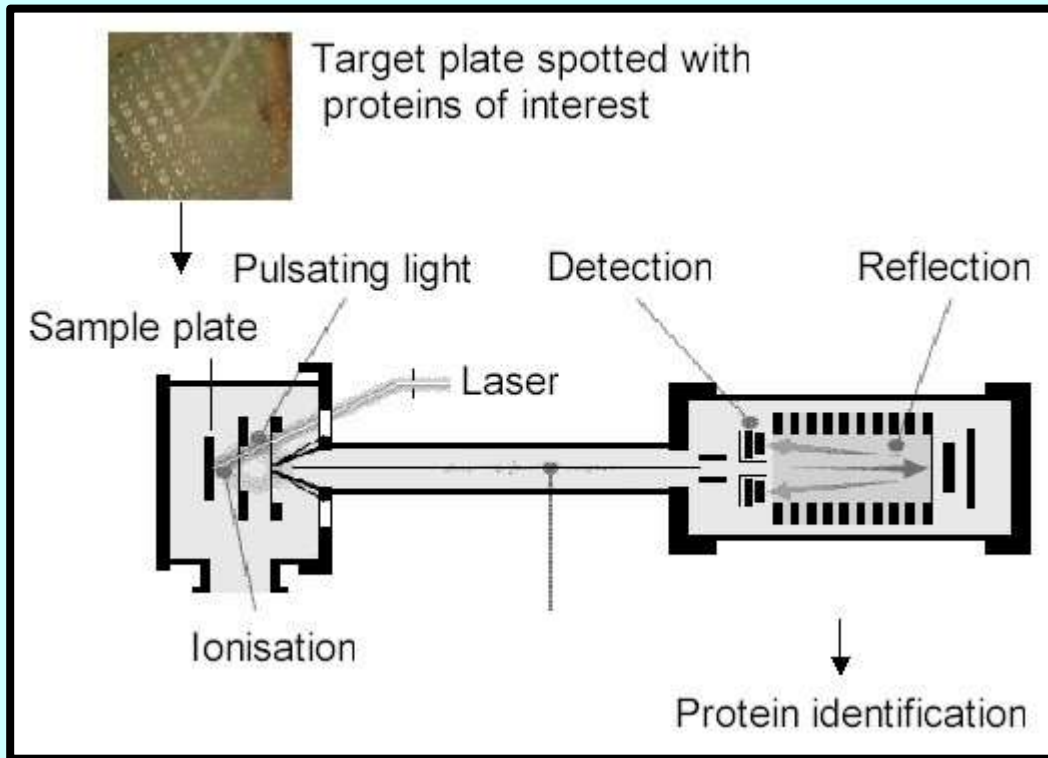


Schéma zařízení



Výhody a nevýhody



- 1) **Není zapotřebí sekvenovat proteiny**
- 2) **Stačí jen znalost molekulové hmotnosti**

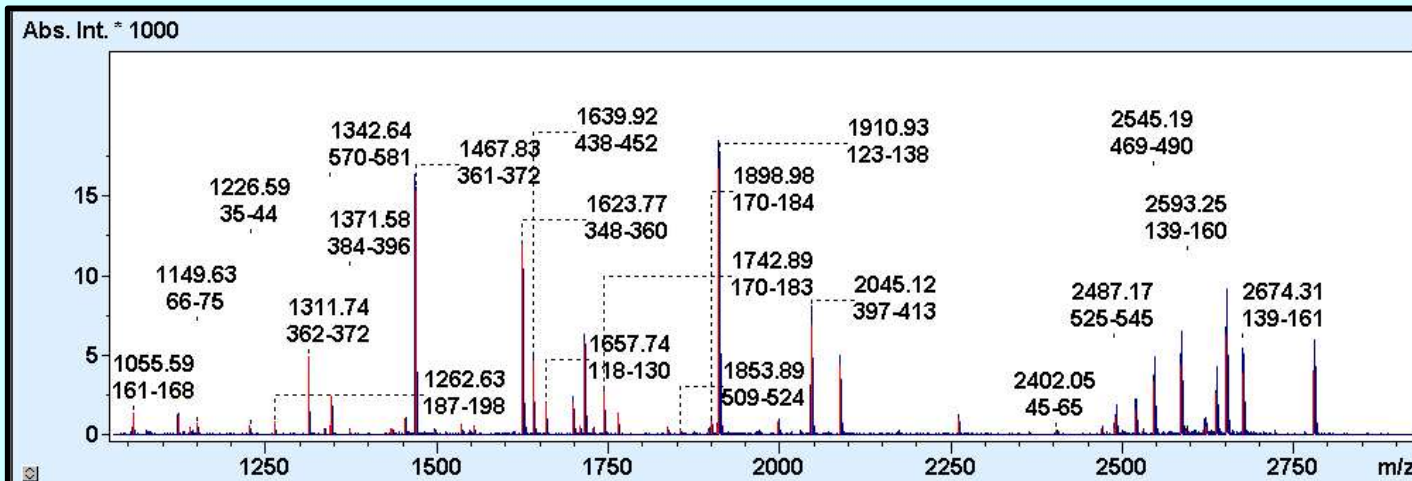


- 1) **Nelze analyzovat multimerní proteiny**
- 2) **Vzorky se izolují z SDS-PAGE**

Příprava vzorku pro spektrometrii

- 1) SDS-PAGE**
- 2) Chemická modifikace – odbourání disulfidických můstků, karboxymetylace cysteinů**
- 3) Štěpení proteázami**
- 4) Extrakce peptidů acetonitrilem a vakuové vysušení**
- 5) Rozpuštění ve vodě**
- 6) Purifikace a úprava pro spektrometrii**

Výsledek MALDI-TOF



Protein View | Match Errors | MS/MS Fragments | MS/MS Analysis

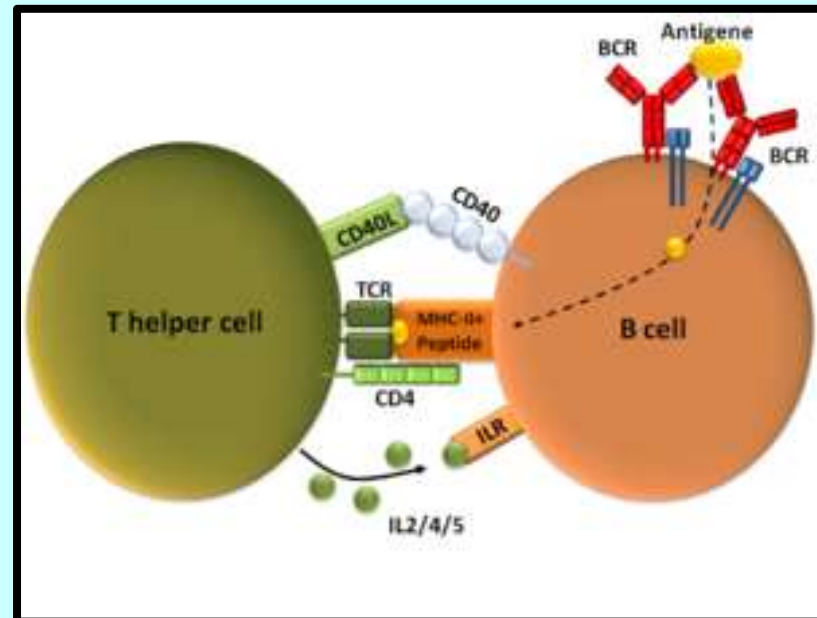
Protein: HUMALBGC NID: g178343 - human. Peak threshold: 0.0

Intensity coverage: 62.5 % (79242 cnts) Sequence coverage MS: 52.3 % Sequence coverage MS/MS: 0.0 % pl: 6.0 MW (kDa): 0.0

10	20	30	40	50	60	70	80
MKWVTFISLL	FLFSSAYSRG	VFRRDAHKSE	VAHRFKDLGE	ENFKALVLIA	FAQYLQQCPF	EDHVKLVNEV	TEFAKTCVAD
90	100	110	120	130	140	150	160
ESAENCCKSL	HTLFGDKLCT	VATLRETYGE	MADCCAQKEP	ERNECFLOHK	DDNPNLRLV	RPEVDVMCTA	FHDNEETFLK
170	180	190	200	210	220	230	240
KYLVEIARRH	PYFYAPELLE	FAKRYKAAFT	ECCQAADKAA	CLLPKLDELRL	DEGKASSAKQ	RLKCASLQKF	GERAFKAWAV
250	260	270	280	290	300	310	320
ARLSQRFPKA	EFAEVSKLVT	DLTRVHTECC	HGDLLECADD	RADLAKYICE	NQDSISSKLL	ECCEKPLEK	SHCIAEVEND
330	340	350	360	370	380	390	400
EMPADLPSLA	ADFVESKDVC	KNYAEAKDVF	LGMFLYEYAR	RHPDYSVLL	LRLAKTYETT	LEKCCAAADP	HECYAKVFDE
410	420	430	440	450	460	470	480
FKPLVEEPQN	LIKQNCLEFE	QLGEYKFNNA	LLVRYTKKVP	QVSTPTLVEV	SRNLGKVGSK	CCKHPEAKRM	PCAEYLSVV
490	500	510	520	530	540	550	560
LNQLCVLHEK	TPVSDRVTKC	CTESLVNRRP	CFSALEVDET	YVPKEFNAET	FTFHADICTL	SEKERQIKKQ	TALVELVKHK
570	580	590	600	610			
PKATKEQLKA	VMDDFAAFVE	KCKKADDKET	CFAEPTMRI	RERK			

Protilátky jako základní detekční a identifikační nástroj

- Slouží ke studiu výsledků translace
- Vznikají jako reakce organismu na antigen



Oblast antigenu rozeznávaná protilátkou se označuje jako epitop

Epitopy

Lineární

- Váží se na ně protilátky bez ohledu na konformaci
- Rozpoznávají např. denaturované proteiny



Konformační

- Váží se na ně protilátky v závislosti na způsobu poskládání polypeptidového řetězce
- Protilátky specifické pro konformační epitopy budou reagovat pouze s proteiny o přirozené konformaci

Typy protilátek

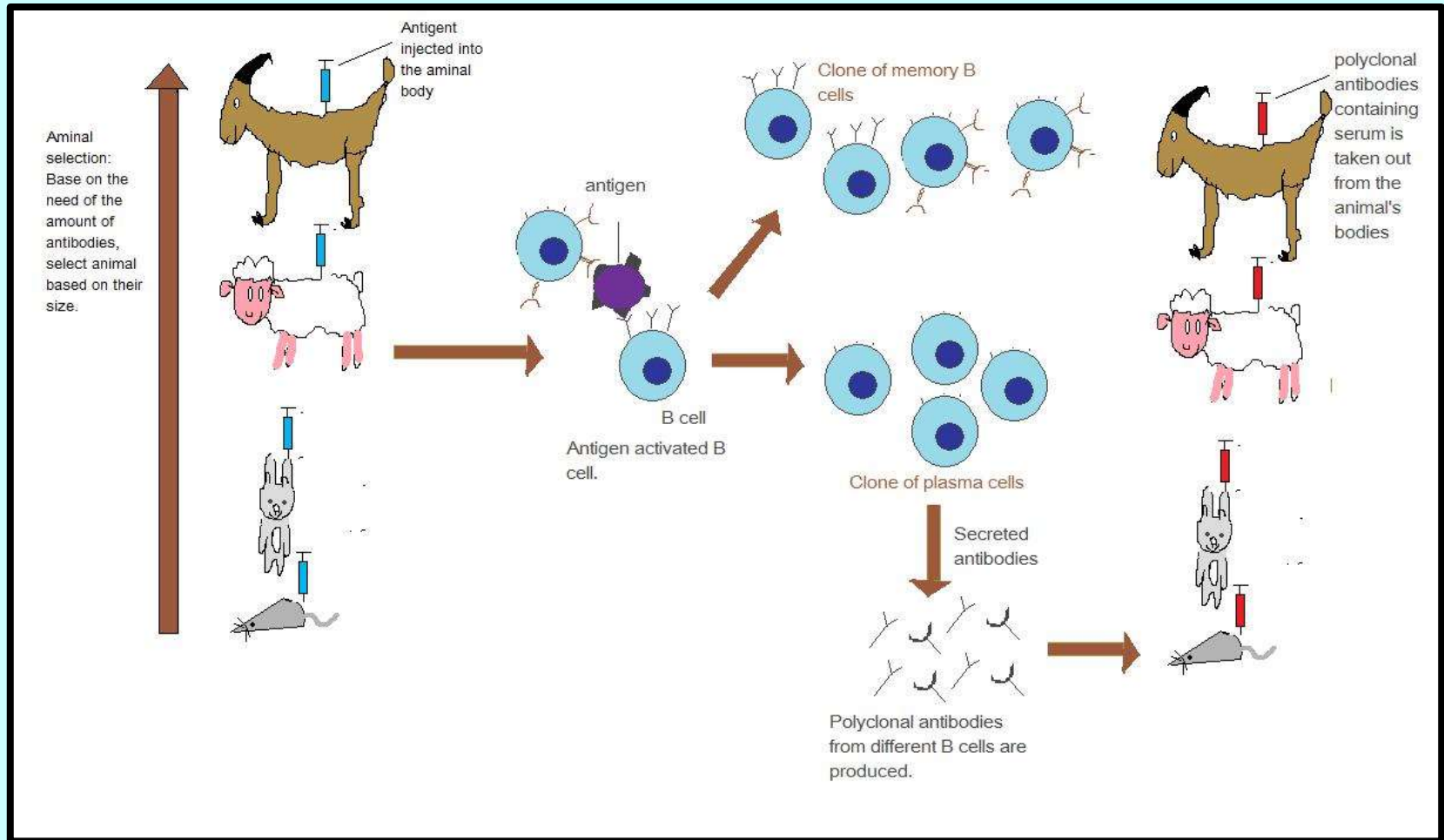
Polyklonální

- Heterogenní směs více protilátek získaných imunizací zvířete (králíka)
- Jsou produktem různých klonů B-lymfocytů

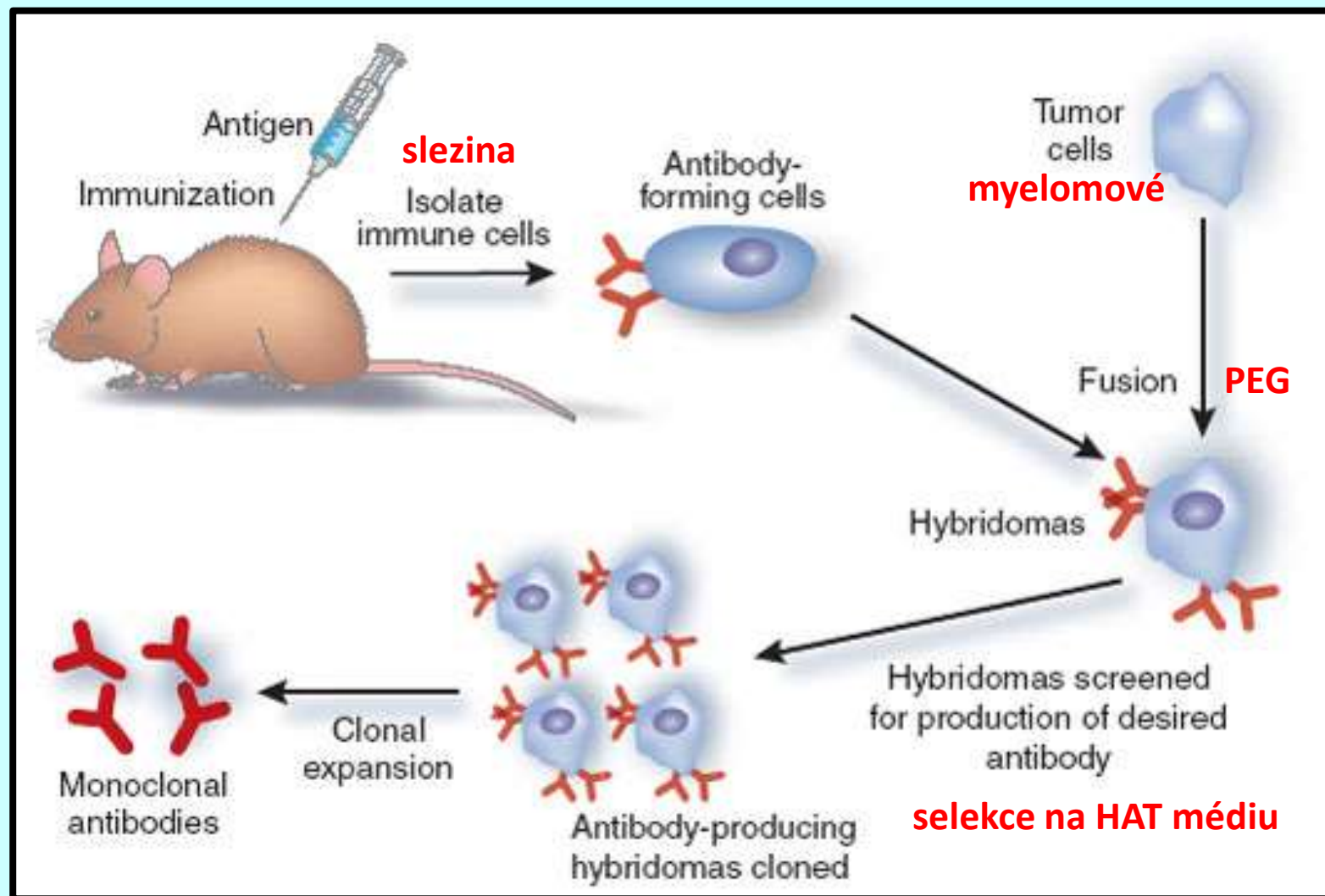
Monoklonální

- Jediný druh molekul imunoglobulinu produkovaný jediným klonem B-lymfocytů
- Nelze je produkovat přímo v těle zvířat
- Produkují se v buňkách tzv. hybridomů

Příprava polyklonálních protilátek



Příprava monoklonálních protilátek



Selekce na HAT médiu

Hybridní buňky rostou na selekčním HAT médiu

- Obsahuje hypoxantin, ametopterin, tymin
- Vyžaduje buňky s funkční hypoxantin-guanin fosforibozyltransferázou (HGPRT⁺)



➤ Myelomové buňky nerostou, protože

jsou HGPRT⁻

➤ Lymfocyty nerostou, protože

v kultuře neproliferují



Výhody monoklonálních protilátek

- **Antigen pro imunizaci nemusí být zcela čistý, vždy však získáme klon produkující žádanou protilátku**
- **Metoda je šetrná pro pokusná zvířata**
- **Zamražené hybridomy mají neomezenou životnost, přípravu není třeba opakovat**

Příprava MP metodami genového inženýrství

- **Kódující sekvence imunoglobulinu se naklonuje do expresního vektoru**
- **Hostitelskou buňkou je savčí buňka**
- **Transfektanti se chovají jako hybridomy**

Western blotting

Imunoblotting

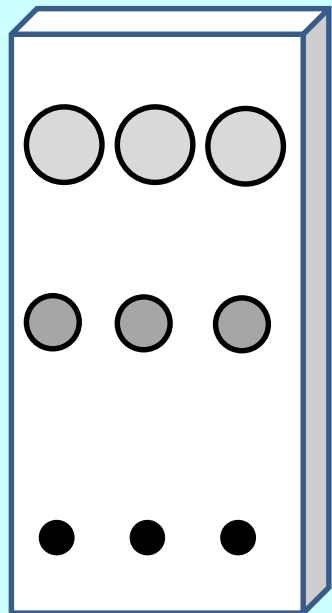
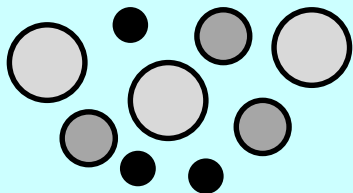
- **Identifikace polypeptidů protilátkami po rozdělení na denaturačním PAGE (alkalický pufr = proteiny získají negativní náboj)**
- **Rozpoznání neprobíhá v gelu, ale po přenesení polypeptidů na membránu jako u Southernova přenosu**

Postup při western blottingu

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

Postup při western blottingu - grafika

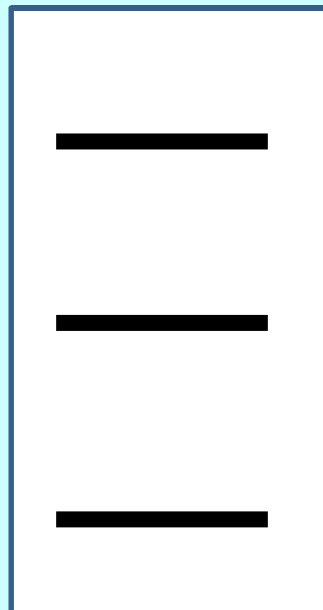
směs proteinů



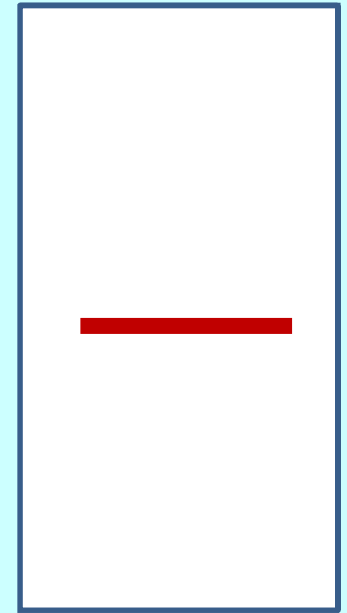
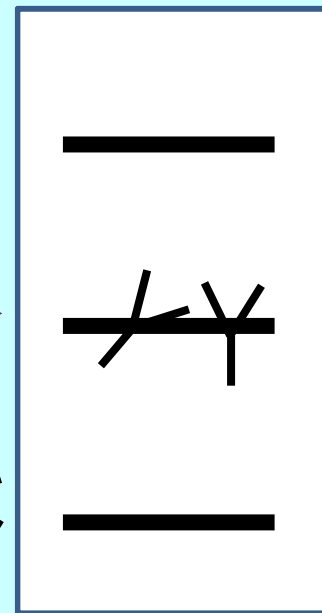
SDS-PAGE

přenos na filtr

přenesené
proteiny



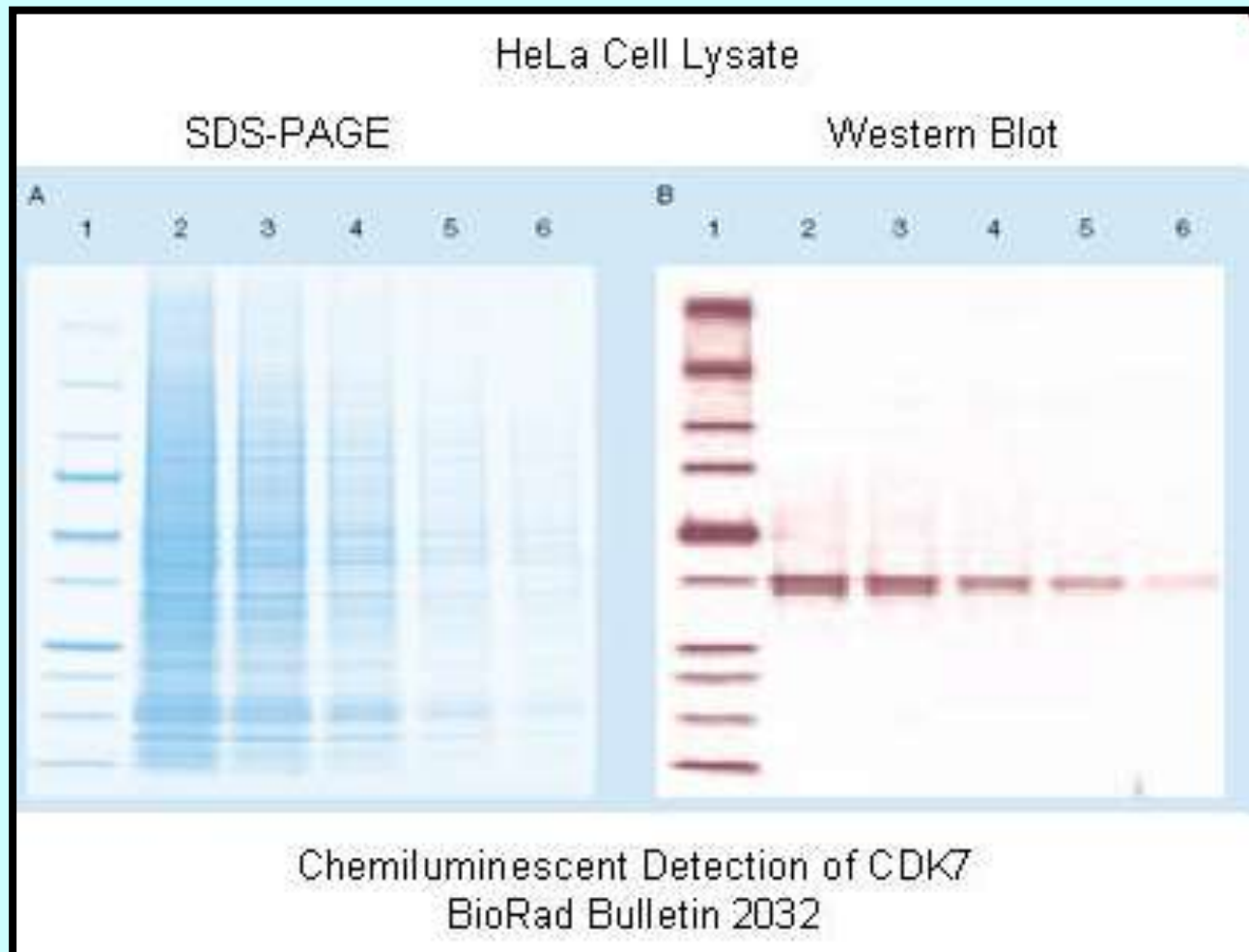
navázání
protilátky



inkubace filtru
v roztoku protilátky
specifické pro
studovaný protein

detekce navázané
protilátky
autoradiografií nebo
barvením

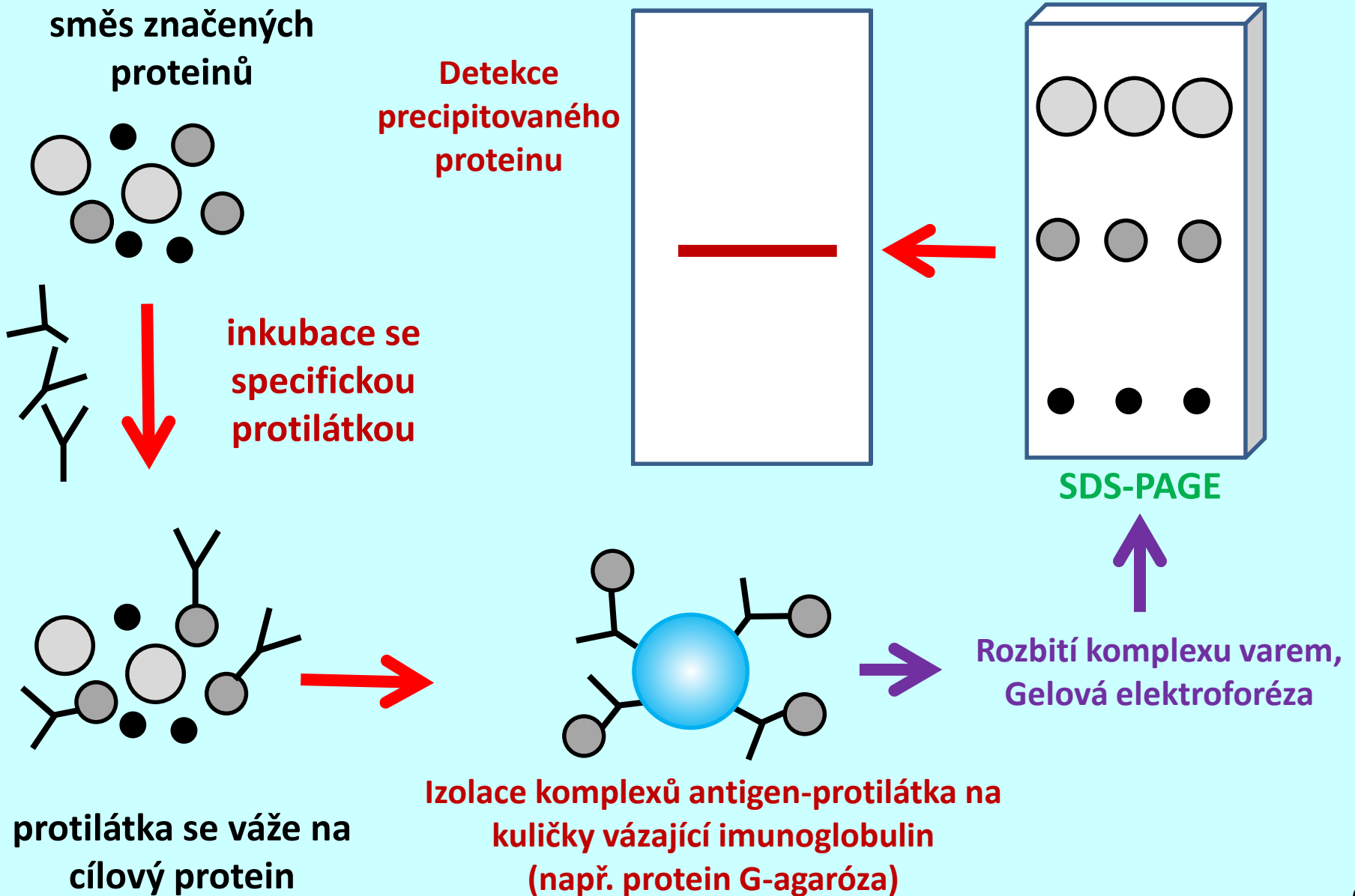
Výsledek imunoblottingu



Imunoprecipitace

- **Slouží k izolaci specifických proteinů z proteinových směsí prostřednictvím protilátek**
- **Používá se ke studiu interakcí mezi proteiny**

Postup imunoprecipitace



Studium interakcí mezi proteiny

- **Cílový protein se precipituje z buněčných extraktů za takových podmínek, které neničí vazby mezi proteiny - proto se cílový protein sráží v komplexu s přirozenými partnery**
- **Po oddělení vysrážených proteinů od ostatních složek buněčného extraktu se provede denaturace purifikovaných komplexů, SDS-PAGE a analýza společně srážených proteinů pomocí western-blottingu**

Imunocytochemie a imunohistochemie

- **Imunocytochemie slouží k analýze buněk**
- **Imunohistochemie k analýze tkání**
- **Obě metody jsou zaměřeny na určení buněk, ve kterých je lokalizován určitý protein jako produkt translace**

Oproti hybridizaci *in situ*

- **Jednodušší provedení**
- **Riziko falešných artefaktů nižší**
- **Určí lokalizaci proteinu, která je velmi specifická (a může naznačit funkci) - oproti mRNA, které jsou většinou v blízkosti jádra**

Imunocyto a histochemie v mikrobiologii

- **Identifikace enzymů (nitrogenáza u symbiotických bakterií s kapradinami rodu *Azolla*)**
- **Využití specifických protilátek proti virům, bakteriím, houbám a parazitům pro identifikaci kauzálních agens infekčních chorob**

V jakých případech imuno?

- 1) Identifikace mikroorganismů, které lze nesnadno určit rutinním nebo specifickým barvením**
- 2) Identifikace mikroorganismů přítomných v malém počtu jedinců**
- 3) Identifikace špatně barvitelných mikroorganismů**
- 4) Identifikace mikroorganismů špatně rostoucích nebo nekultivovatelných**
- 5) Identifikace mikroorganismů s atypickou morfologií**

Příklady stanovení I

Viry

- **HSV1 a HSV2**
- **Virus Kaposiho sarkomu**
- **Cytomegalovirus**
- **EB virus**
- **Adenoviry**
- **Parvovirus B19**

Bakterie

- ***Helicobacter pylori***
- ***Mycobacterium***
- ***Bartonella***
- ***Streptococcus***
- ***Staphylococcus aureus***
- ***Clostridium***

Příklady stanovení II

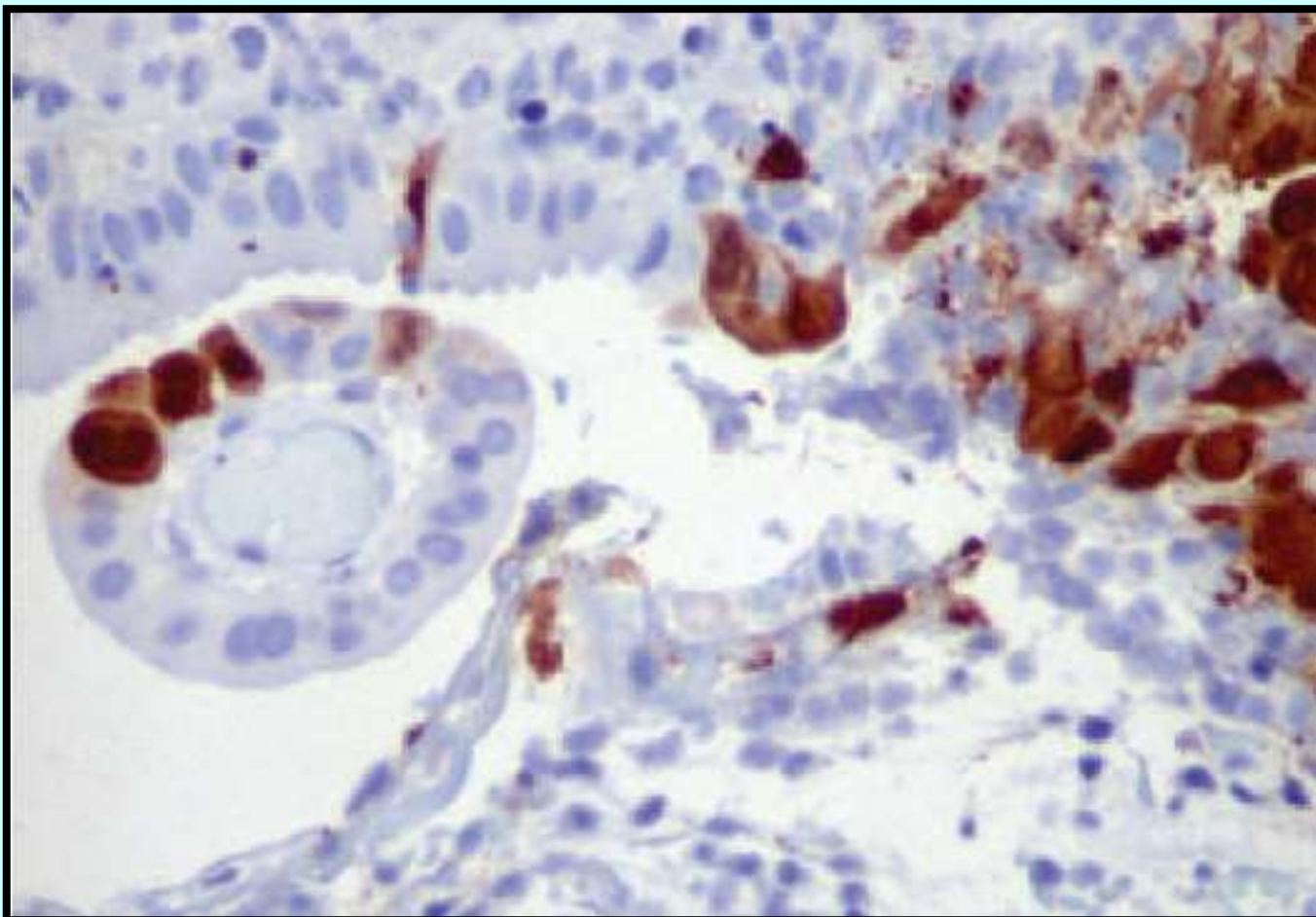
Houby

- ***Candida***
- ***Aspergillus***
- ***Fusarium***
- ***Pneumocystis carinii***
- ***Penicillium***
- ***Cryptococcus***

Prvoci

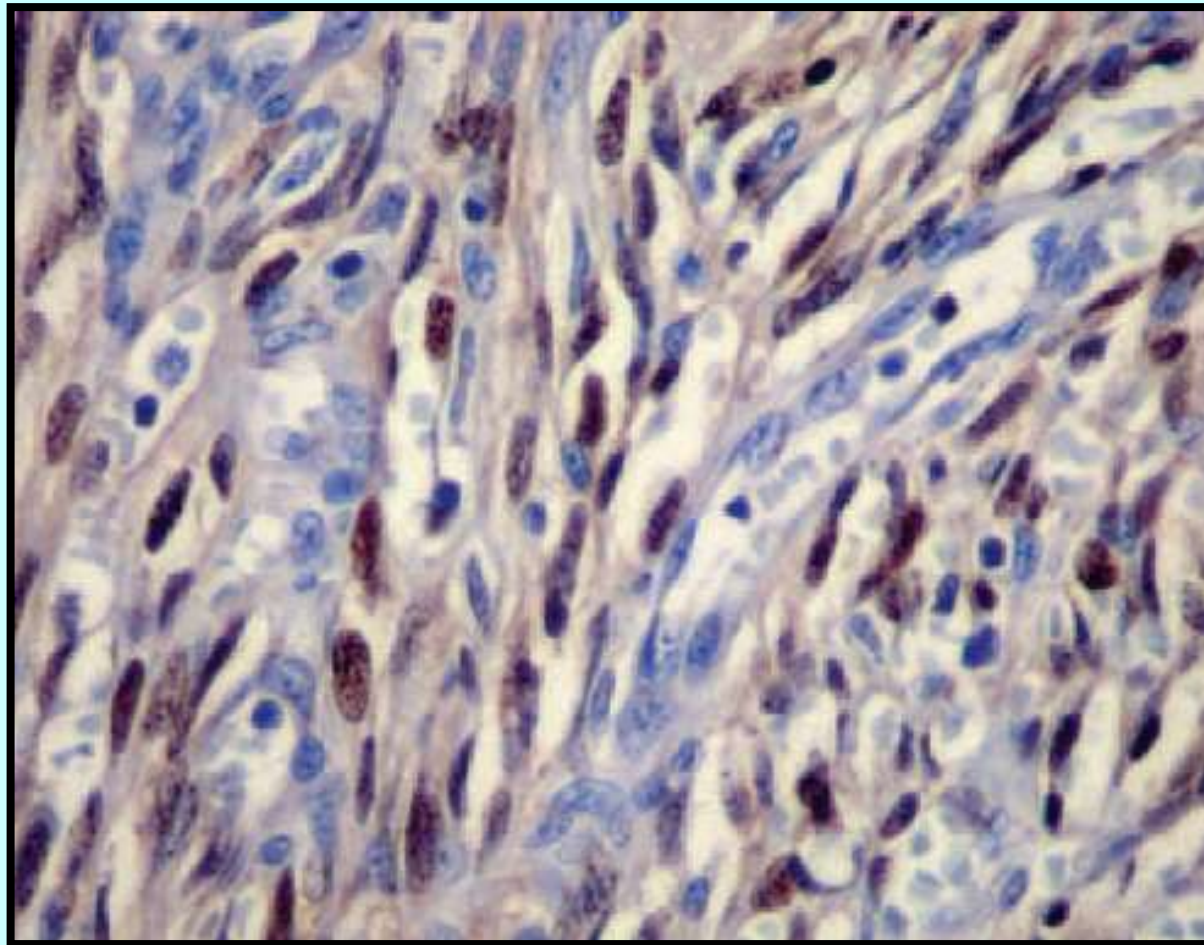
- ***Leishmania***
- ***Toxoplasma***
- ***Trypanosoma***

Příklad I



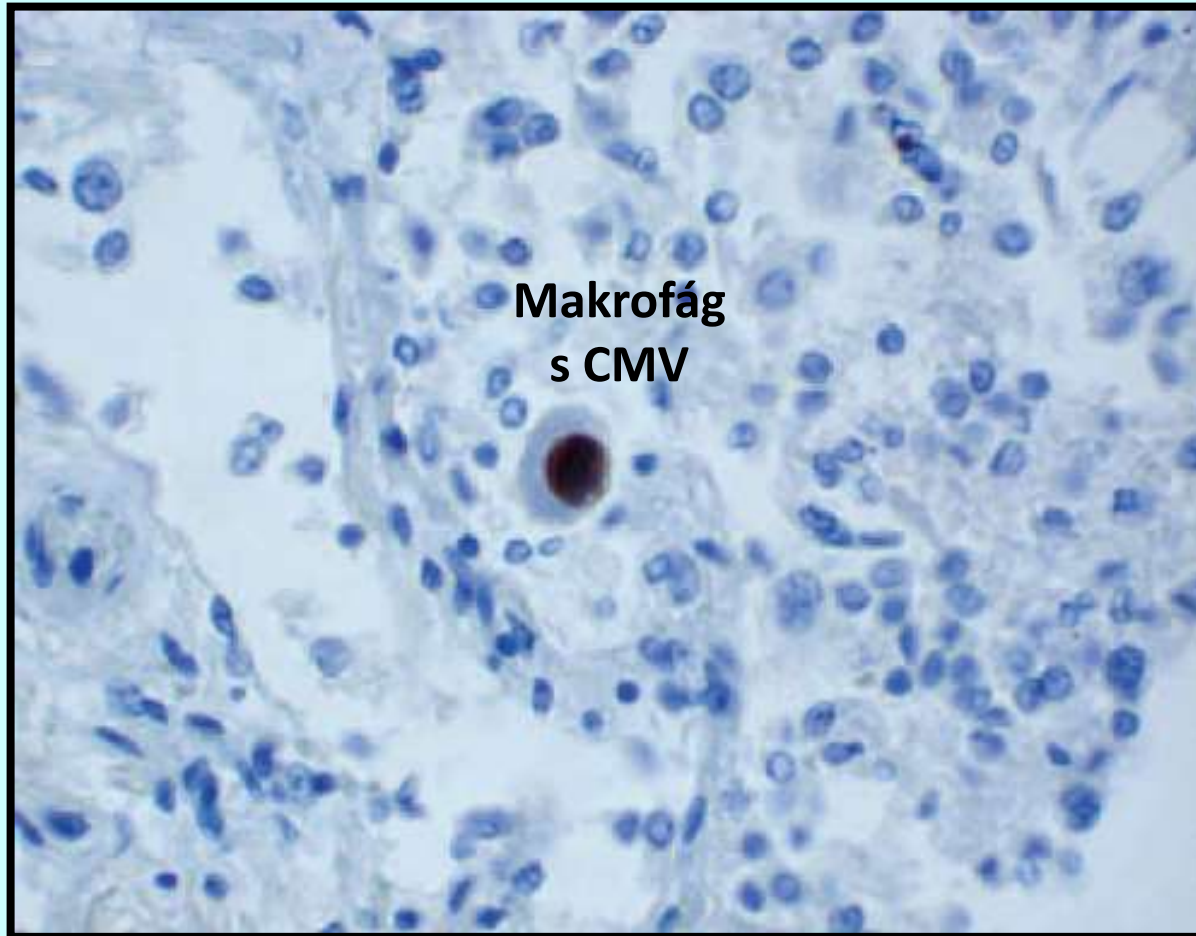
**Cervikální biopsie pacienta s HSV, barveno
diaminobenzidinem na pozadí hematoxylinu**

Příklad II



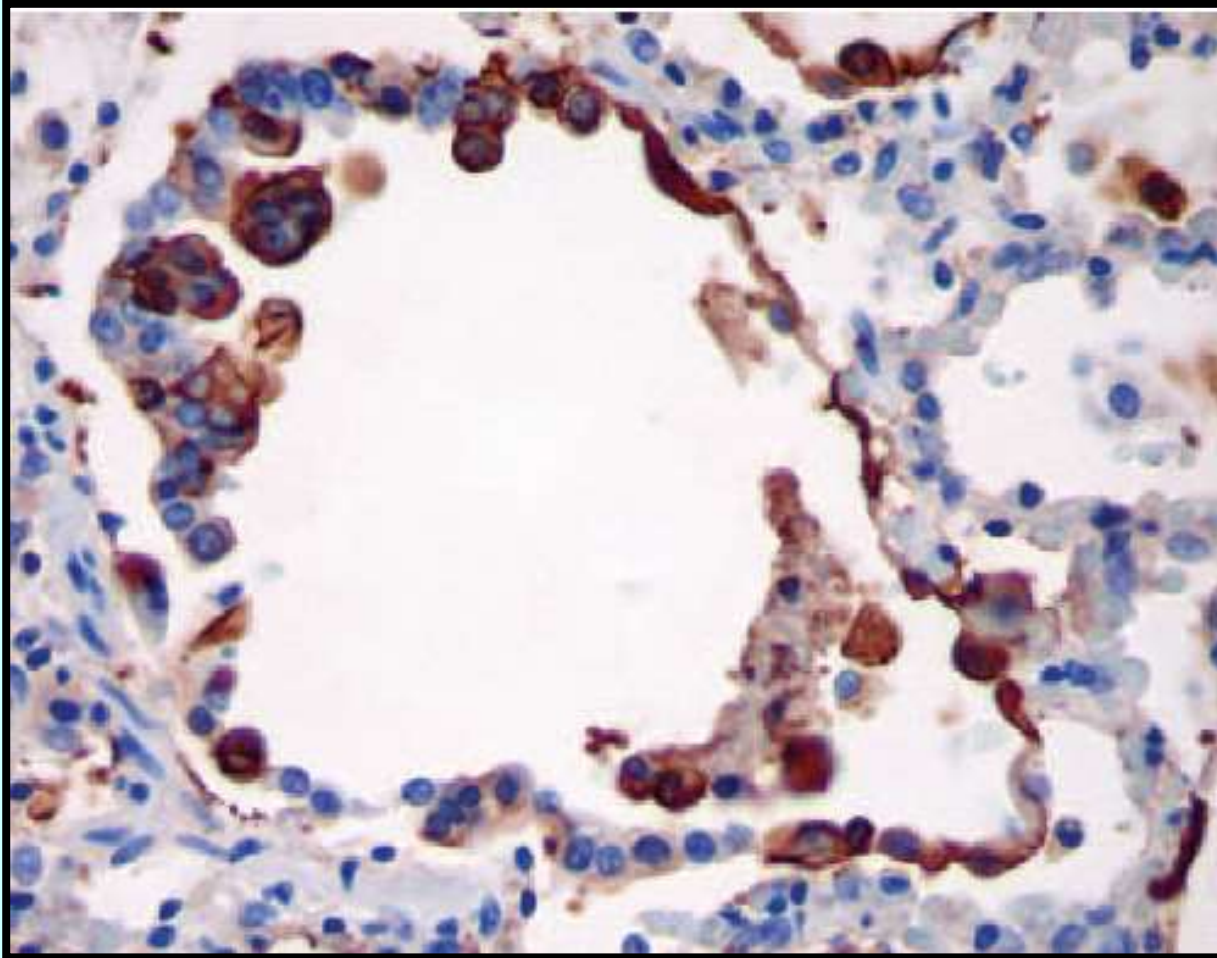
Lymfatická uzlina pacienta s Kaposiho sarkomem, lidský herpesvirus 8, barveno diaminobenzidinem na pozadí hematoxylinu

Příklad III



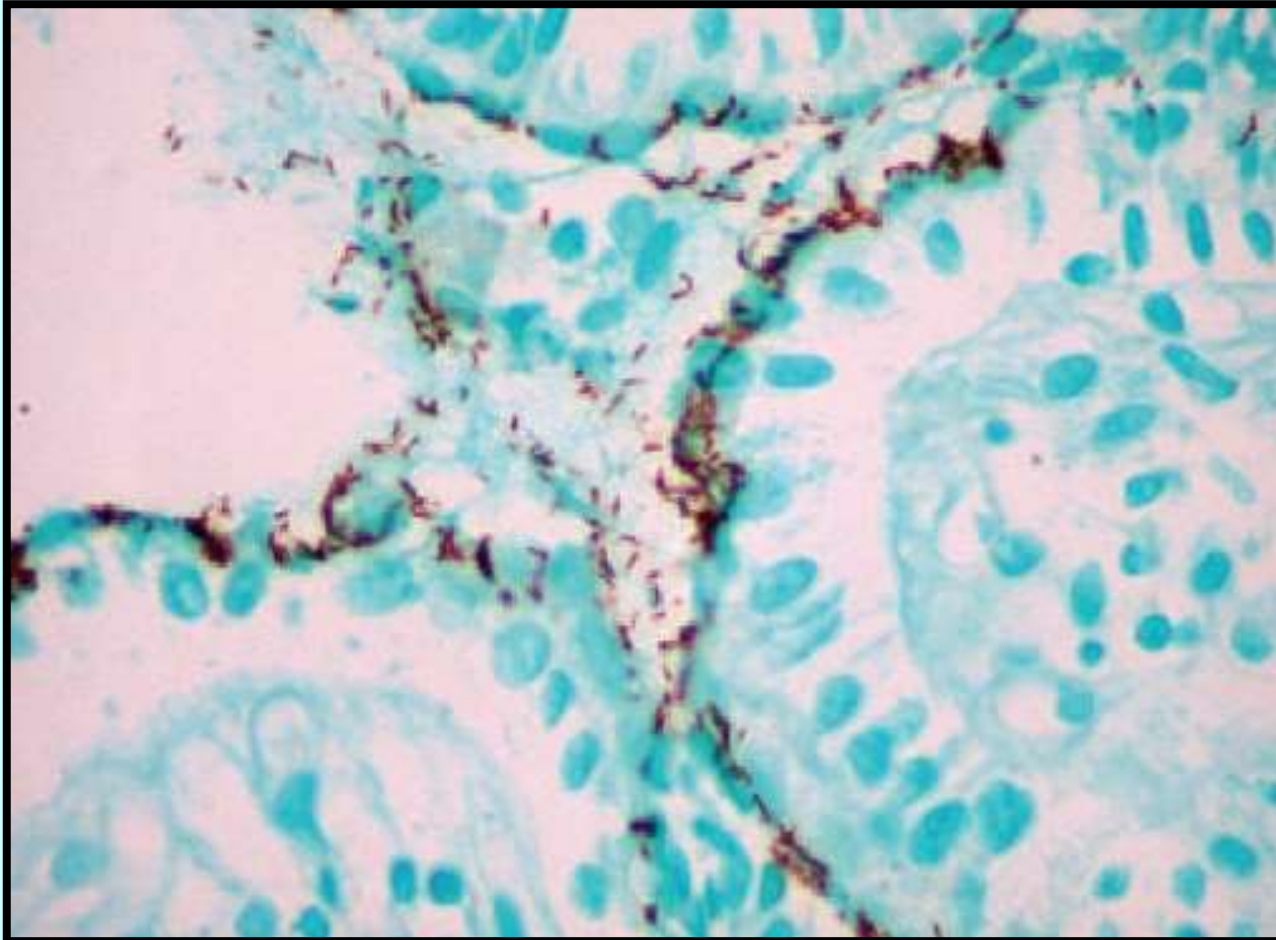
**CMV u imunohandicapovaného pacienta, barveno
diaminobenzidinem na pozadí hematoxylinu**

Příklad IV



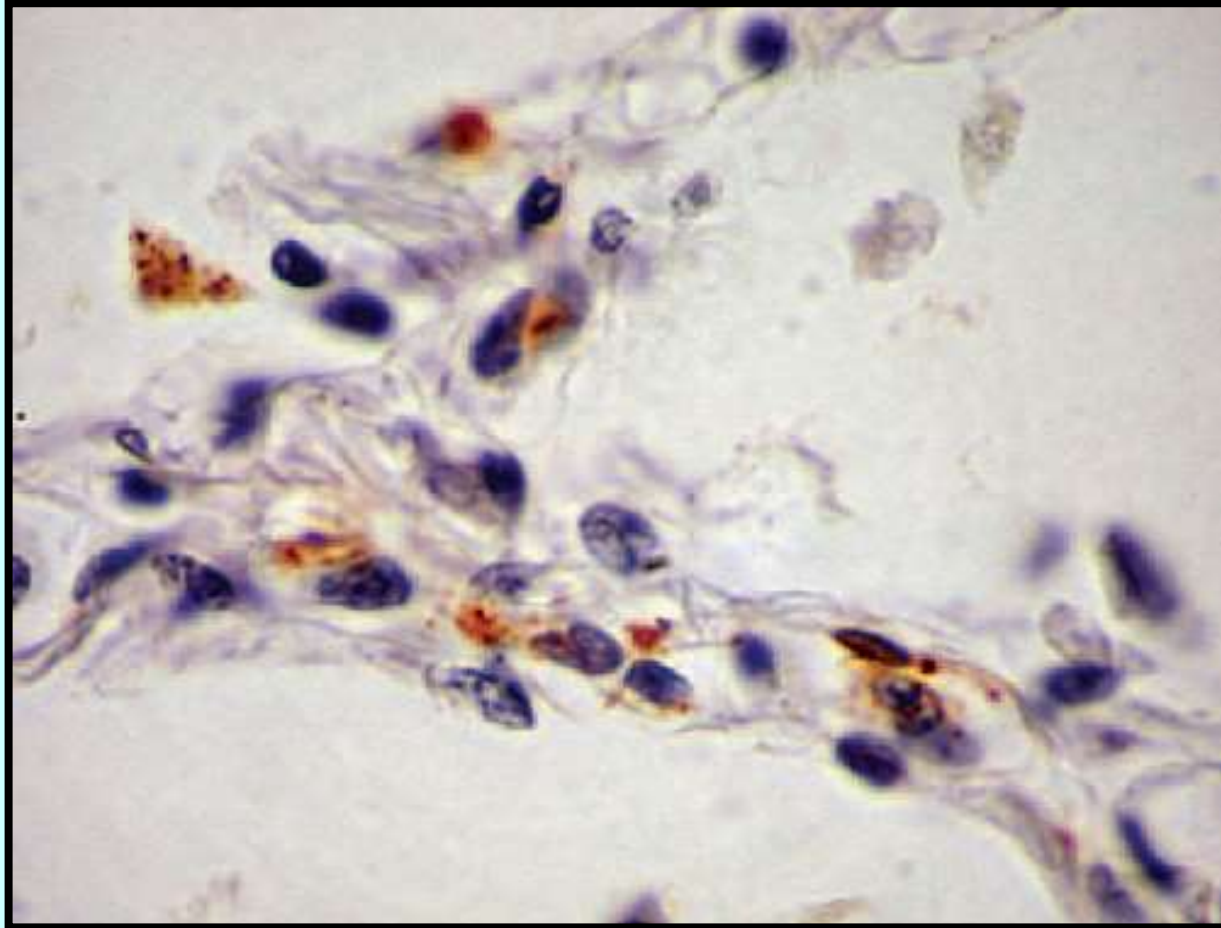
Respiračně-syncytiální virus v odlupujících se buňkách průdušek, barveno diaminobenzidinem na pozadí hematoxylinu

Příklad V



***Helicobacter pylori* v povrchové žaludeční sliznici,
barveno diaminobenzidinem na pozadí hematoxylinu**

Příklad VI



***Rickettsia rickettsii* ve vaskulárním endotheliu plic, barveno aminoethyl karbazolem na pozadí hematoxylinu**

Více příkladů najdete v

Eduardo Eyzaguirre, MD; Abida K. Haque, MD
**(2008): Application of Immunohistochemistry
to Infections, Arch Pathol Lab Med—Vol 132, pp.
424-431.**

Průtoková cytometrie

Metoda umožňující komplexní studium určitých parametrů v buněčných populacích

- **Poskytuje informace o jednotlivých buňkách, resp. jejich molekulách**
- **NIKOLIV o buněčné populaci jako celku!**
- **Počty analyzovaných jednotlivých buněk kolem 10 000 → statistické zhodnocení**

Princip průtokové cytometrie

- **Sledování míry fluorescence jednotlivých buněk v populaci**
- **Míra fluorescence odpovídá sledovanému parametru**
- **Buňky nejsou při procesu poškozeny ani kontaminovány!**

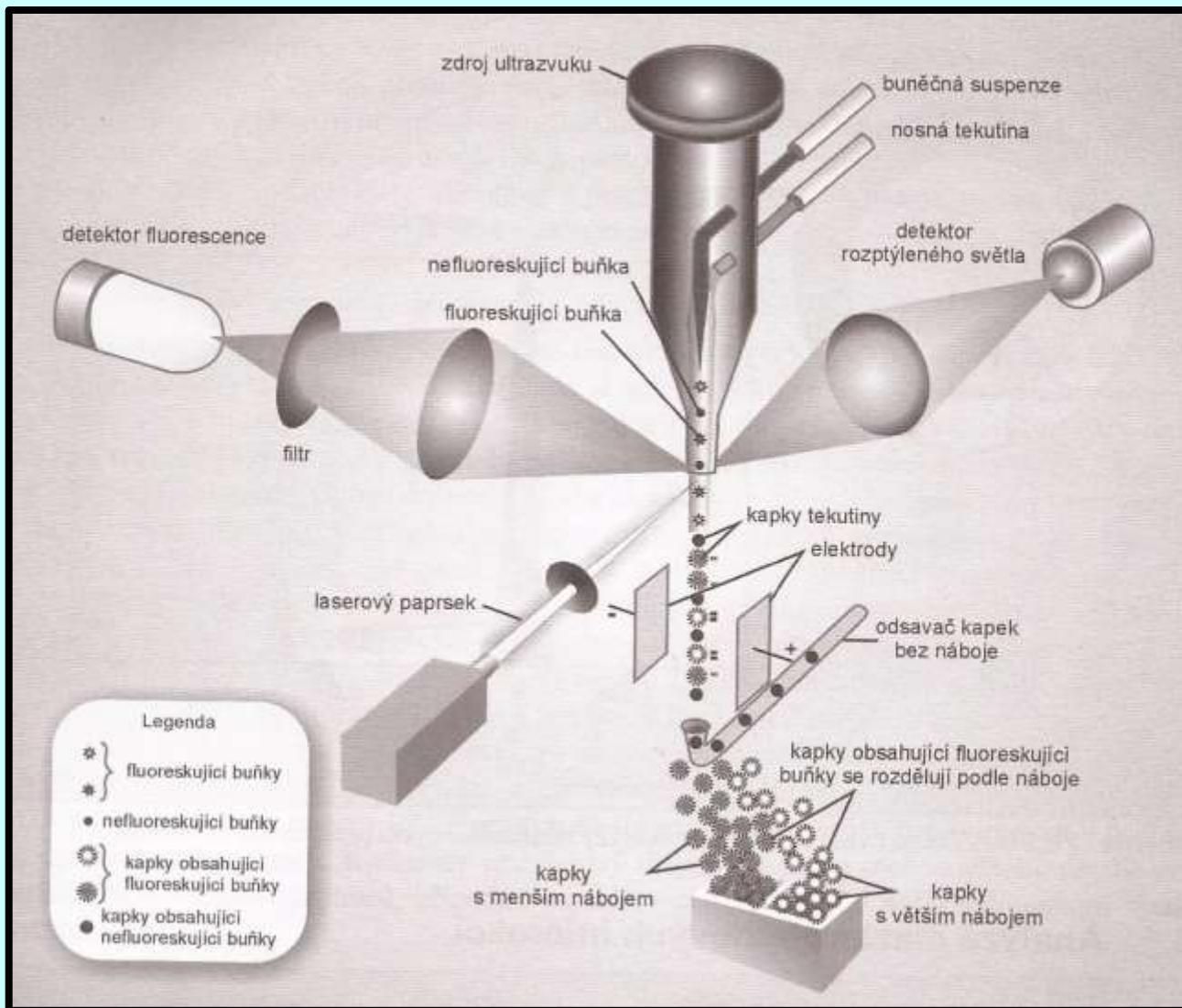
Co lze studovat průtokovou cytometrií

- **Míra přítomnosti určitých antigenů v jednotlivých buňkách a její závislost na čase**
- **Studium obsahu DNA, která odpovídá fázi buněčného cyklu nebo apoptóze**
- **Stanovení velikosti buněk, studium karyotypu, stupně granulace cytoplasmy (buněčné typy)**
- **FRAKCIONACE buněk pomocí frakcionačního zařízení**

Postup při průtokové cytometrii

- Opatření sledované molekuly fluorescenční značkou (propidium jodid pro mrtvé, Hoechst 33324 pro živé, protilátky konjugované s fluorescenční značkou)
- Buněčná suspenze se v trysce cytometru ultrazvukem rozdělí na malé kapičky – v každé jen jedna buňka
- Kapičky procházejí detektorem s laserem – zachytí se signál z fluorescenční látky
- Pro frakcionaci se kapička opatří elektrickým nábojem podle intenzity fluorescenčního signálu
- Elektrickým polem lze kapičky izolovat

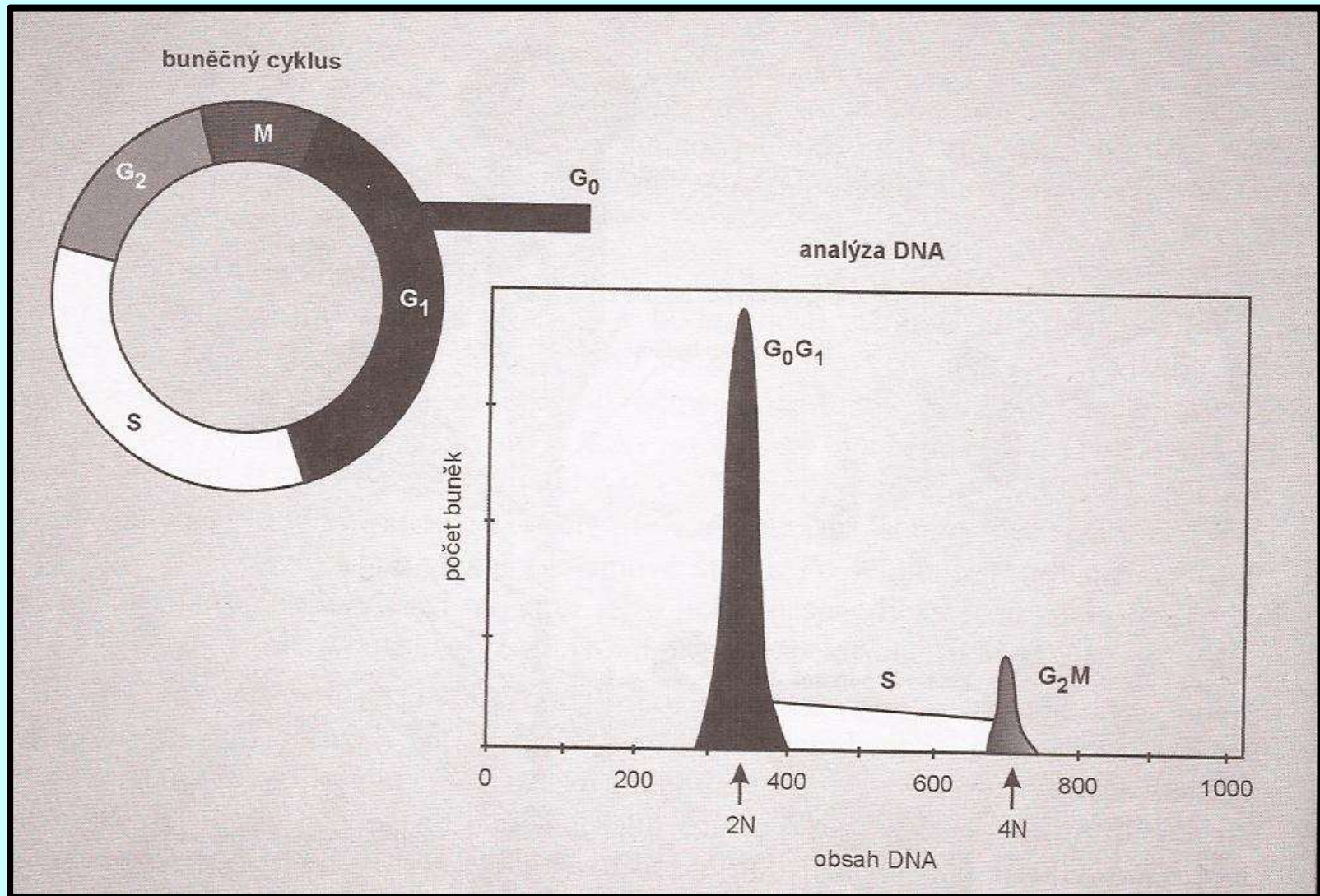
Průtokový cytometr



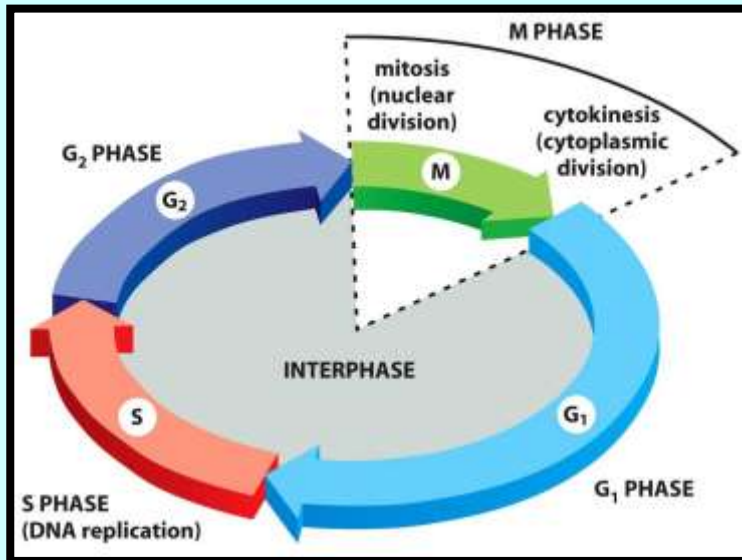
Průtokový cytometr - foto



Analýza buněčného cyklu



Zopakujme si buněčný cyklus



**G₁ = fáze před replikací,
obsah 2N**

G₂/M = obsah DNA 4N

S = obsah DNA?

**S = intermediární = fáze
replikace = větší než
G₁, ale menší než G₂/M**



Které fáze nelze průtokovou cytometrií rozlišit?

G₂ a M



Proteinové mikročipy

Více v 5. ročníku

Shrnutí

- 1) Separační metody – izoelektrická fokusace, dvourozměrná elektroforéza, chromatografie**
- 2) Plynová chromatografie v mikrobiologii**
- 3) Identifikační metody - hmotnostní spektrometrie, využití protilátek, western blotting, imunoprecipitace, imunocytochemie a imunohistochemie**
- 4) Průtoková cytometrie**