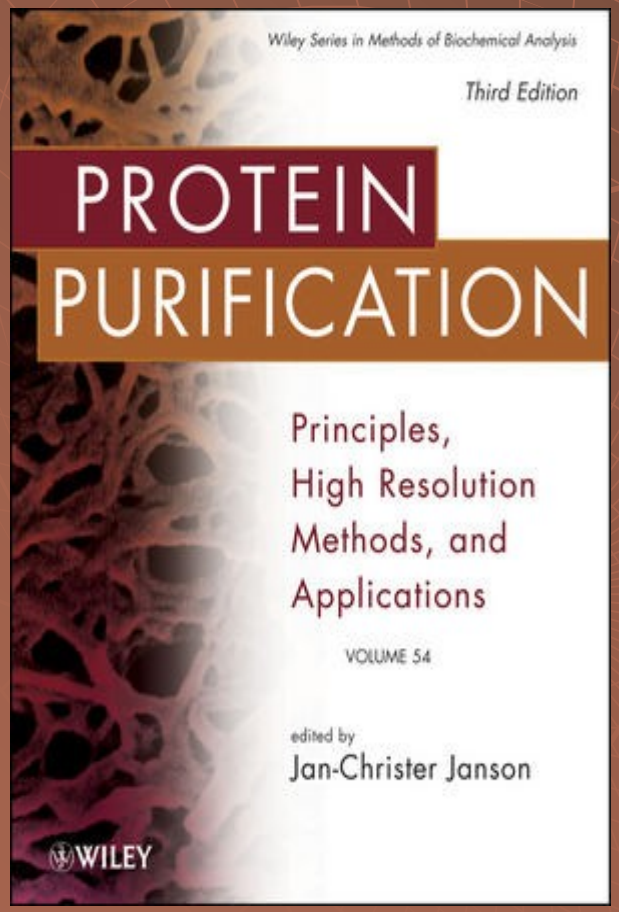
Metody separace proteinů

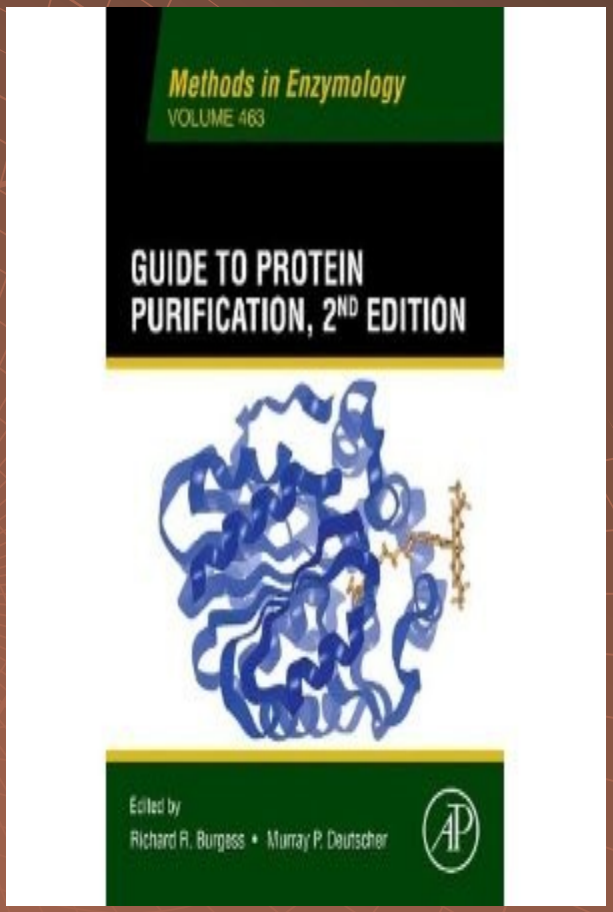
Literatura

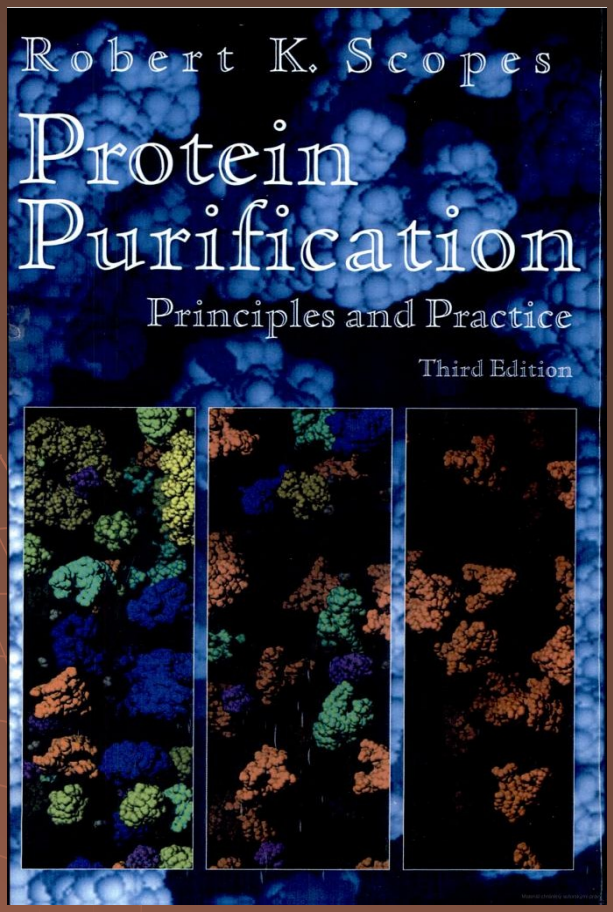
- *Anzenbacher, Kovář* : Metody chemického výzkumu pro biochemiky. *MŠ Praha, 1986.*

- *Ferenčík, Škárka* : Biochemická laboratorní technika. *Alfa Bratislava 1981.*

Literatura


Wiley Series in Methods of Biochemical Analysis
Third Edition
PROTEIN PURIFICATION
Principles, High Resolution Methods, and Applications
VOLUME 54
edited by
Jan-Christer Janson
WILEY


Methods in Enzymology
VOLUME 463
GUIDE TO PROTEIN PURIFICATION, 2ND EDITION
Edited by
Richard R. Burgess • Murray P. Deutscher
AP


Robert K. Scopes
Protein Purification
Principles and Practice
Third Edition

Separace

- Analytické
  - kvalitativní
  - kvantitativní
- Preparativní

Charakterizace – pI, MW, spektra, AMK …

Separační metody

- Vychází z klasických metod chemické analýzy
- Uplatňují se zde i speciální metody

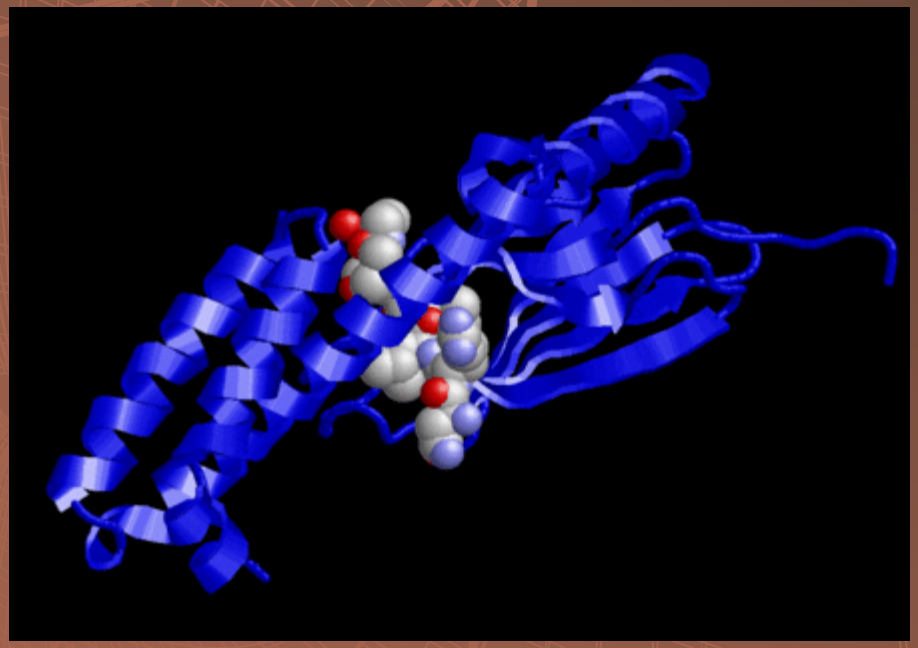
Problémy se vzorkem

- Komplexnost
- Malá množství
- Labilita

Zásady pro práci s biologickým materiálem

1. Teplota
2. pH + iontová síla
3. Koncentrace
4. Pěnění
5. Lokální přebytky
6. Proteasy

Separace bílkovin



Plánování separace

Cíl izolace

- Získání homogenní bílkoviny
- Zachování biologické aktivity
- Čistota

↓

Závěr : získat vzorek o patřičné čistotě s vynaložením patřičného úsilí

Volba vstupního materiálu

- Preparát z daného organismu
- Preparát s největším obsahem dané bílkoviny
- Preparát s nejmenším obsahem nečistot

Volba a kombinace separačních metod

- Selektivita
- Rozlišovací schopnost
- Kapacita
- Zpětný výtěžek
- Náklady – materiál, přístroje, člověk
- Stupeň zřeďování a koncentrace
- Slučitelnost mezi metodami
- Znalosti o dané bílkovině (pI, MW)

Základní zásady

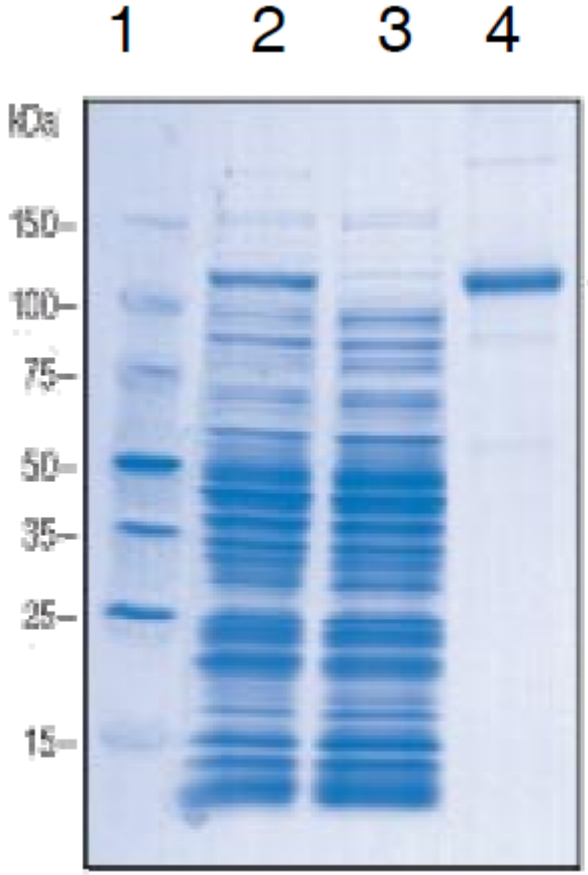
- Na začátek zařadit metody s vysokou kapacitou a malým výtěžkem a rozlišením [redacted]elké množství levného vstupního materiálu
- Později metody s vysokým rozlišením a výtěžkem, kapacita méně významná [redacted]e vzorku již investovaná práce

- Pořadí volit tak, aby metody na sebe vhodně navazovaly
- Metody zřeďovací kombinovat s metodami koncentrujícími
- Metody nepoužívat opakovaně

Sledování průběhu separace

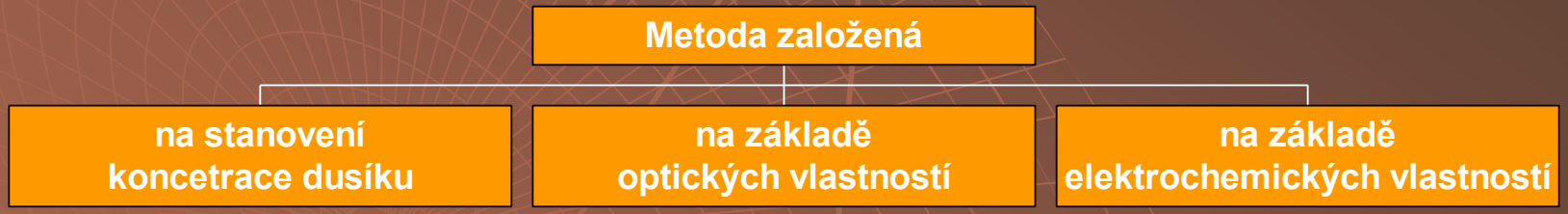
Metoda	Celková bílkovina	Celková aktivita	Specifická aktivita	Přečištění	Výtěžek
extrakt	100	100	1	-	100 %
HIC	50	99	1.99	1.99	99 %
IEX	25	75	3	1.5	75 %

Sledování průběhu separace SDS PAGE



1. Standard
2. Původní vzorek
3. Nenavázané proteiny
4. Eluované proteiny

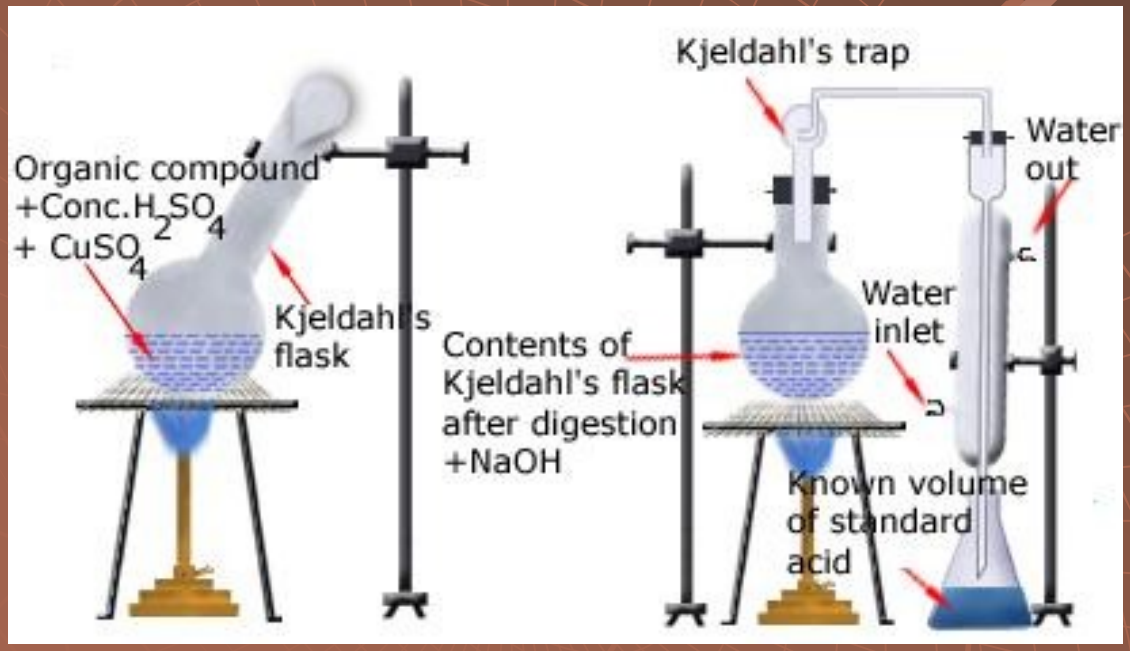
Stanovení koncentrace bílkoviny



Kjeldahlova metoda – stanovení N_2

- Mineralizace vzorku – převedení organického N na NH_4^+
- Stanovení NH_4^+ - titrace, fotometrie, selektivní elektrody

Kjeldahlova metoda – stanovení N_2

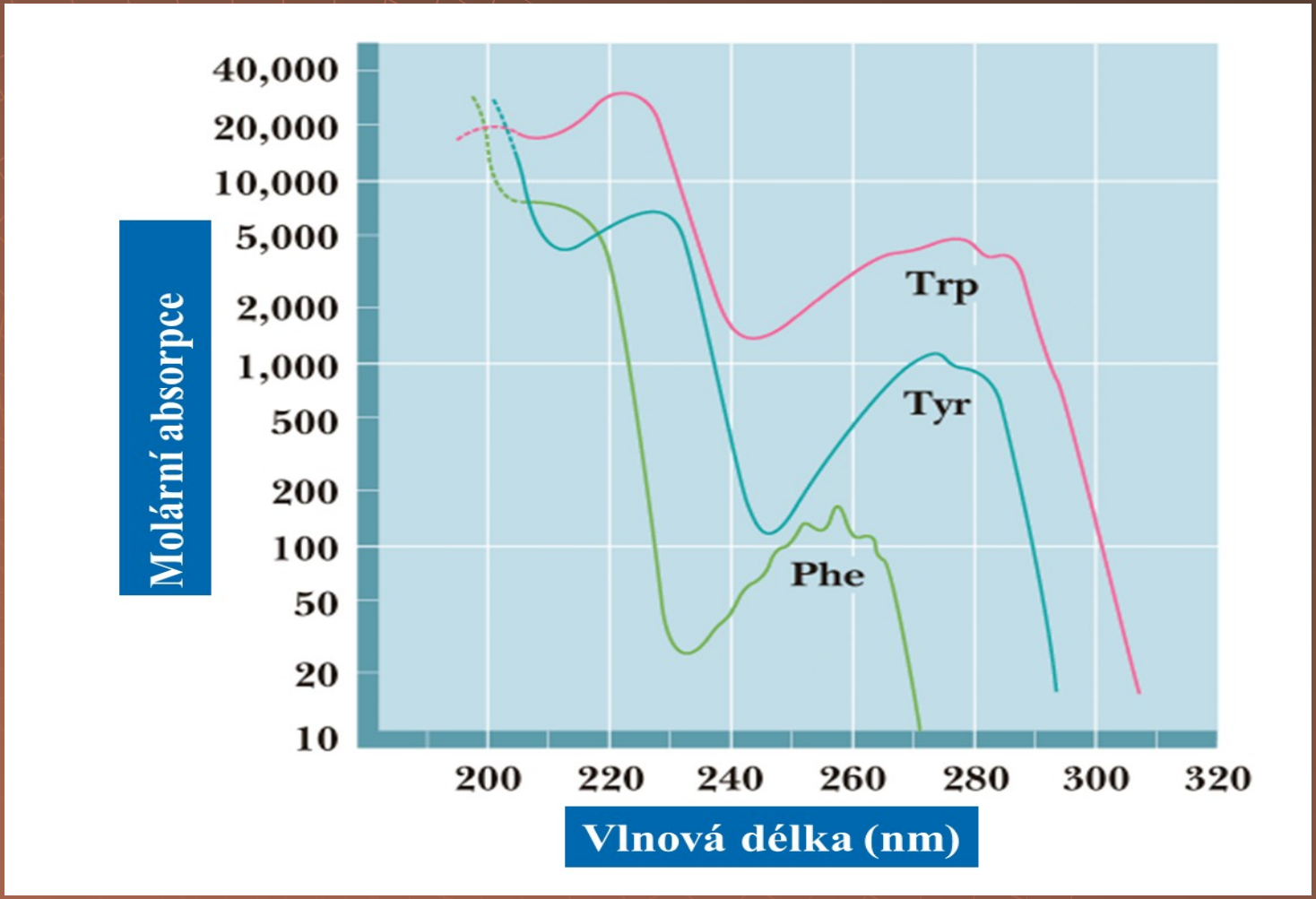


UV spektrofotometrie

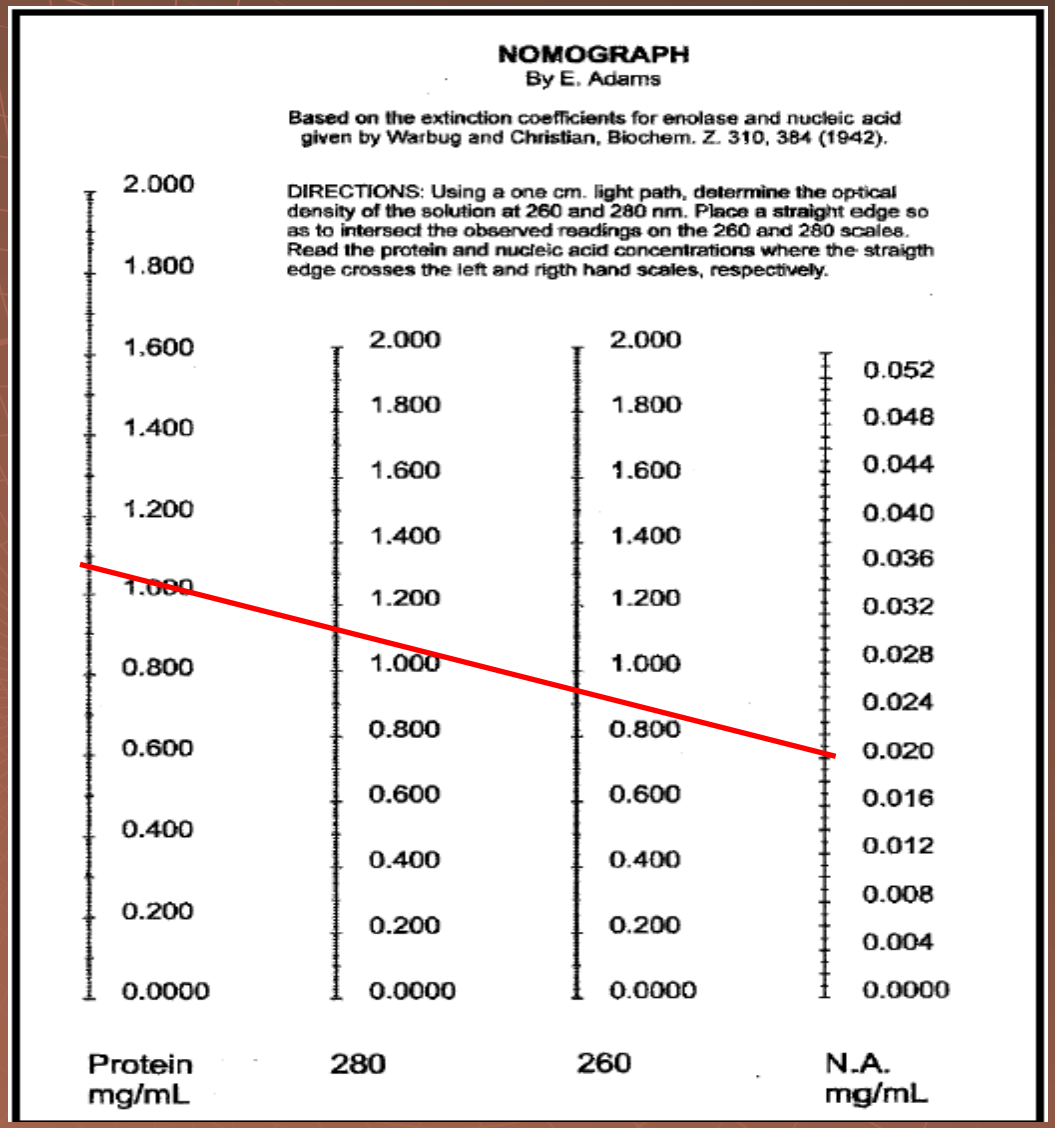
- 280 nm – aromatické AMK
  interference nukleotidů
- 180 - 230 nm – peptidická vazba

Výhody - nedestruktivní metoda
- není třeba kalibrace

UV spektrofotometrie



UV spektrofotometrie



UV spektrofotometrie

Vzorce pro přímé UV stanovení:

c (mg/mL) = 1.55 A280 - 0.76 A260

c (mg/mL) = (A235 - A280)/2.51

c (mg/mL) = (A224 - A233)/5.01

c (mg/mL) = A205 [27 + 120 (A280/A205)]

UV spektrofotometrie

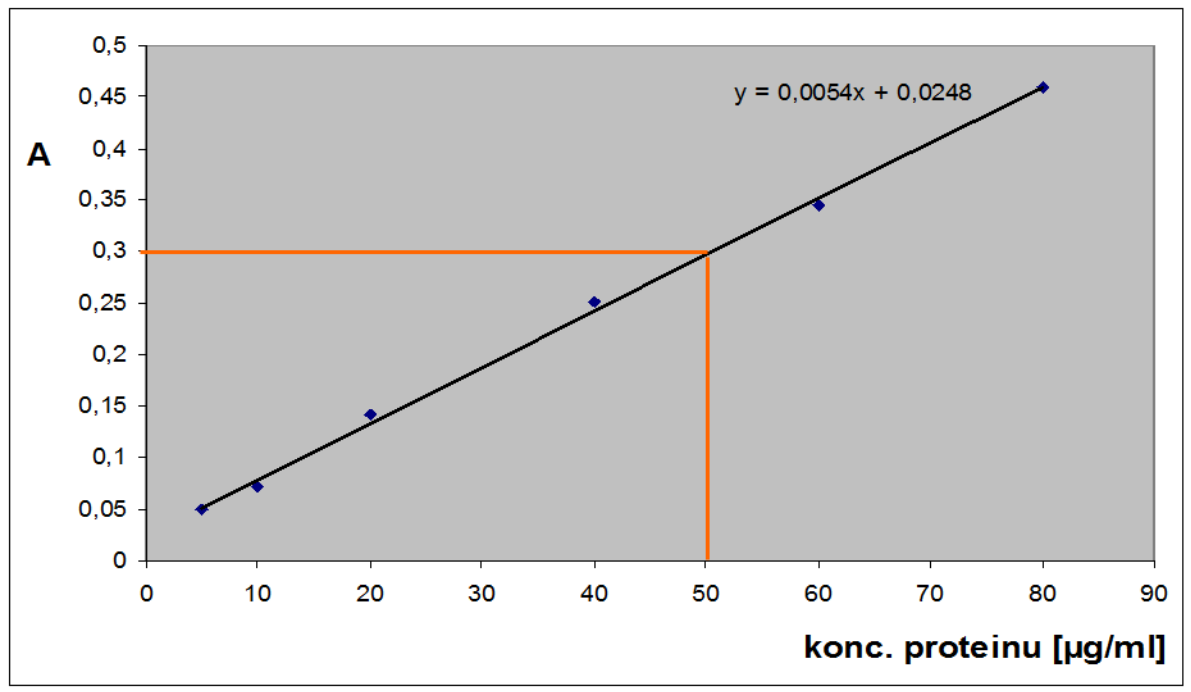
Edelhochova metoda

při znalosti aminokyselinového složení je možné spočíst extinkční koeficient proteinu $\mathbf{e_{280}}$. Podmínkou je přítomnost tryptofanu nebo tyrosinu v molekule.

$$\mathbf{e_{280} = nTrp.5500 + nTyr.1490 + nCys.125\ (M^{-1}.cm^{-1})}$$

VIS spektrofotometrie

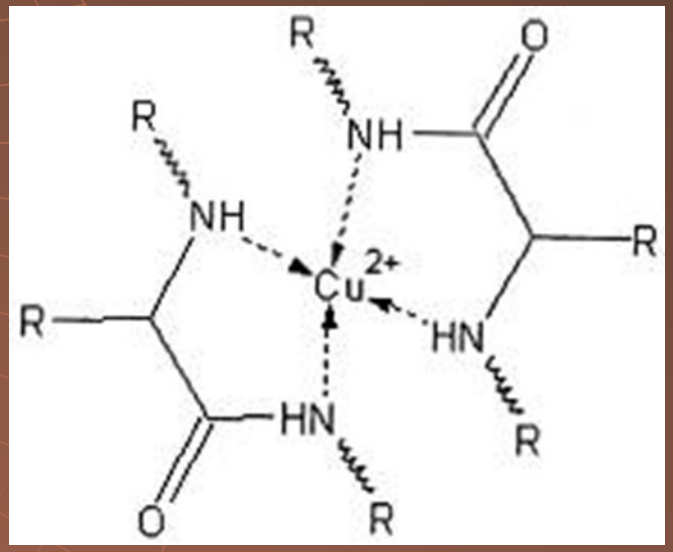
- Přídavek činidla [redacted]arevný derivát
- Destruktivní metoda
- Nutná kalibrační závislost



Biuretová metoda

Princip : Cu^{2+} vytváří v alkalickém prostředí komplex se 4 N peptidické vazby

Cu^{2+}



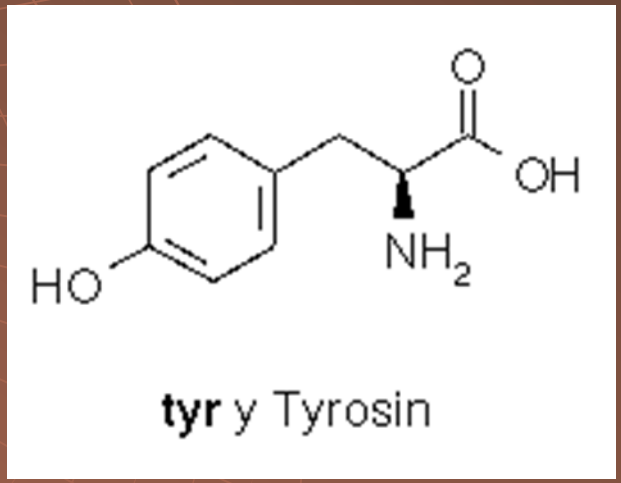
Měření : 540 – 560 nm

310 nm

Folinova metoda

Princip : hydroxyfenolová skupina tyrosinu redukuje fosfomolybdenany (Folin Ciocalteovo reagens) na molybdenovou modř

Měření : 725 nm



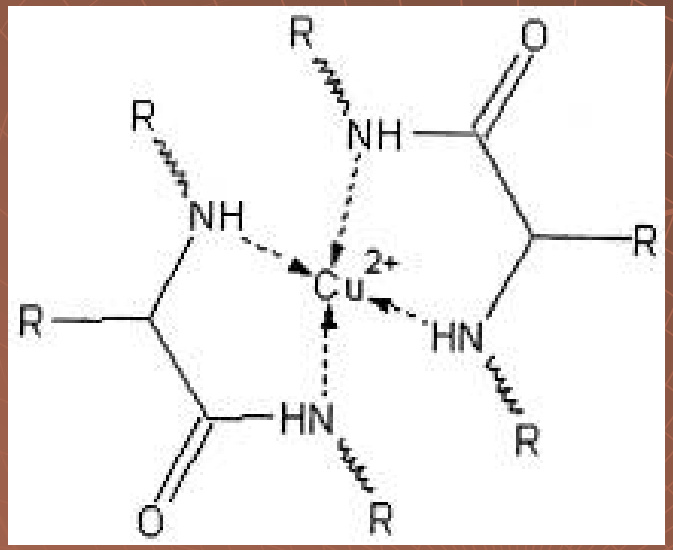
tyr y Tyrosin

Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a Biuretové metody

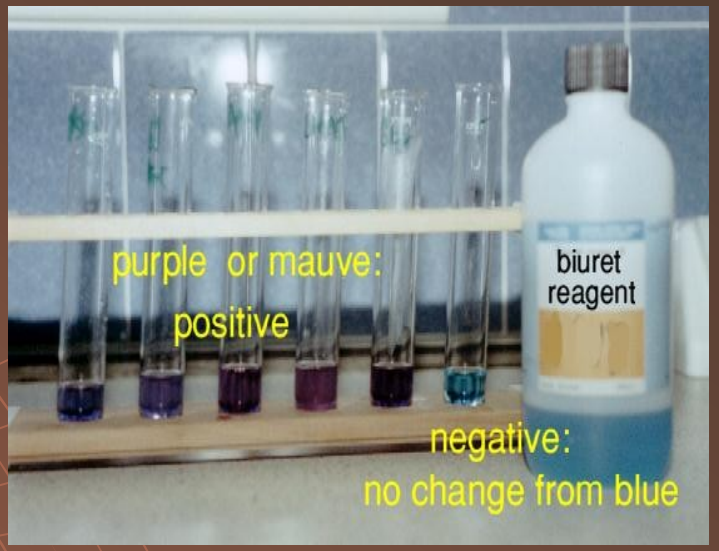
Měření : 600 nm

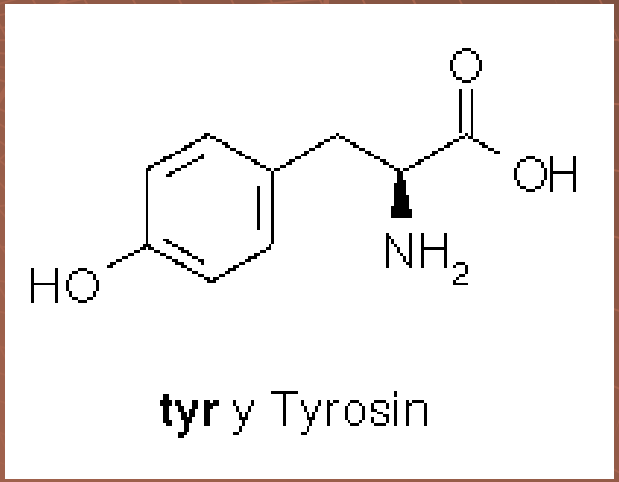
Lowryho metoda



•biuret ↑

•Lowry↓



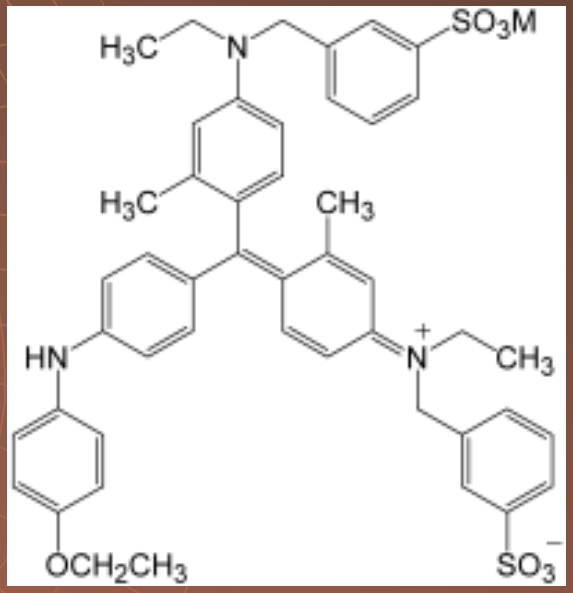


tyr y Tyrosin

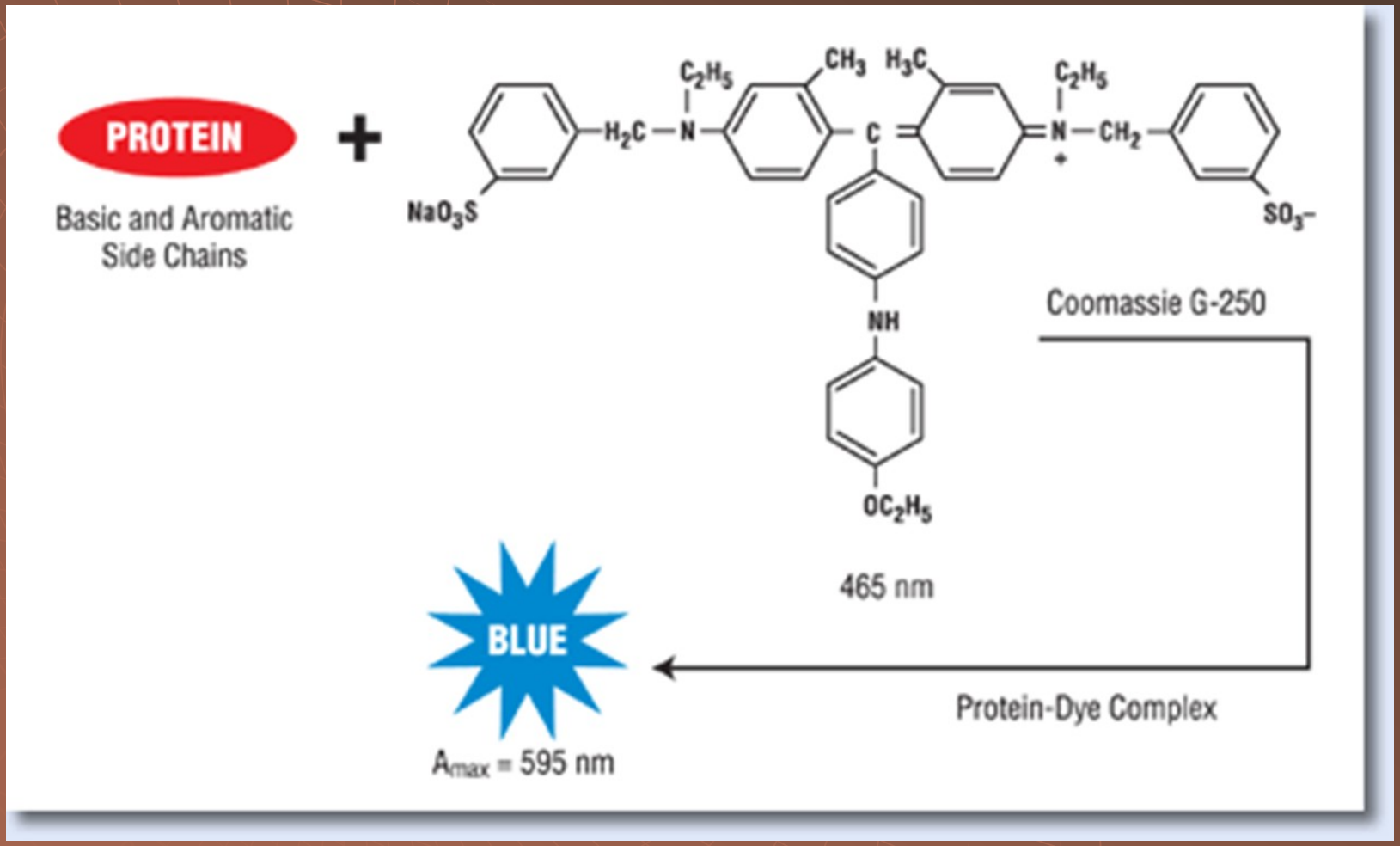
Metoda dle Bradfordové

Princip : při vazbě Coomassie Brilliant Blue G 250 na bílkovinu dochází k posunu absorpčního maxima z 465 na 595 nm.

Meření : 595 nm

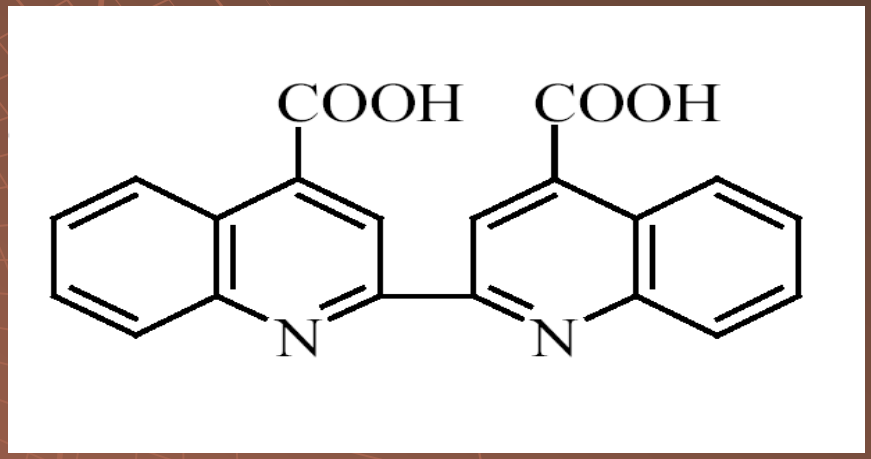


Metoda dle Bradfordové



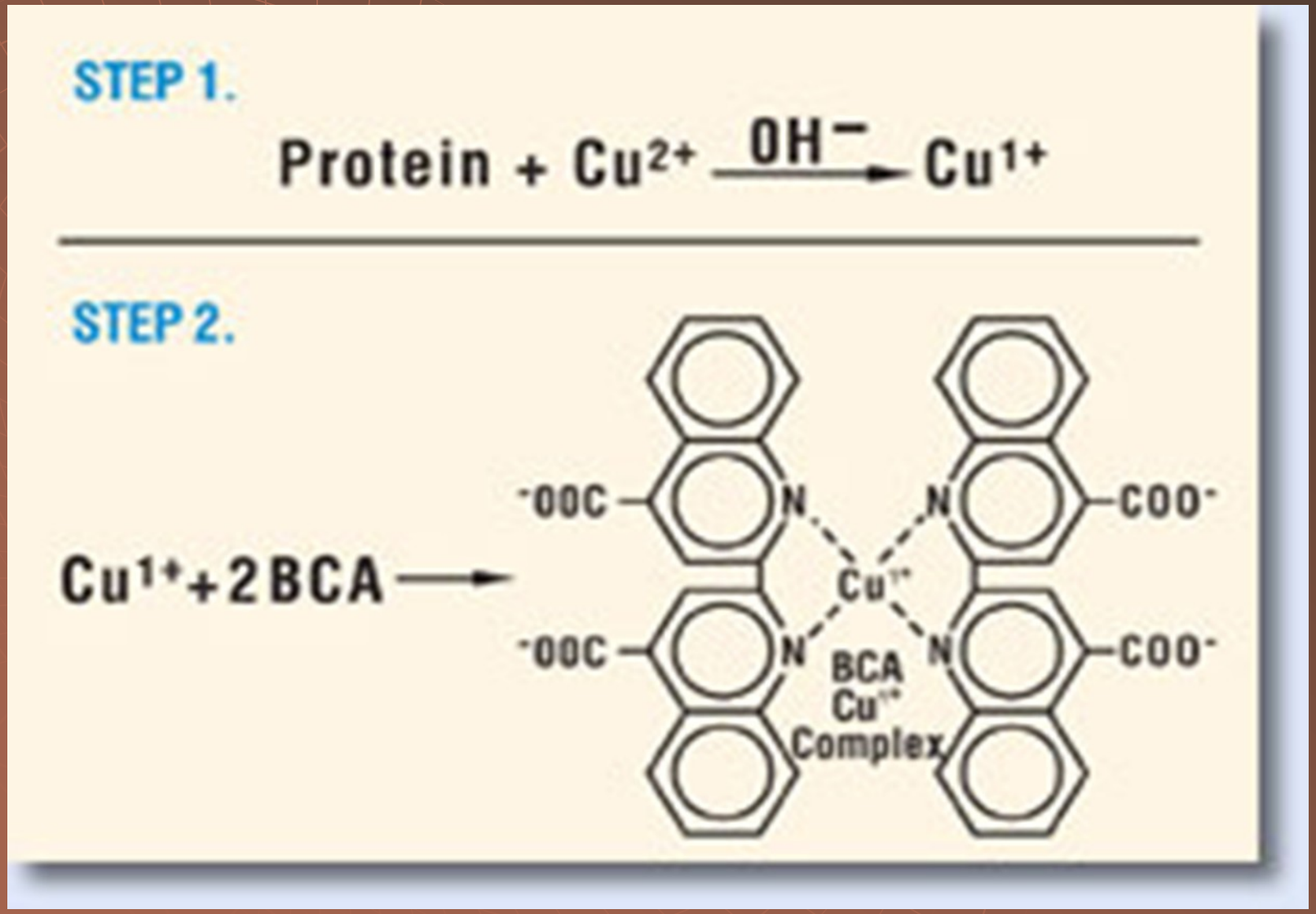
BCA metoda

Princip : Na^+ sůl k. bicinchoninové (BCA), komplexuje Cu^+ tvořené reakcí peptidové vazby s Cu^{2+}



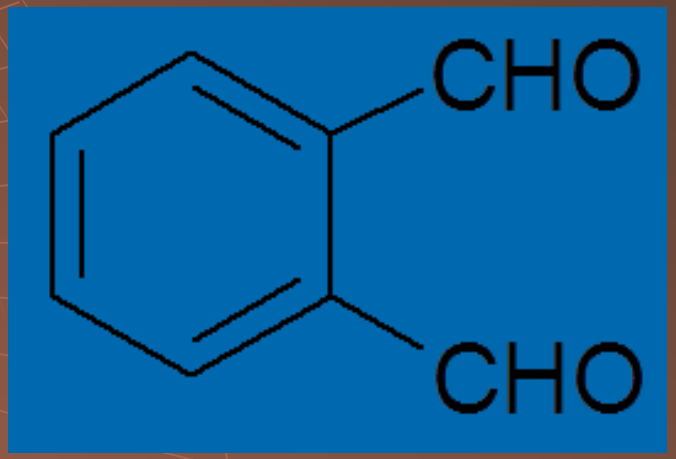
Měření : 562 nm

BCA metoda


STEP 1.
Protein + Cu2+ OH− Cu1+
STEP 2.
Cu1++2BCA
-OOC
N
N
COO-
Cu1+
-OOC
N
N
COO-
BCA
Cu1+
Complex

Fluorescence

Princip : - vazba fluoroforu na bílkovinu měření vzniklé fluorescence (OPA)

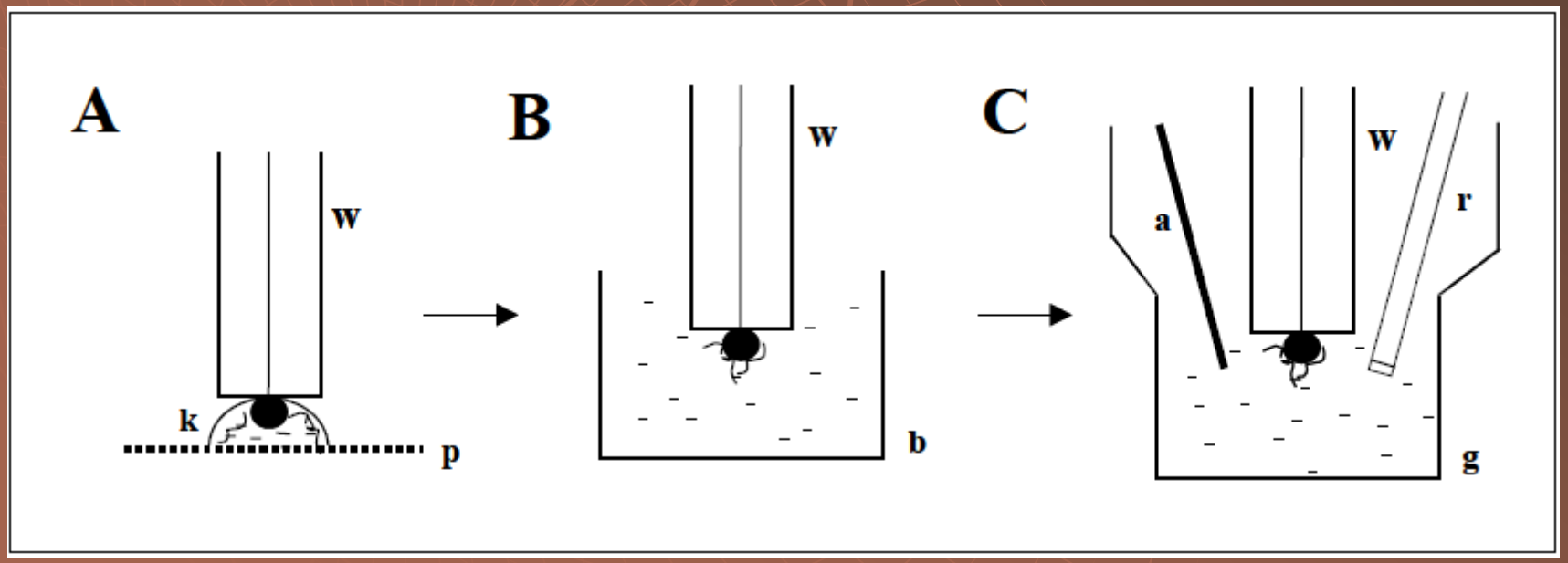


Měření : exc.340 nm
em.440 nm

- zhášení fluorescence přídavkem bílkoviny

Polarografie

Princip : Brdičkova reakce – SH skupiny bílkoviny vstupují v přítomnosti Co^{2+} katalytické reakce na Hg elektrodě [redacted]roud



Nejčastěji používané metody

Metoda	Rozsah (ng)	Poznámka
Biuretová	0.5 - 5	okamžitý vývoj
Lowryho	0.05 - 0.5	pomalý vývoj
UV - 280 nm	0.05 - 2	interference
UV – 205 nm	0.01 - 0.05	interference
Bradfordové	0.01 - 0.05	sorpce barviva

Nejčastěji používané metody

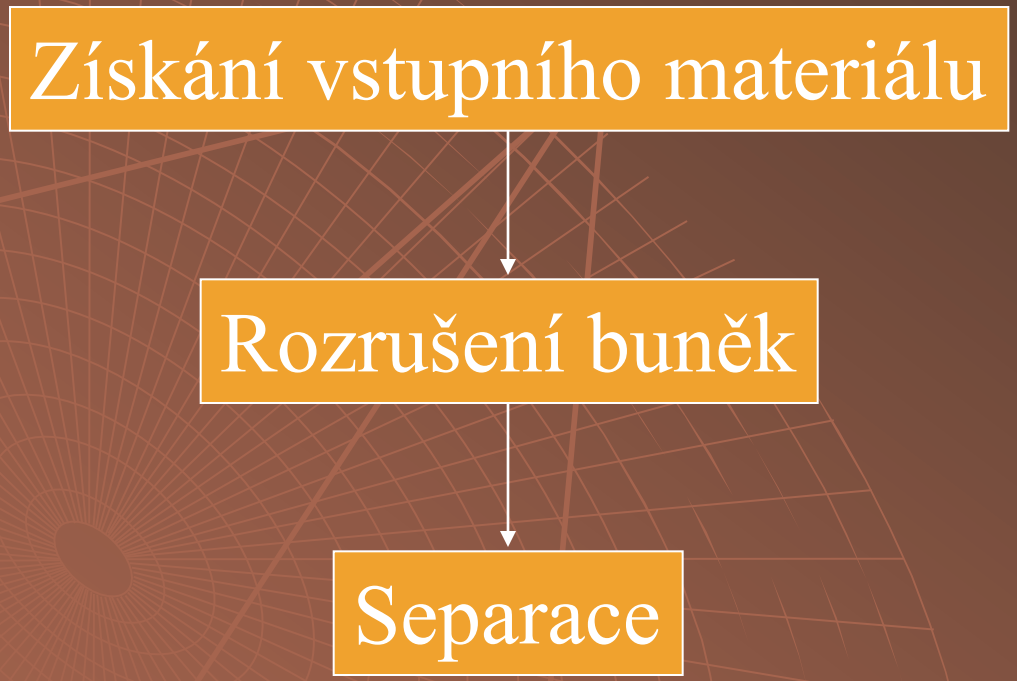
Stanovení	Citlivost	Přesnost	Interference
Biuret	0 – 1 mg	Vysoká, nezávislá na aminokyselinovém složení	Aminoskupiny [*Např.* $(NH_4)_2SO_4$]
Lowry	0 – 0.1 mg	Částečně závislá na aminokyselinovém složení	Kyseliny, chelátory (EDTA), reduktanty (DTT, phenol), $(NH_4)_2SO_4$
Bradford	0 – 0.01 mg	Závislá na aminokyselinovém složení	Detergenty (SDS, Triton X100, mýdlo)
BCA	0 – 0.05 mg	Většinou nezávislá na aminokyselinovém složení	Redukující látky (2-merkaptoethanol, DTT), chelátory (EDTA)

Stanovení biologické aktivity

Enzymatické,imunologické, toxické, hormonální receptorové atd.

Vlastní separace

Obecné schéma



Vstupní materiál

Mikroorganismy

Bakterie, kvasinky, plísně, řasy

Výhody - lze jej snadno získat v dostatečné množství

- selekce mutantů o požadovaných vlastnostech
- genetické inženýrství
- termofilní organismy

Mikroorganismy

•CCM uchovává více než 3 000 kmenů bakterií (asi 1 400 druhů) a 800 kmenů vláknitých hub (přibližně 550 druhů), které nabízí ve svém Katalogu kultur.

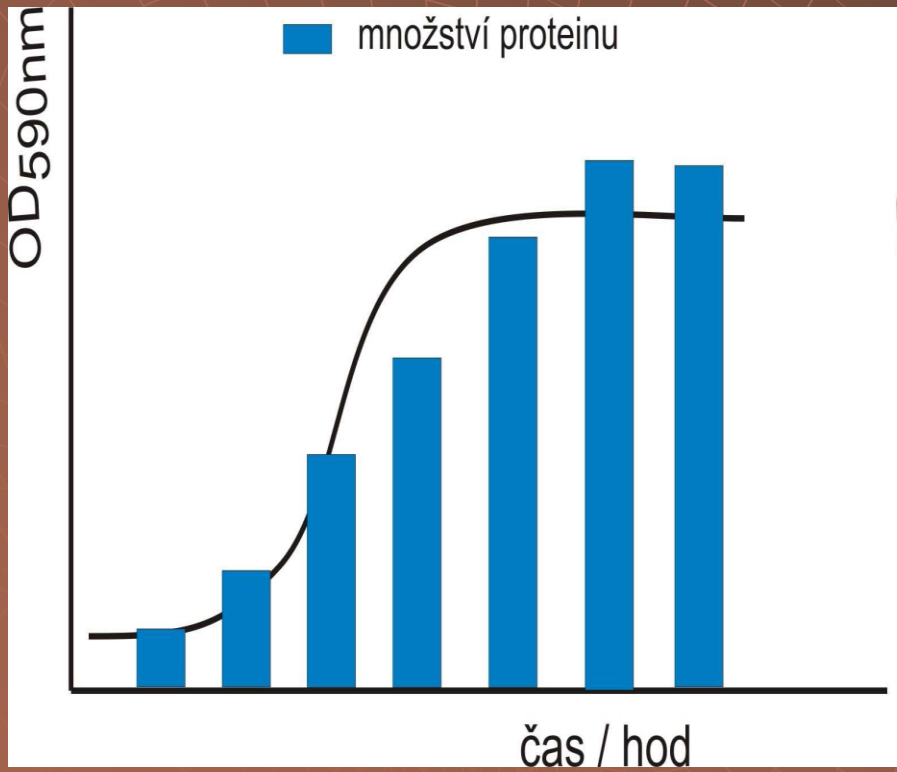
•Specializovaná sbírka vodních hyfomycetů obsahuje asi 500 kmenů (60 rodů se 130 druhy).

Selekce optimálních producentů

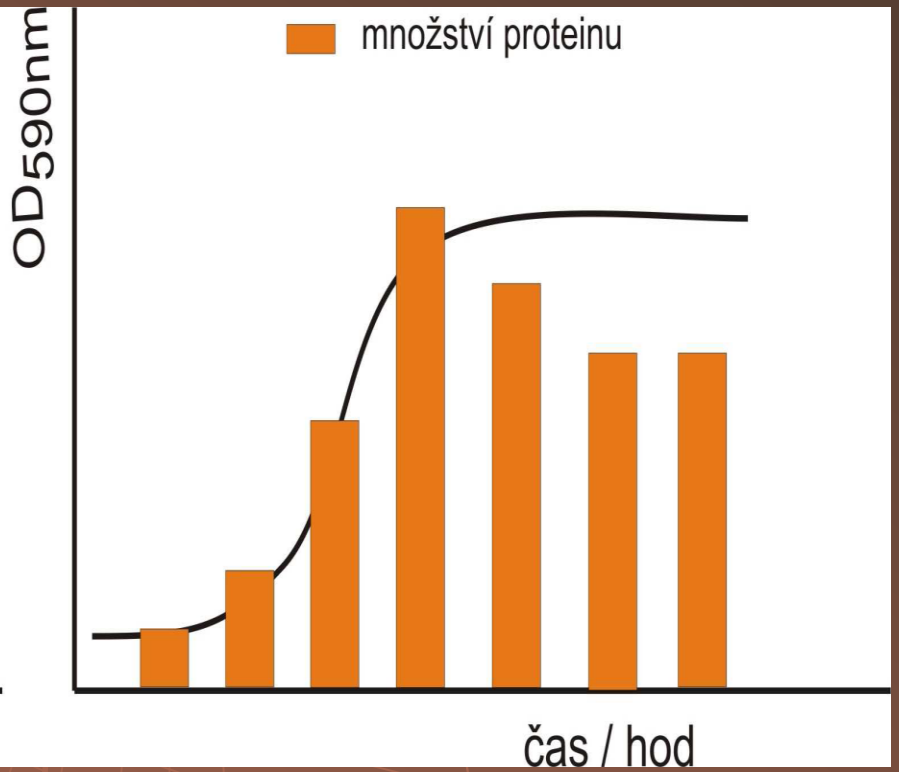
- snadné získání producenta
- snadnost purifikačního postupu
- maximální produkce enzymu

Mikroorganismy

Celková bílkovina



Aktivita daného proteinu



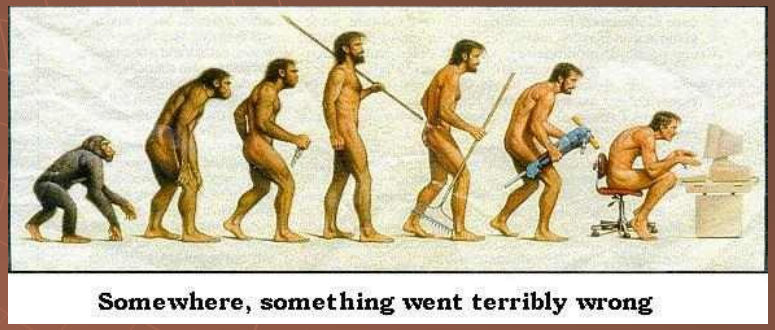
Bezobratlí

Hmyz, plži, mlži

Nevýhody - málo se používá, nesnadno se získává

Živočišné tkáně

- Laboratorní zvířata – myši, krysy, králíci
- Jateční zvířata – orgány, krev
- Člověk – tělní tekutiny



Rostlinné tkáně

Špenát, řepa, hrách, tabák, *Arabidopsis thaliana*

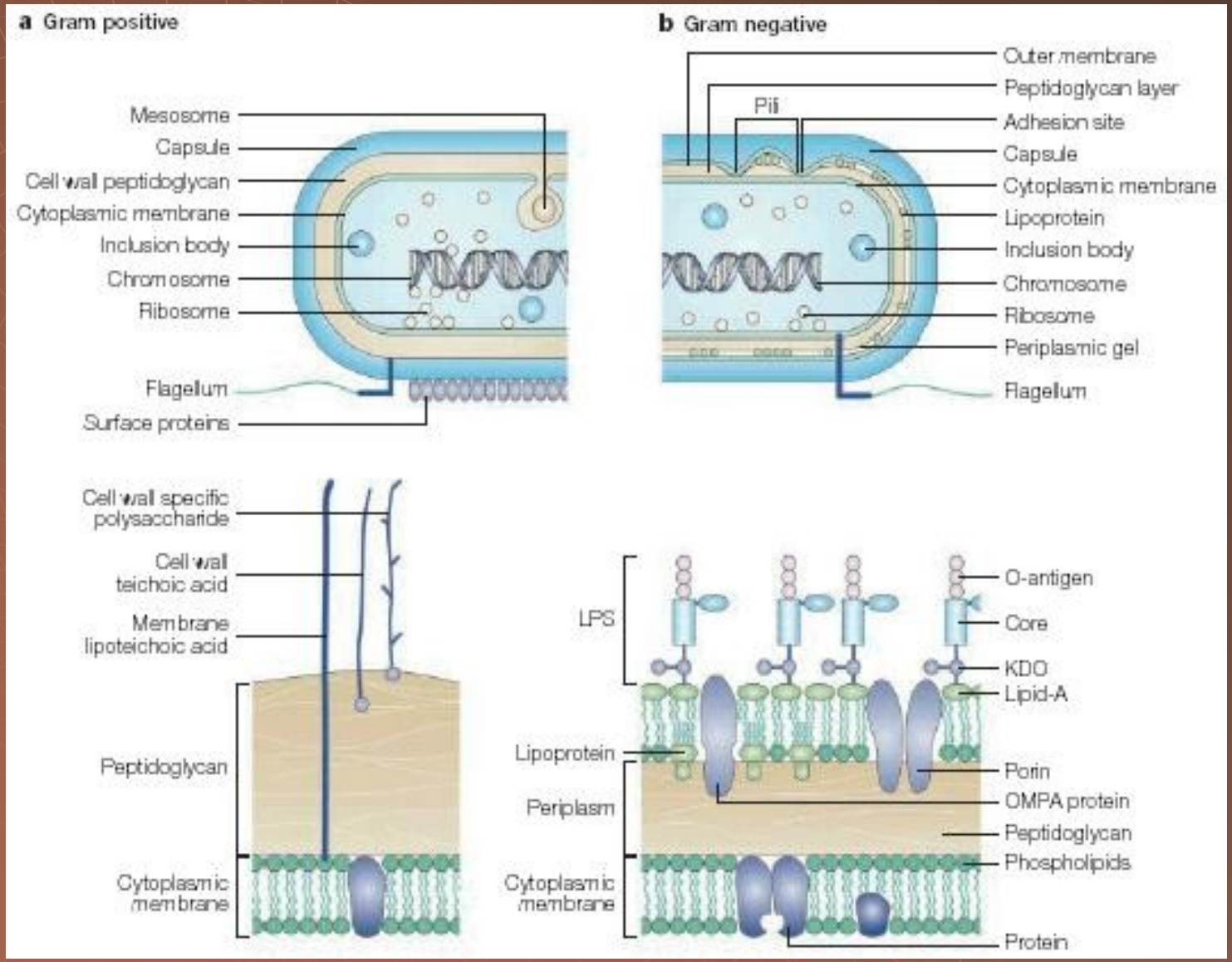
Nevýhoda – problematický růst za definovaných podmínek

Manipulace s biologickým materiálem

- Pokud možno zpracovat co nejdříve
- Zmražení - při – 60 - 80 ^{o}C
- Rozmrazování - co nejrychleji

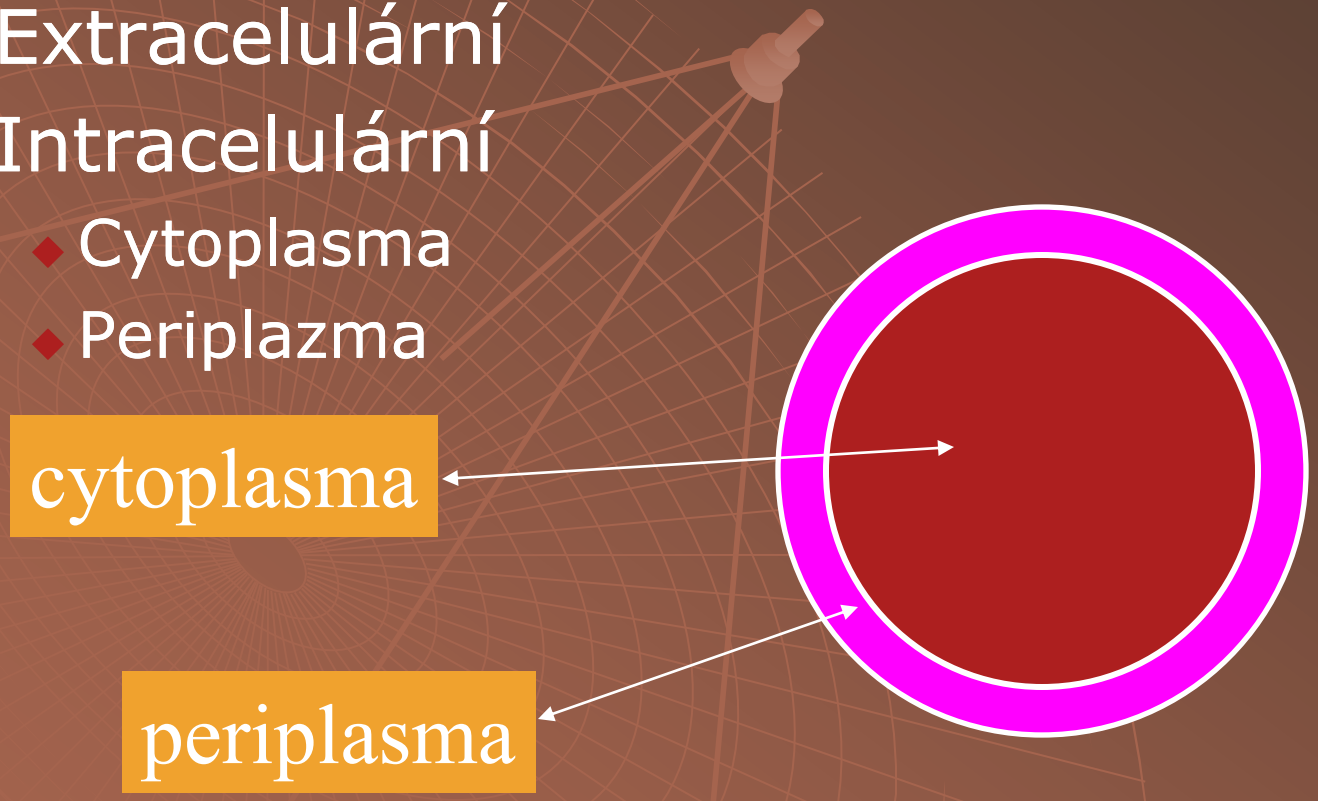
Rozbití a extrakce

Bakterie


a Gram positive
Mesosome
Capsule
Cell wall peptidoglycan
Cytoplasmic membrane
Inclusion body
Chromosome
Ribosome
Flagellum
Surface proteins
b Gram negative
Outer membrane
Peptidoglycan layer
Pili
Adhesion site
Capsule
Cytoplasmic membrane
Lipoprotein
Inclusion body
Chromosome
Ribosome
Periplasmic gel
Flagellum
Cell wall specific polysaccharide
Cell wall teichoic acid
Membrane lipoteichoic acid
Peptidoglycan
Cytoplasmic membrane
LPS
O-antigen
Core
KDO
Lipid-A
Lipoprotein
Porin
Periplasm
OMPA protein
Peptidoglycan
Phospholipids
Cytoplasmic membrane
Protein

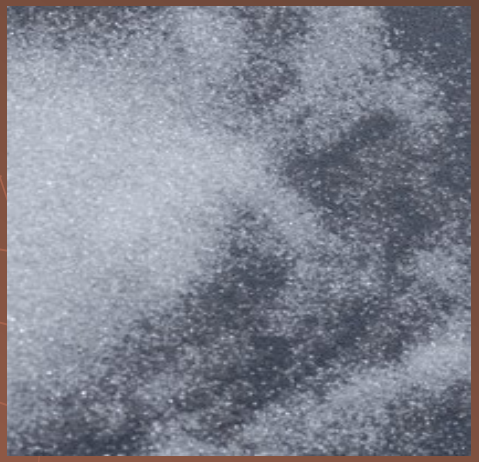
Bakterie

- Záleží na lokalizaci
  - Extracelulární
  - Intracelulární
    - Cytoplasma
    - Periplazma



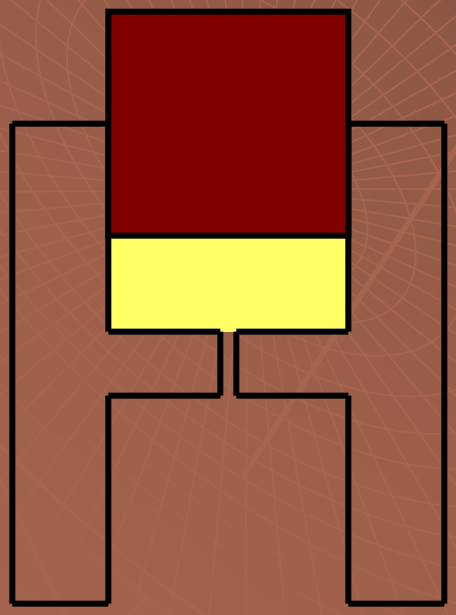
Balotina

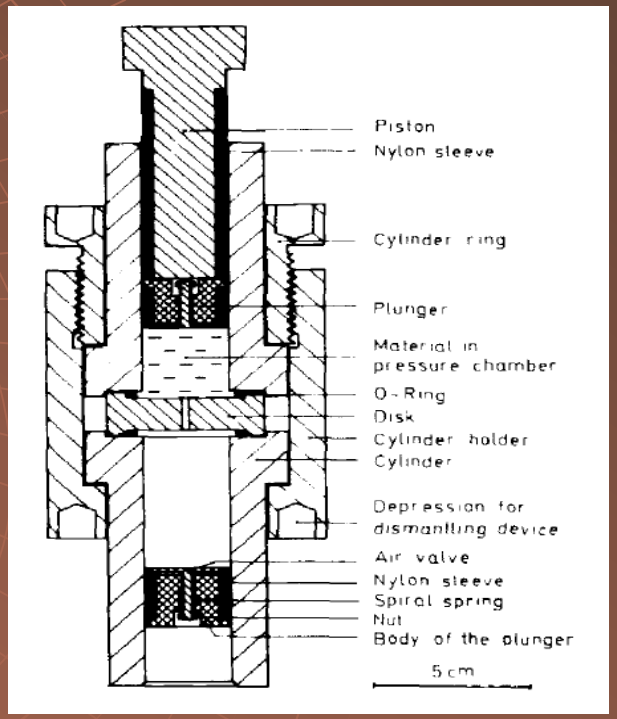
Princip – jemné skleněné kuličky přidány do bakteriální suspenze a rychle třepány nebo míchámy – nutno chladit



French (X) press

Princip – zmražená bakteriální suspenze protlačována malým otvorem, přičemž dochází k rekrystalizaci a rozrušení buněk

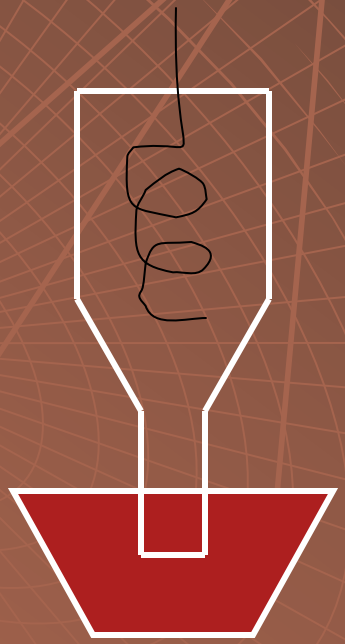




French (X) press

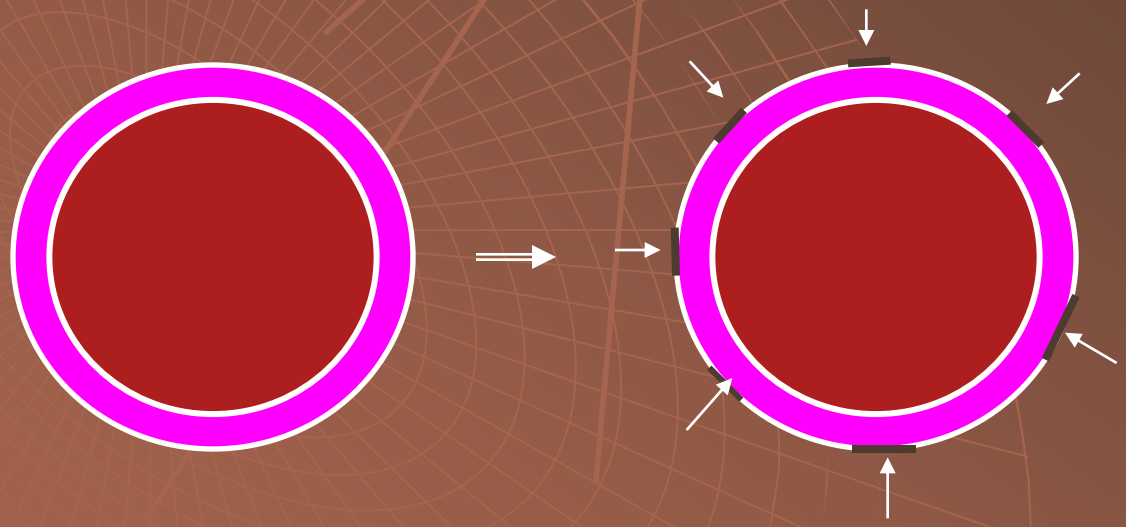
Ultrazvuk

Princip – ultrazvuk (> 20 kHz) v roztoku vyvolává střižní síly – nutno chladit



Lysozym + osmotický šok (mírný osmotický šok)

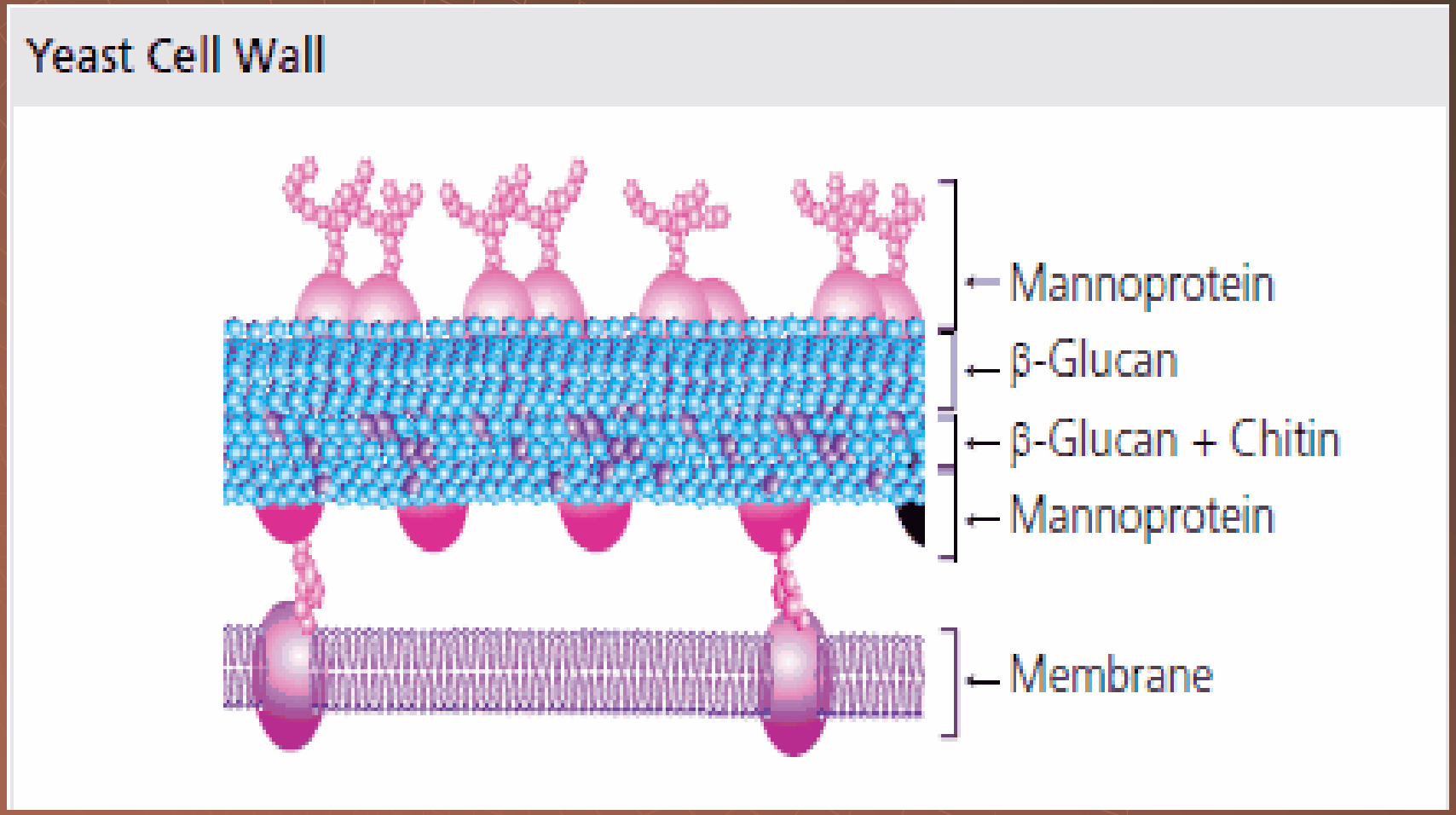
Princip – lysozym rozruší buněčnou stěnu, následně je bakteriální suspenze zředěna destilovanou H_2O – bakterie popraskají



Další

- Alumina Al_2O_3 – roztírání v třecí misce
- Opakované zmrazování a rozmrazování

Kvasinky


Yeast Cell Wall
Mannoprotein
β-Glucan
β-Glucan + Chitin
Mannoprotein
Membrane

Kvasinky

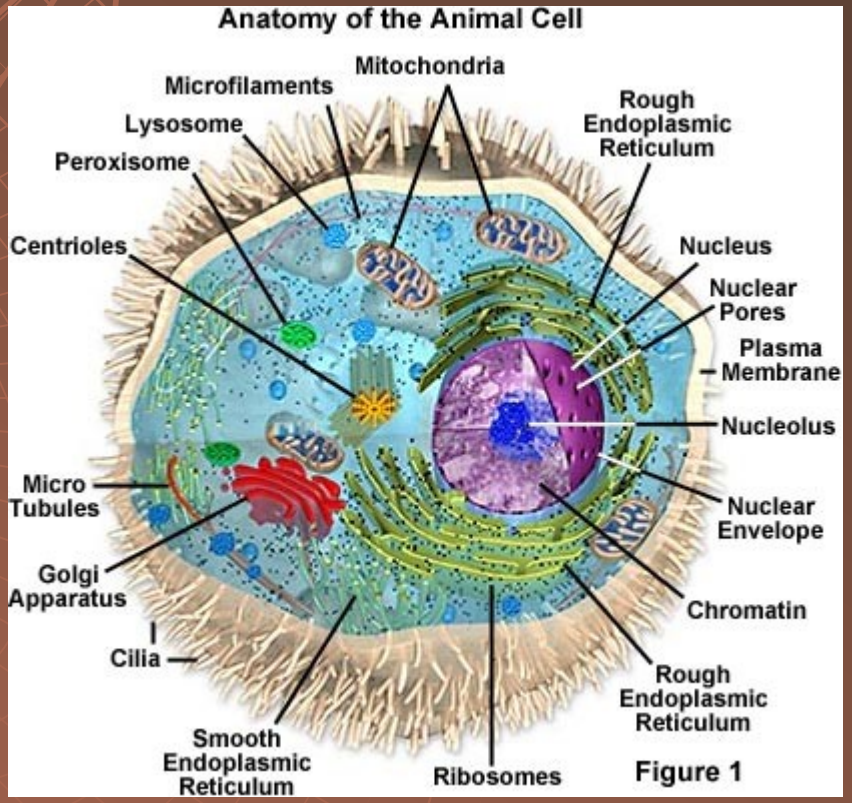
Toluenová autolýza

Princip – toluen extrahuje při 35 –40 ^{o}C fosfolipidy buněčné stěny [redacted] osmotický šok [redacted]nzymová autolýza

Balotina, French press,

Živočišné tkáně

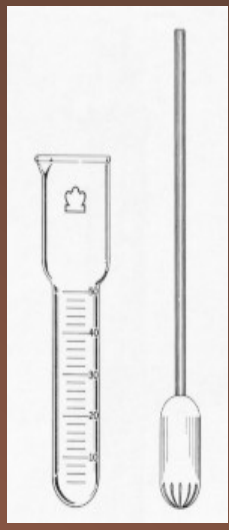
- Bez buněčné stěny
- Velmi křehké
- Tkáňové kultury



Živočišné tkáně

- Třecí miska s pískem

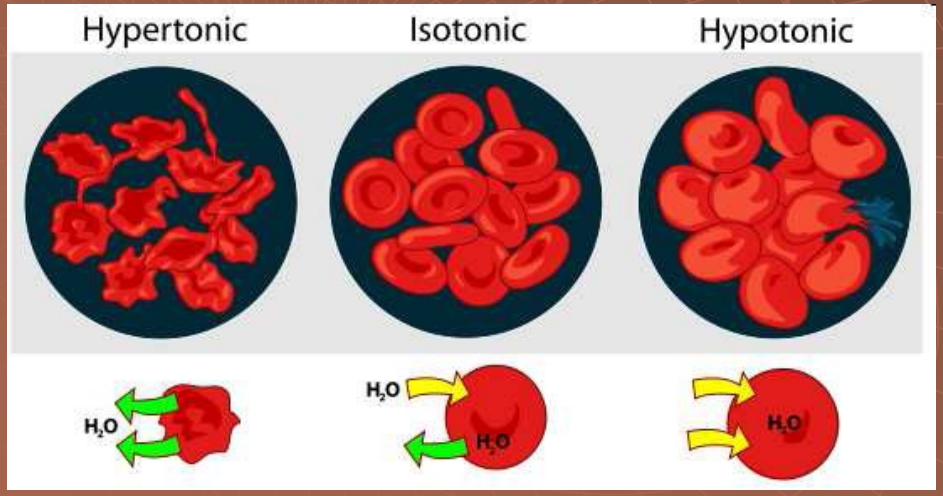
- Ruční homogenizatory – Potter – Elvehjemův



Živočišné tkáně

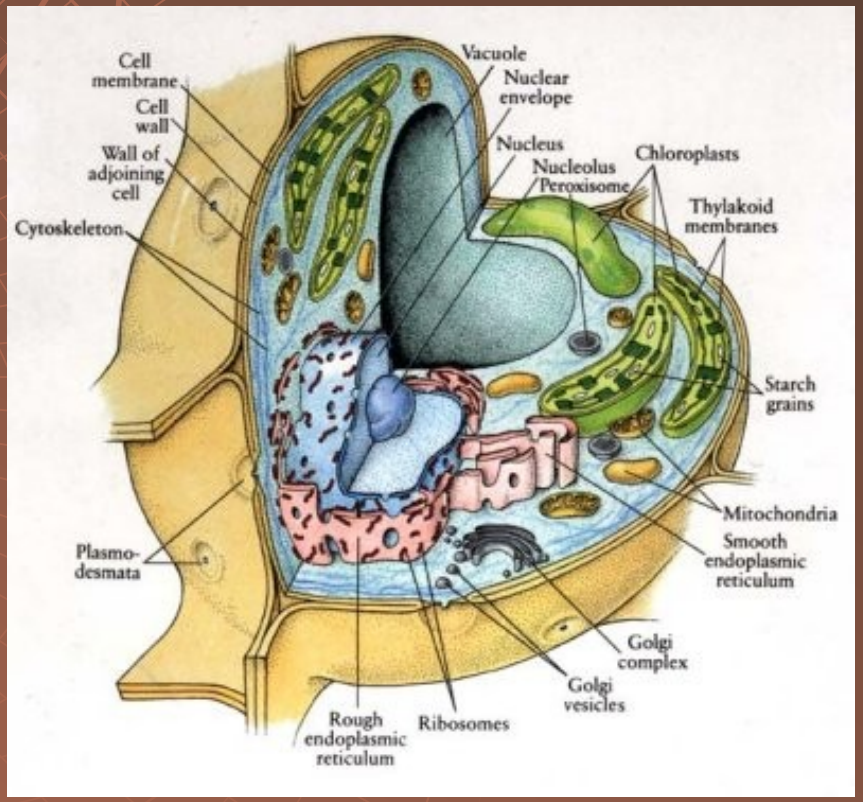
- Mixery

- Osmotická lyse - erytrocyty



Rostlinné tkáně

- Silná buněčná stěna - celulosa
- Tkáňové kultury křehké



Rostlinné tkáně

- Rozrušení buněčné stěny pomocí celulas,
- Obsahují hodně fenolických látek, které mohou být oxidovány na chinony – melaniny, které mohou modifikovat bílkoviny

Optimalizace extrakce

- Teplota – 4 - 6 ^{o}C chlazení
- pH – optimální pro danou bílkovinu – práce v pufrech
- I – v prostředí o definované iontové síle
- Přídavky látek – EDTA, merkaptoethanol, kovové ionty, inhibitory proteas, DNAsa

Inhibitory proteas

Protease Inhibitor	General inhibitors for: Serine proteases [a]	Cysteine proteases [b]	Metallo-proteases [c]	Aspartic proteases [d]
Aprotinin		E-64	Phosphoramidon	Pepstatin
Pefabloc SC and Pefabloc SC PLUS			Bestatin (aminopeptidases)	
Leupeptin *(inhibits serine and cysteine proteases with trypsin-like specificity)*				
PMSF				
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets*				
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*				
α_2-Macroglobulin				

Inhibitors included in the set	Specificity of inhibition	Quantity Supplied
Antipain-dihydrochloride	Papain, Trypsin, Cathepsin A and B	3 mg
Aprotinin	Trypsin, Plasmin, Chymotrypsin, Kallikrein	0.5 mg
Bestatin	Aminopeptidases	0.5 mg
Chymostatin	α-, β-, γ-, δ-Chymotrypsin	1 mg
E-64	Cysteine Proteases	3 mg
EDTA-Na_2	Metalloproteases	10 mg
Leupeptin	Serine and Cysteine Proteases such as Plasmin, Trypsin, Papain, Cathepsin B	0.5 mg
Pefabloc SC	Serine Proteases	20 mg
Pepstatin	Aspartic Proteases	0.5 mg
Phosphoramidon	Metalloproteinases, specifically Thermolysin	3 mg

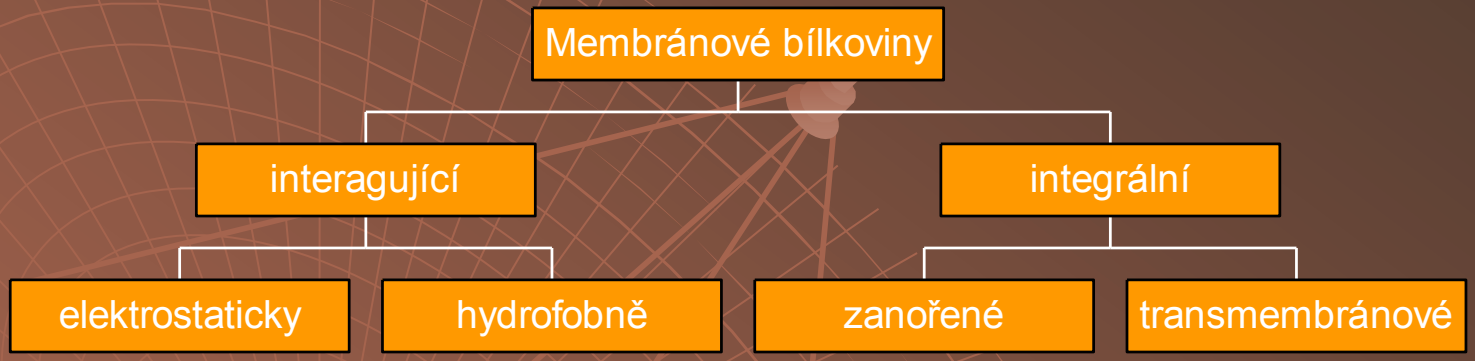
Separace subcelulárních organel

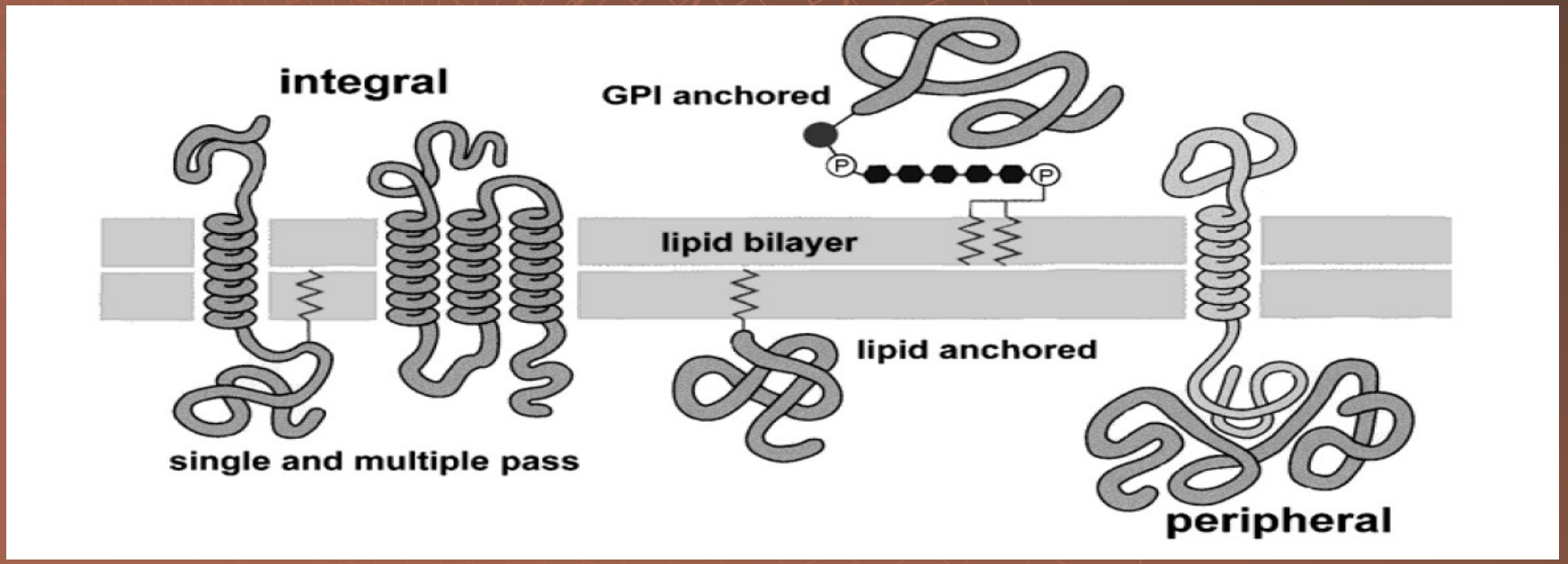
Organela	Tíhové zrychlení	Čas
Eukar.buňky	1 000 g	5
Jádra, chloroplasty	4 000 g	10
Mitochondrie, bakterie	15 000 g	20
Lysozomy, membrány	30 000 g	30
Ribozomy, fragmenty end.retikula a Gold.systém	100 000 g	60

Enzymy - markery

Organela	**Enzym**
Cytoplasma	LDH
Endoplazmatické retikulum	Glukosa-6-fosfatasa
Goldiho systém	galaktosyltransferasa
Peroxisom	katalasa
Lysozom	Kyselá fosfatasa
Mitochondrie in	cytochromoxidasa
Mitochondrie out	monoaminoxidasa

Membránově vázané bílkoviny

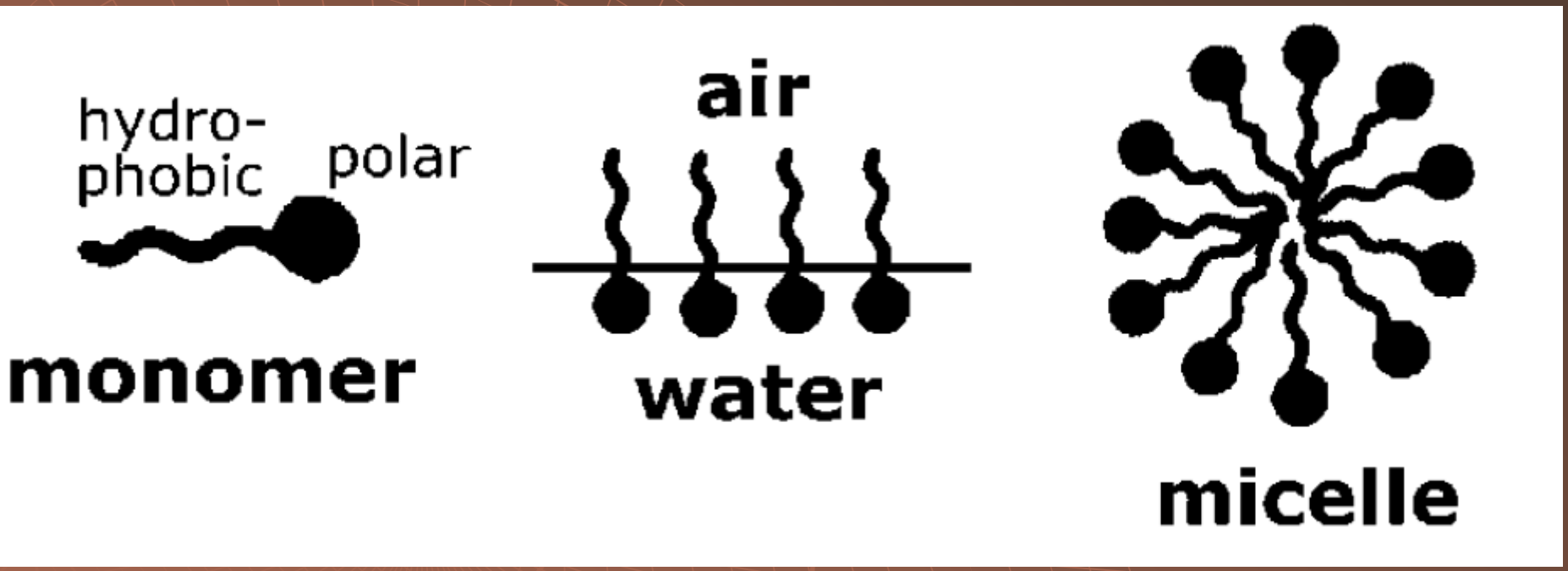




Izolace membránových bílkovin

- *Chemicky* – detergenty, chaotropní soli, organická rozpouštědla, nízká iontová síla,
- *Fyzikálně* - homogenizace, sonikace
- *Enzymaticky* – fosfolipasy, lipasy, proteasy

Detergenty

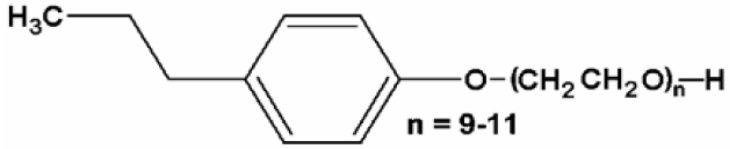
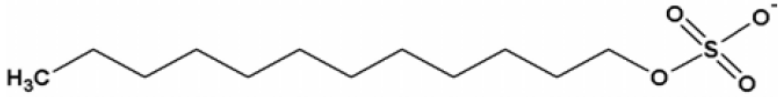
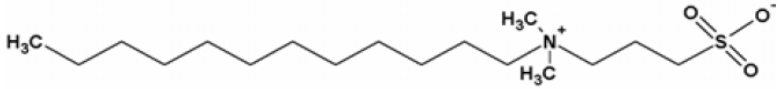
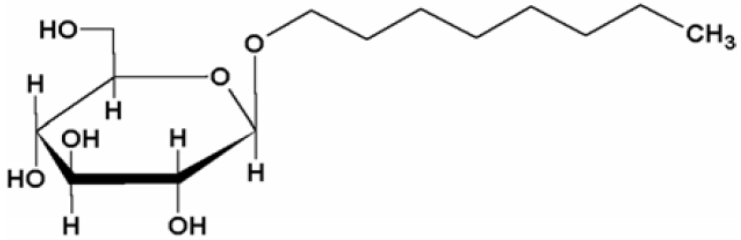
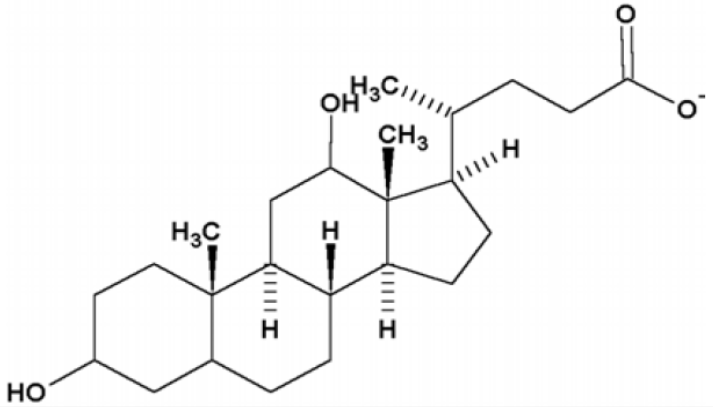


Detergenty

Detergent	CMC mM	MMW Da	koncentrace	odstranění	aplikace
ANIOGENNÍ					
SDS(dodecylsulfát sodný)	8,3	288,4	> 10 mg/mg prot.	👍	denaturace proteinů, použití pro DNA, PAGE
DOC(deoxycholát sodný)	1-4	416,6	0,1-10 mg membr. lipidů	👉	solubilizace membránových proteinů
N-lauroylsarkosin	7	488	0,1 -1,5 %	👍	solubilizace membr. prot., příprava antigenů
KATIOGENNÍ					
CTAB (hexadecyltrimethyl amonium bromide)	4-5	337	0,1 – 1 %	???	rozpouští membrány, tvoří komplex s DNA, odstranění polysacharidů
NEIONOGENNÍ					
Triton X-100 [octylphenolpoly(ethylenglycolether)$_n$]	0,2	647 n=10	1 – 5 mM	👍	solubilizace proteinů
Tween 20 [poly(oxyethylene)$_n$ sorbitan-monolaurate]	0,06		> 10 mg/mg membr. lipid;	👍	imunobloty, ELISA
AMFOTERNÍ					
CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)	4	614,9	6,5-13 mM	👍	solubilizace membránových proteinů

Detergenty

Examples of Detergents and Their Properties

Name	Structure	CMC	N (MW)
Nonidet® (N) P-40		0.3 mM	100-155 (647)
sodium dodecyl sulfate (SDS)		8.3 mM	62 (288)
sulfobetaine (SB12)		3.6 mM	55 (336)
n-octylglucoside		14.5 mM	20-25 (292)
deoxycholate		20 mM	3-12 (417)