

Biochemické metody



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Literatura

Understanding Bioanalytical Chemistry

Principles and Applications

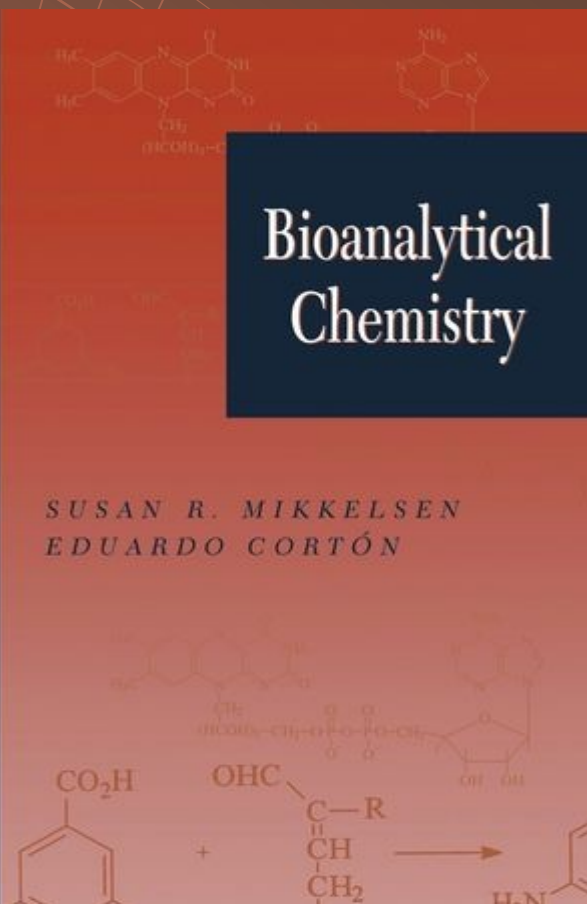


Victor A. Gault and Neville H. McClenaghan

WILEY-BLACKWELL

Bioanalytical Chemistry

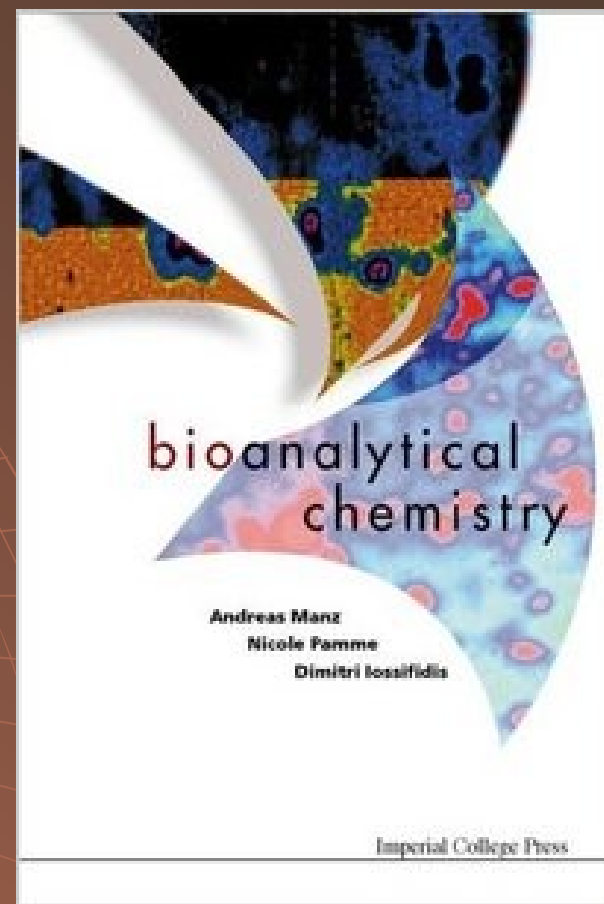
SUSAN R. MIKKELSEN
EDUARDO CORTÓN



bioanalytical chemistry

Andreas Manz
Nicole Famme
Dimitri Iossifidis

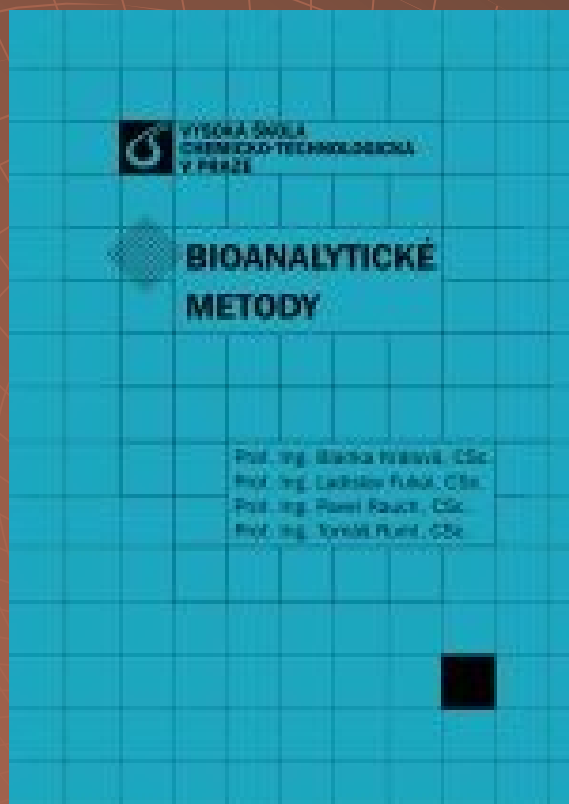
Imperial College Press



Literatura

- ◆ *Anzenbacher, Kovář* : Metody chemického výzkumu pro biochemiky. *MŠ Praha, 1986.*
- ◆ *Ferenčík, Škárka* : Biochemická laboratorní technika. *Alfa Bratislava 1981.*

Literatura



Separační metody

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

Separace

◆ Analytické

kvalitativní

kvantitativní

◆ Preparativní

Charakterizace – pI, MW, spektra, AMK ...

Problémy se vzorkem

- ◆ Komplexnost
- ◆ Malá množství
- ◆ Labilita

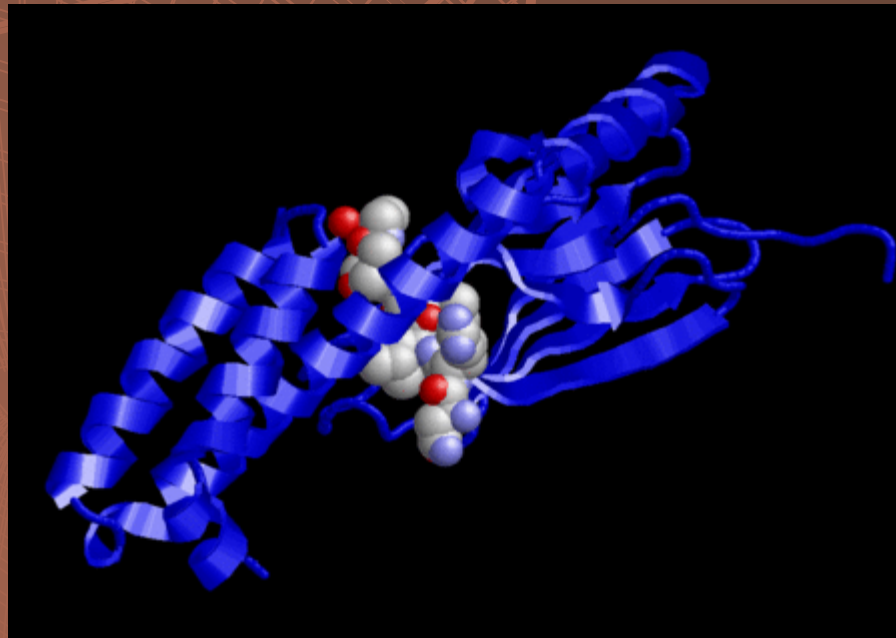
Znalosti o vzorku

- ◆ Objem
- ◆ Obsah sledovaných látek a příměsí
- ◆ pH a I
- ◆ Stabilita sledované látky (pH, I, teplota)

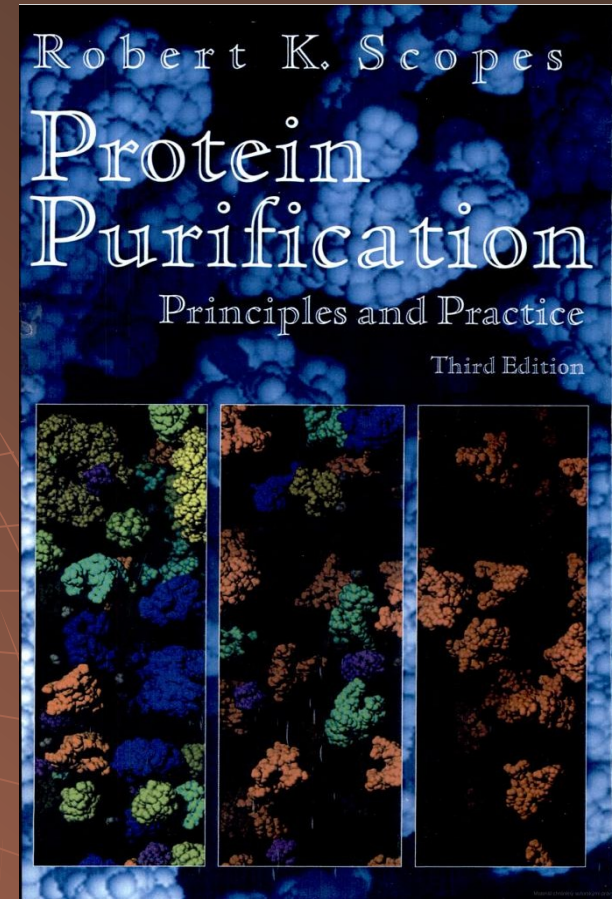
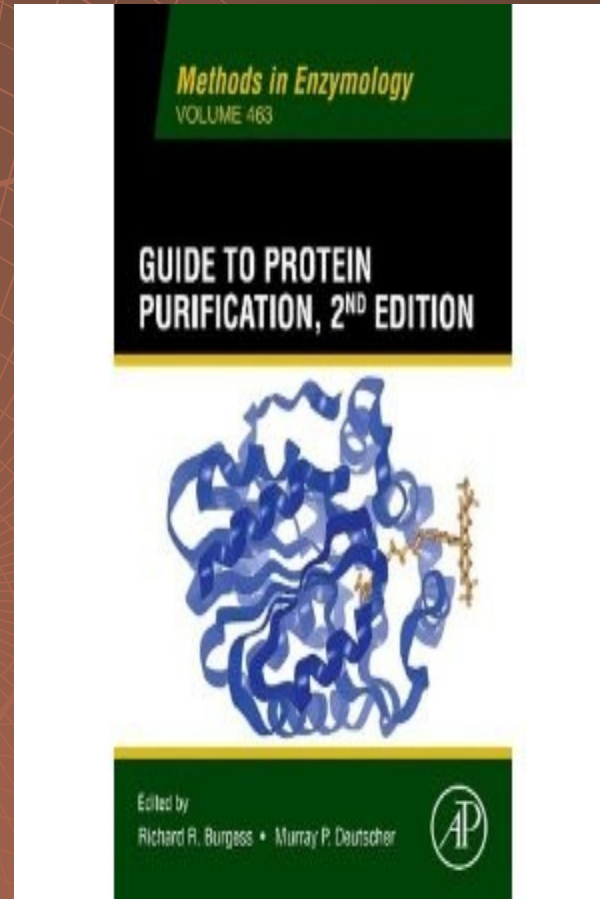
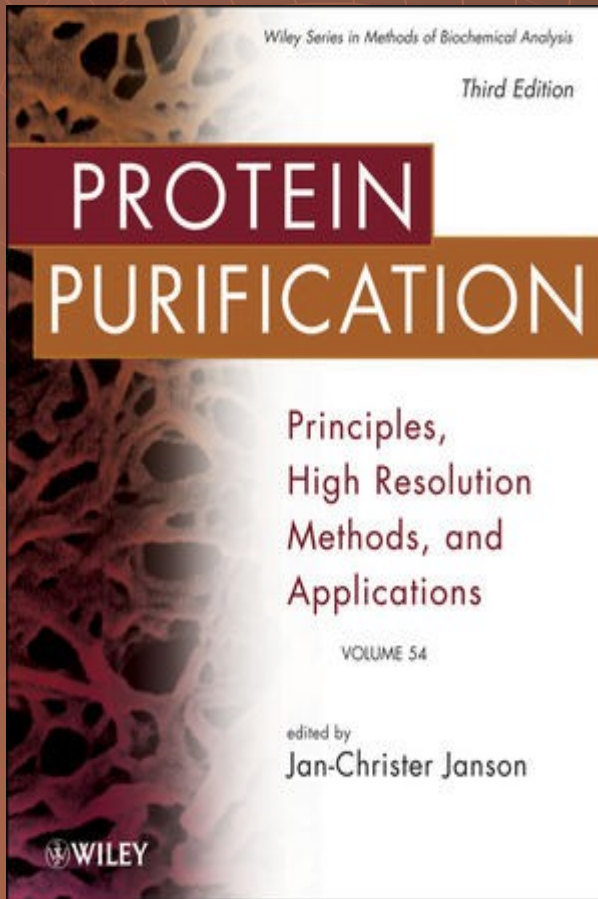
Zásady pro práci s biologickým materiálem

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

Separace bílkovin



Literatura





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

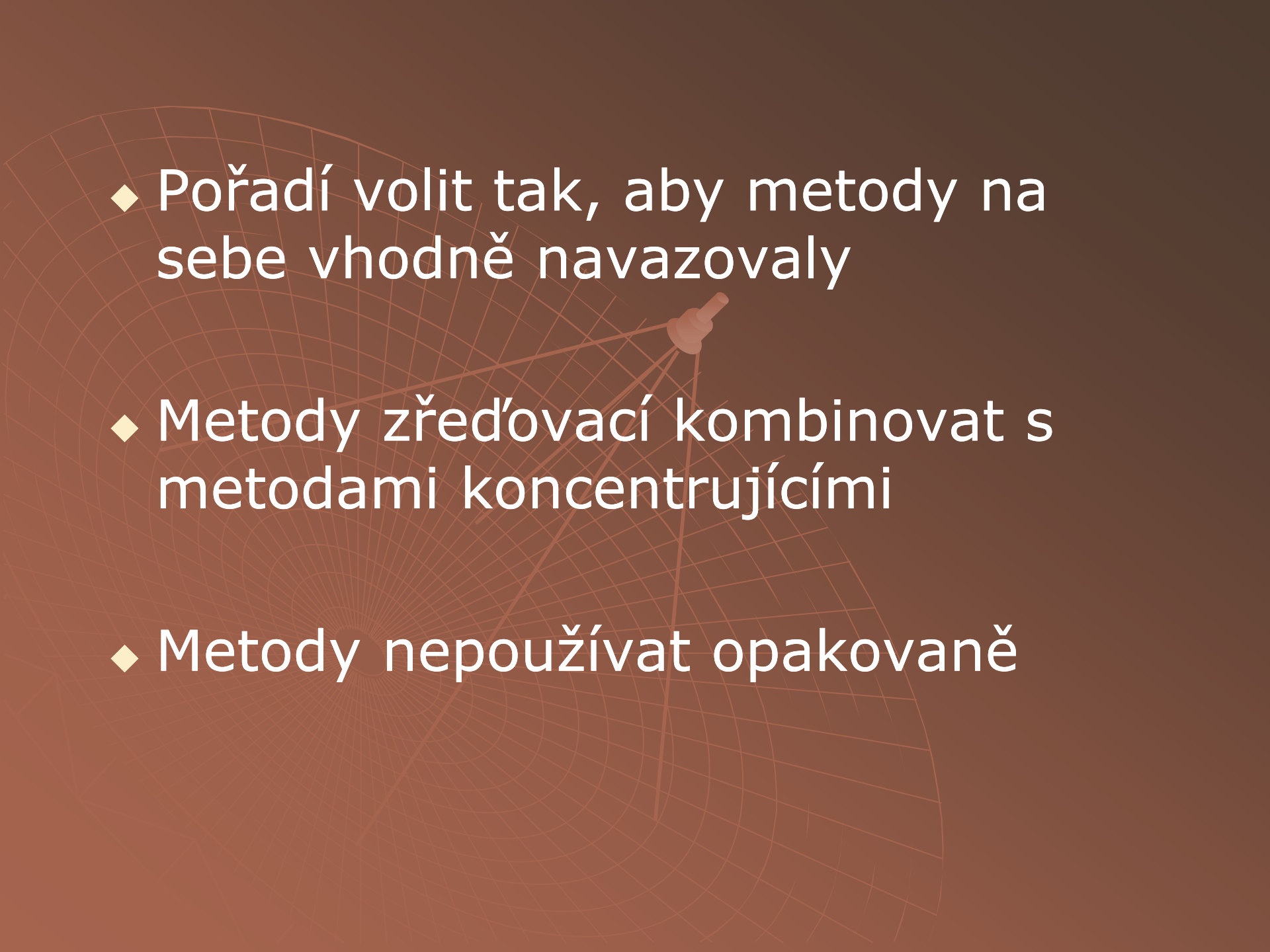
- ◆ Obvykle nestačí jediný krok
- ◆ Nutnost vícestupňové separace
- ◆ Začínat vždy s nejjednoduššími metodami
- ◆ Teoreticky nezáleží na pořadí, v praxi je pořadí důležité

Charakteristika separačních metod

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

Základní zásady

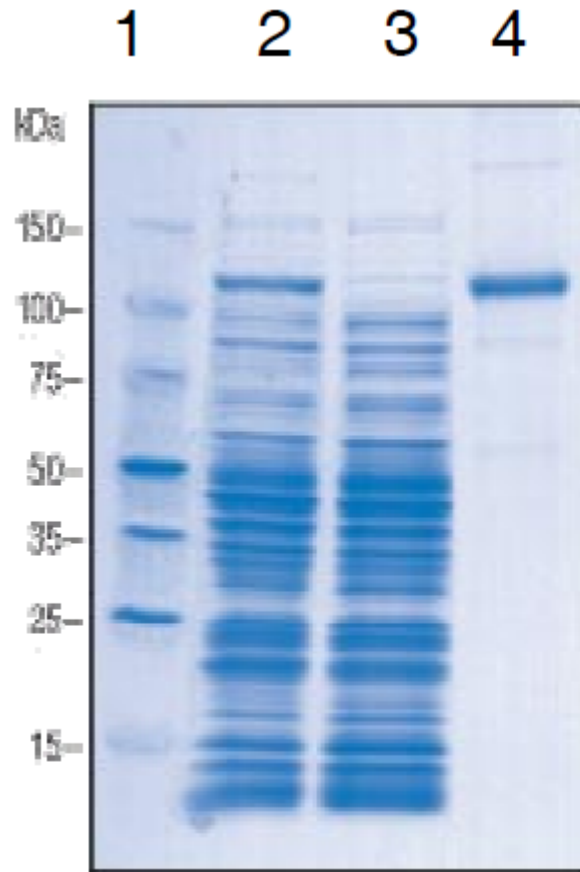
- ◆ Na začátek zařadit metody s vysokou kapacitou a malým výtěžkem a rozlišením ■ velké množství levného vstupního materiálu
- ◆ Později metody s vysokým rozlišením a výtěžkem, kapacita méně významná ■ vzorku již investovaná práce

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

Sledování průběhu separace purifikační tabulka

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

- ◆ Sledování průběhu separace
- ◆ Kapacita metody

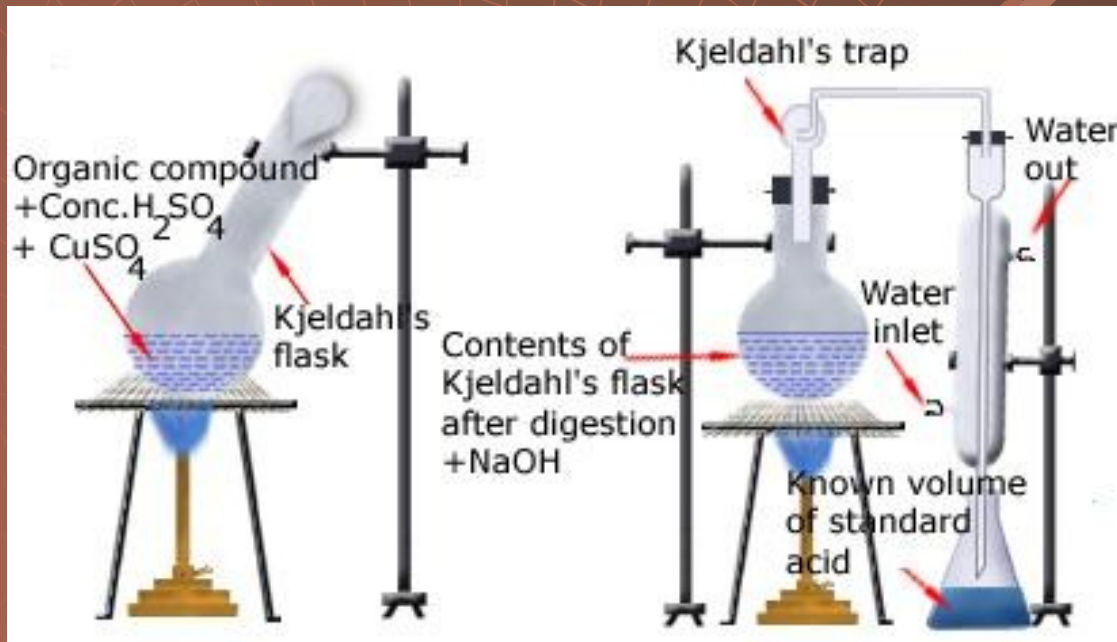


Kjeldahlova metoda – stanovení



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

Kjeldahlova metoda – stanovení N_2

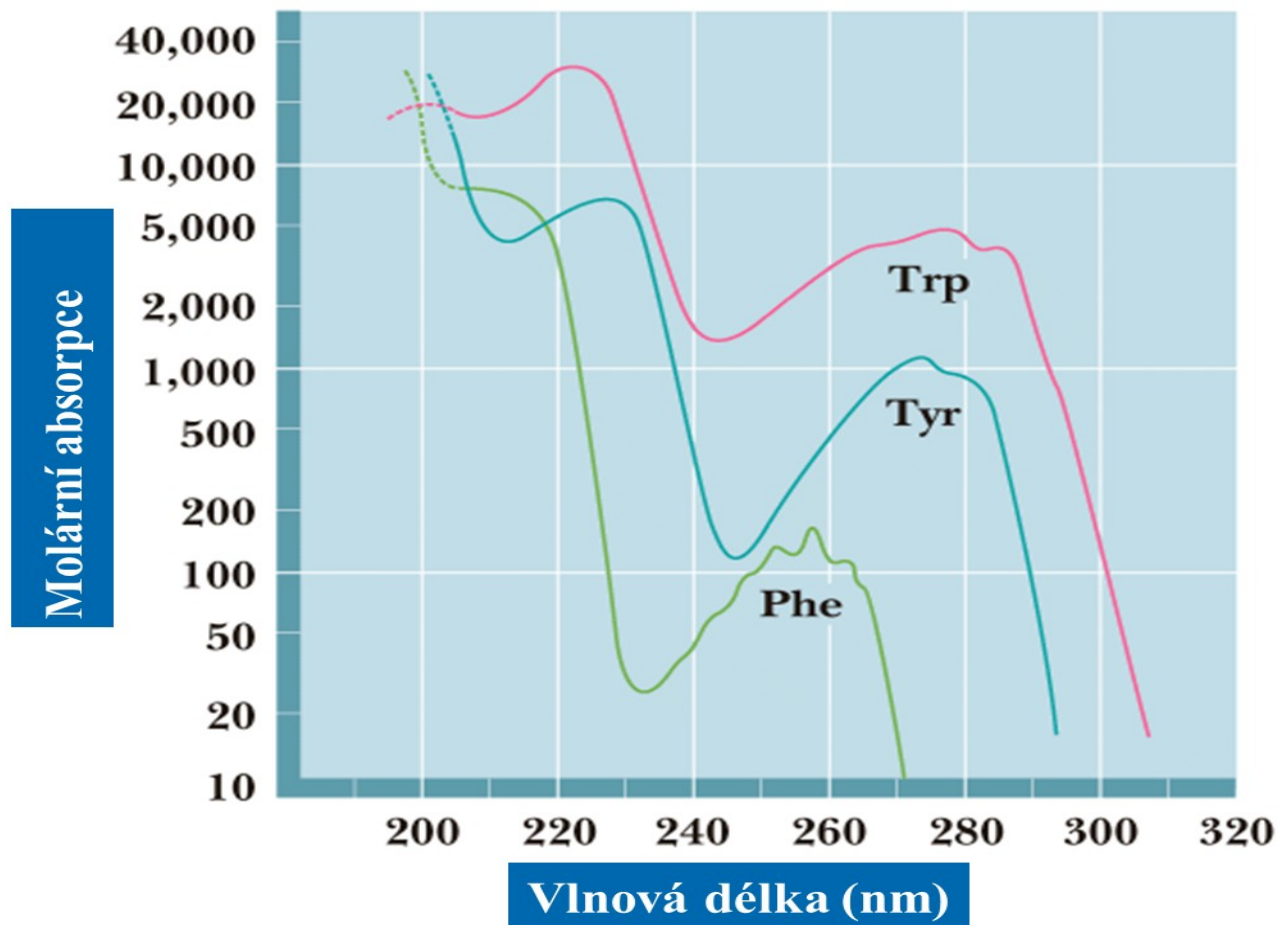


UV spektrofotometrie

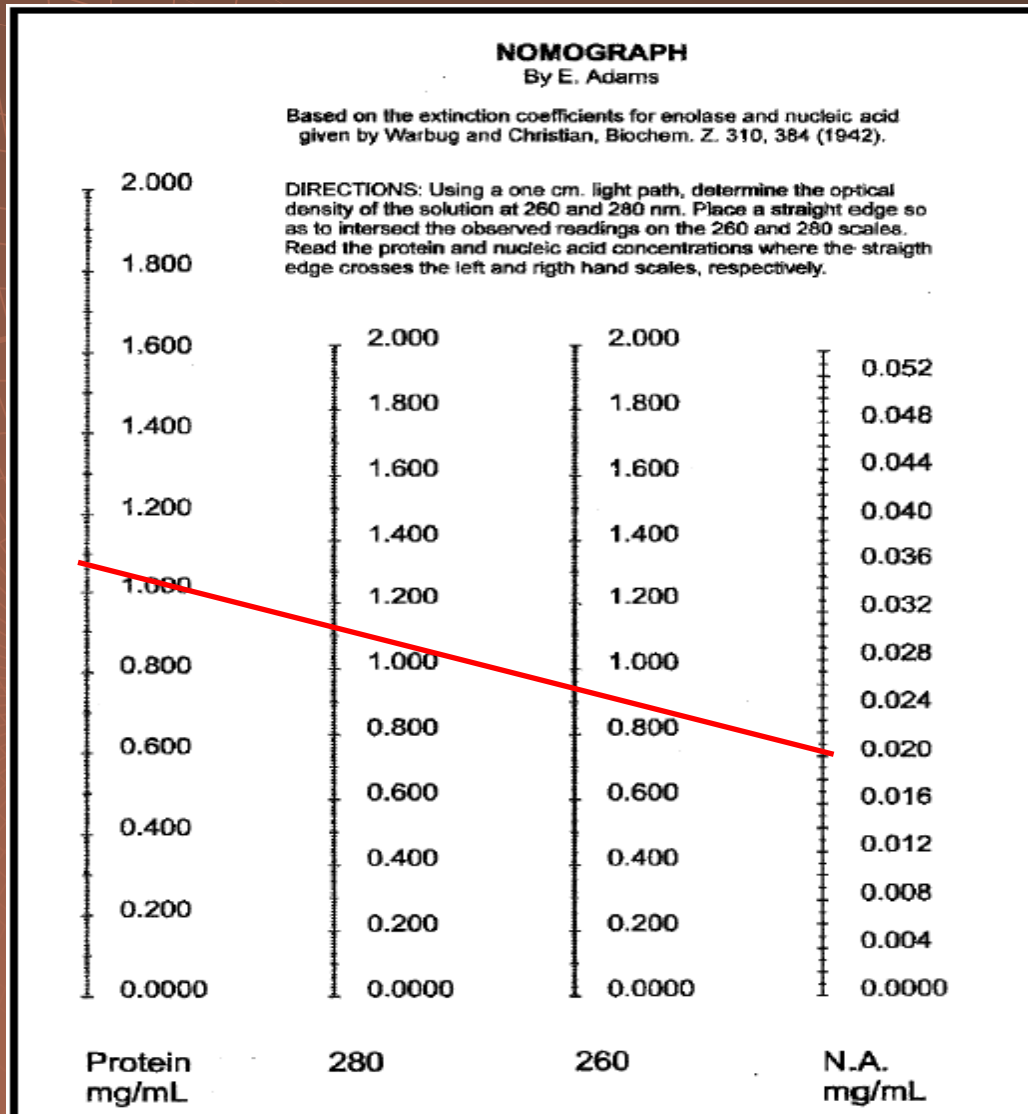
Výhody - nedestruktivní metoda
- není třeba kalibrace

- ◆ 280 nm – aromatické AMK →
interference nukleotidů

UV spektrofotometrie



UV spektrofotometrie



UV spektrofotometrie

- ◆ 180 - 230 nm – peptidická vazba



UV spektrofotometrie

Vzorce pro přímé UV stanovení:

$$c \text{ (mg/mL)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

$$c \text{ (mg/mL)} = (A_{235} - A_{280})/2.51$$

$$c \text{ (mg/mL)} = (A_{224} - A_{233})/5.01$$

$$c \text{ (mg/mL)} = A_{205} [27 + 120 (A_{280}/A_{205})]$$

UV spektrofotometrie

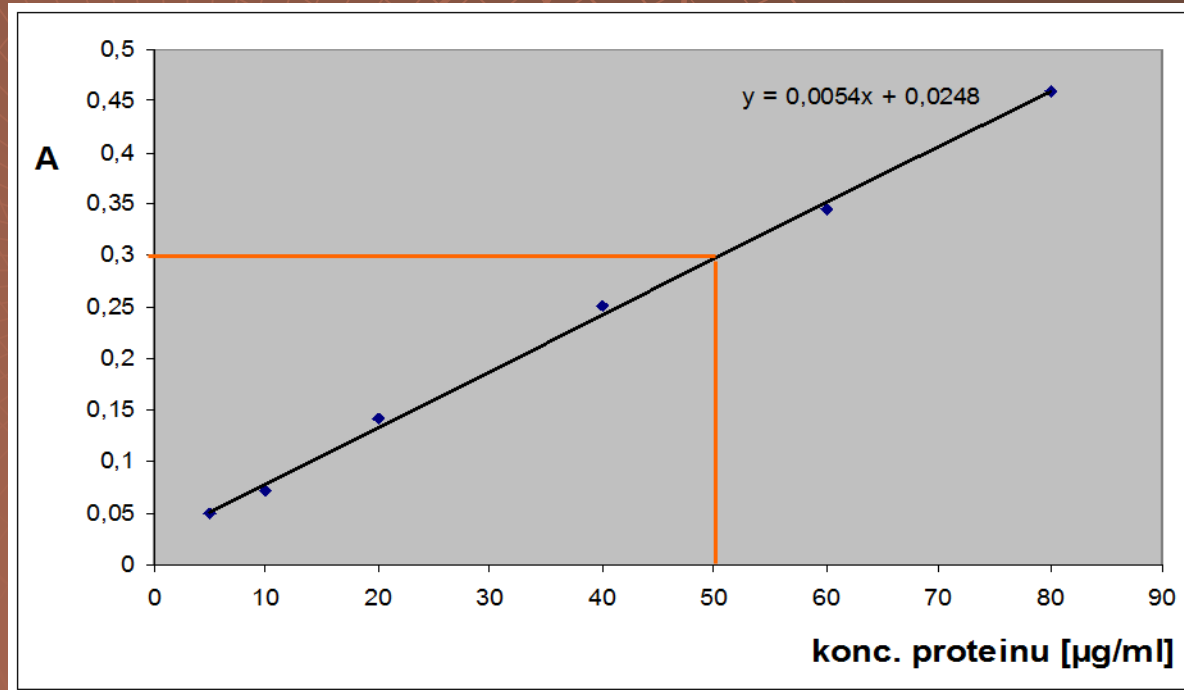
Edelchova metoda

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

$$e_{280} = n\text{Trp}.5500 + n\text{Tyr}.1490 + n\text{Cys}.125 \text{ (M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)}$$

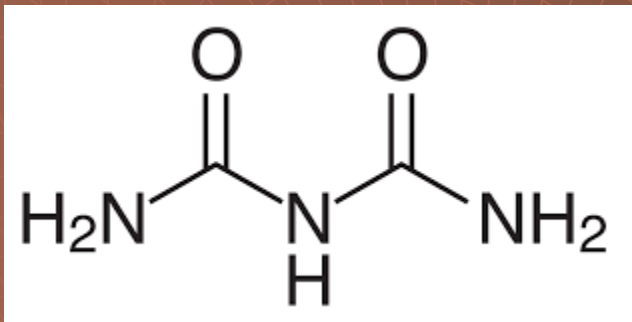
VIS spektrofotometrie

- ◆ Přídavek činidla ████████ arevný derivát
- ◆ Destruktivní metoda
- ◆ Nutná kalibrační závislost



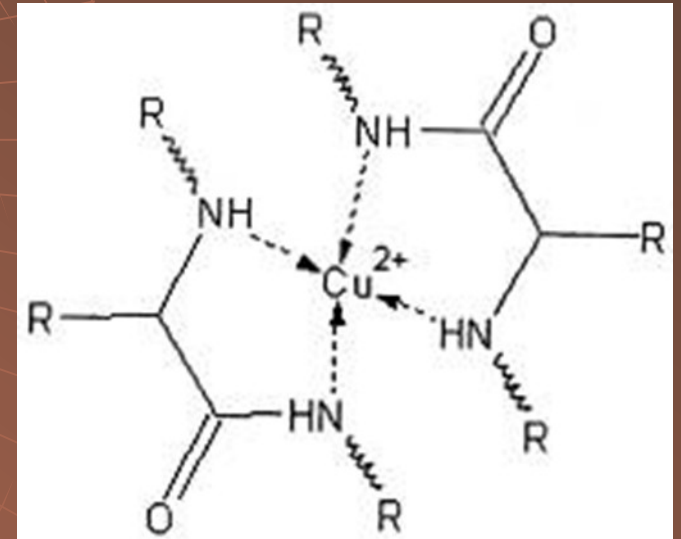
Biuretová metoda

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

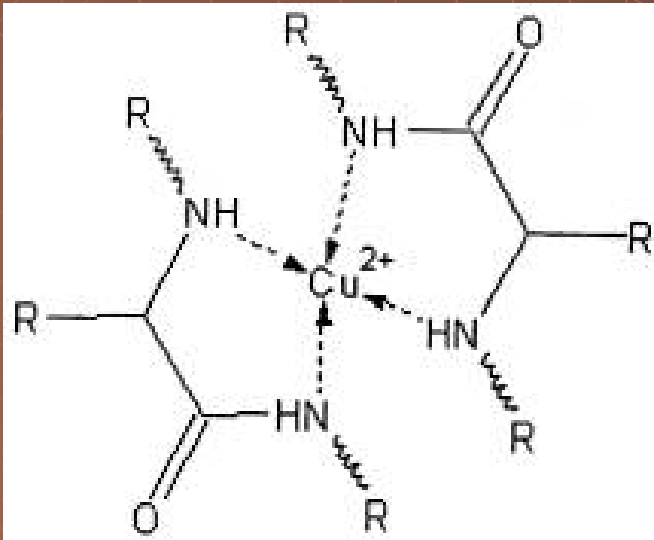


Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a
Biuretové metody

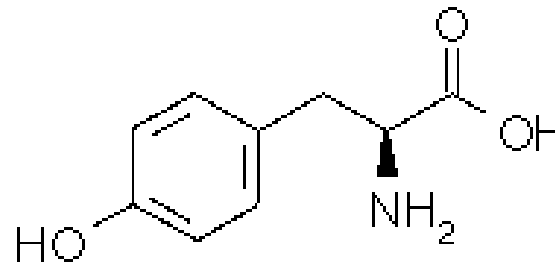
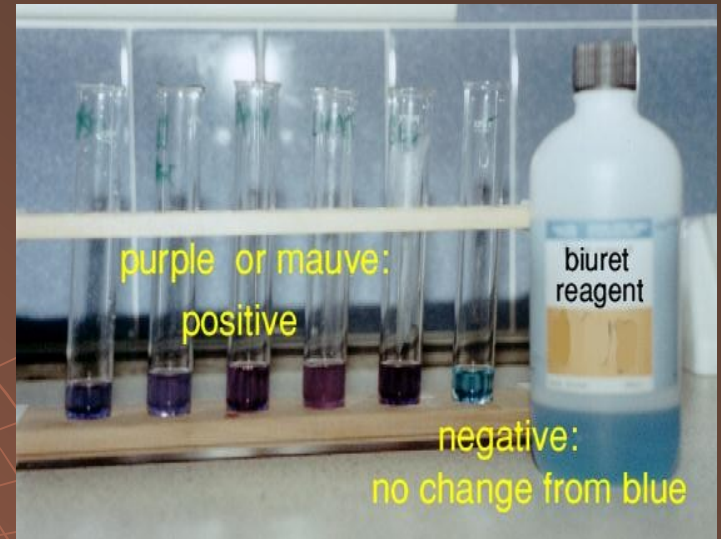
Měření : 600 nm

Lowryho metoda



•biuret ↑

•Folin ↓

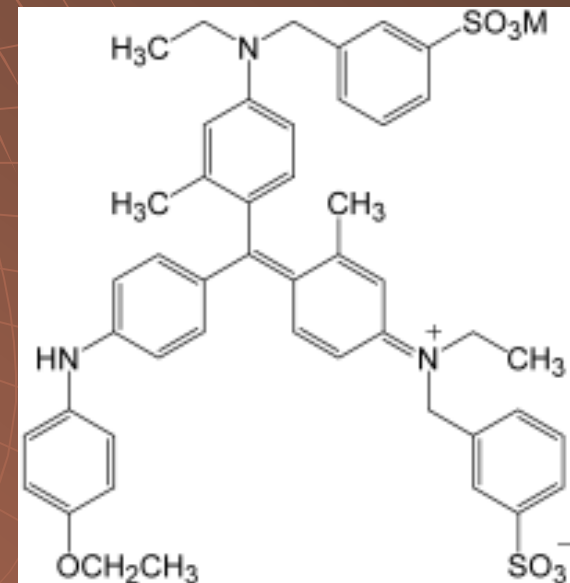


tyr y Tyrosin

Metoda dle Bradforda

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

Meření : 595 nm

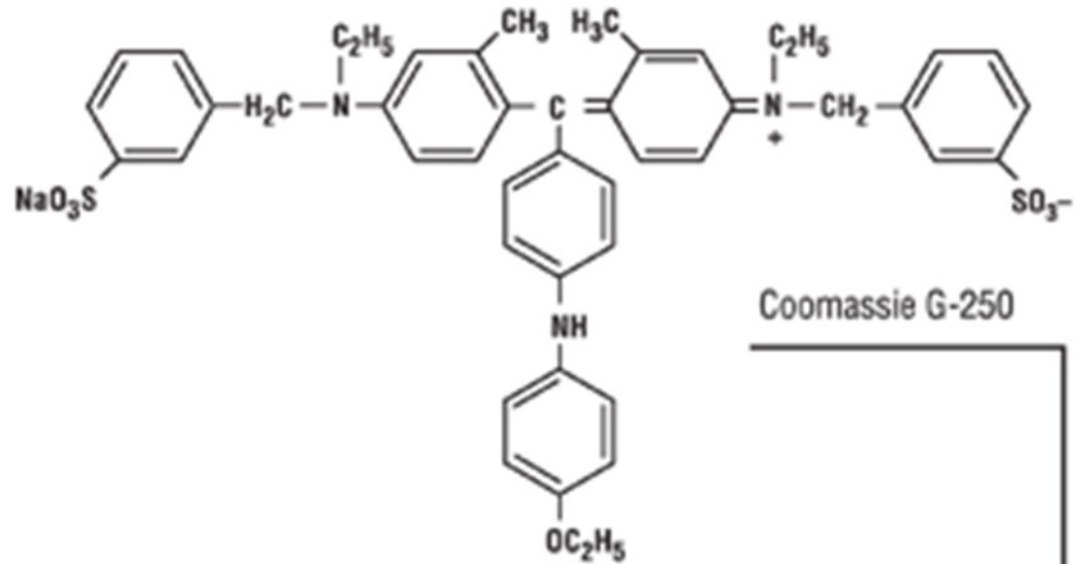


Metoda die Bradforda

PROTEIN

Basic and Aromatic
Side Chains

+



Coomassie G-250

465 nm



A_{max} = 595 nm

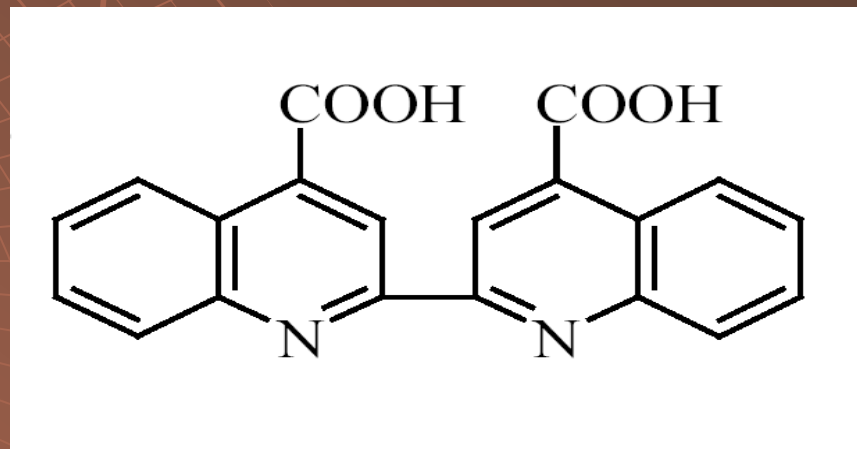
Protein-Dye Complex

Marion Bradford



BCA metoda

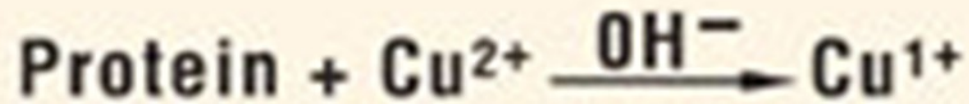
Princip : Na^+ sůl k. bicinchoninové (BCA), komplexuje Cu^+ tvořené reakcí peptidové vazby s Cu^{2+}



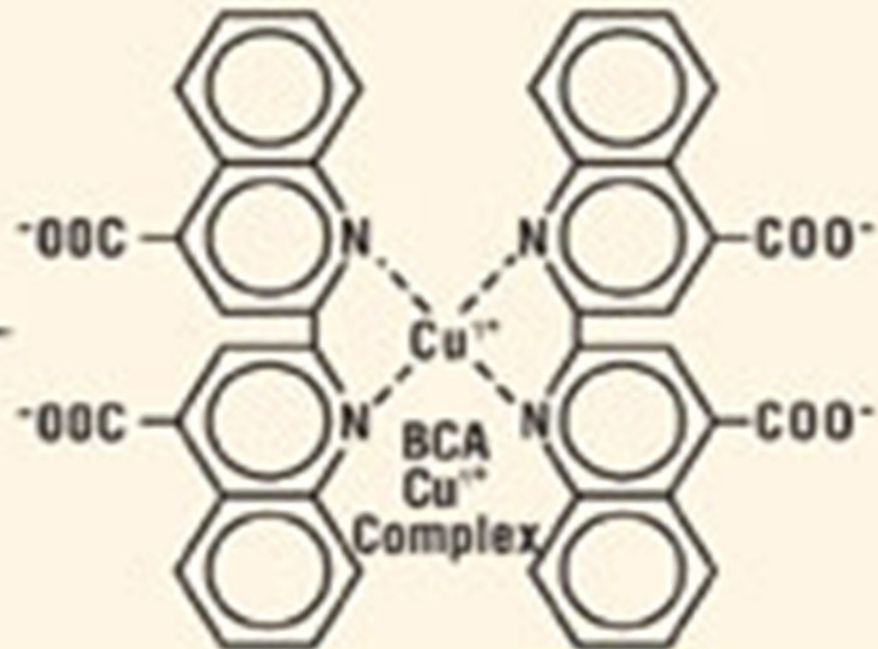
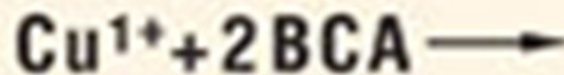
Měření : 562 nm

BCA metoda

STEP 1.



STEP 2.

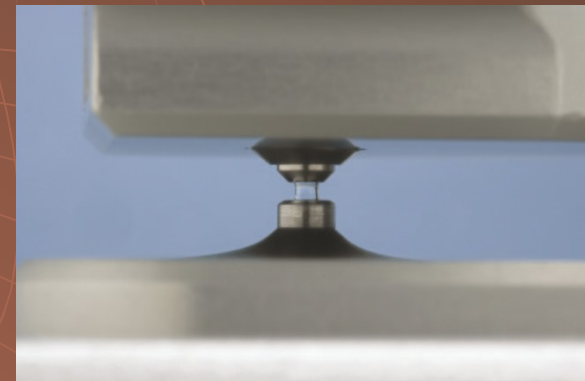


Spektrofotometr *versus* nanodrop



100 μ l

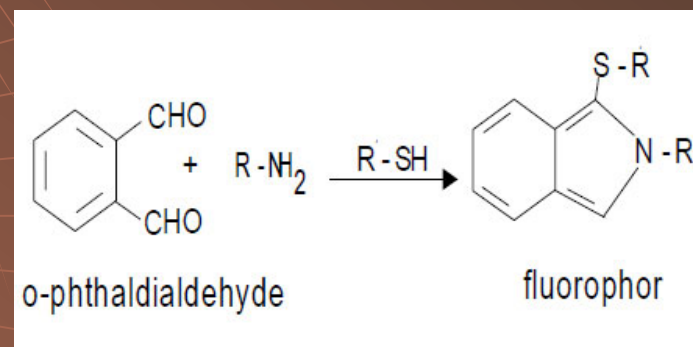
0.5 μ l



Fluorescence

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

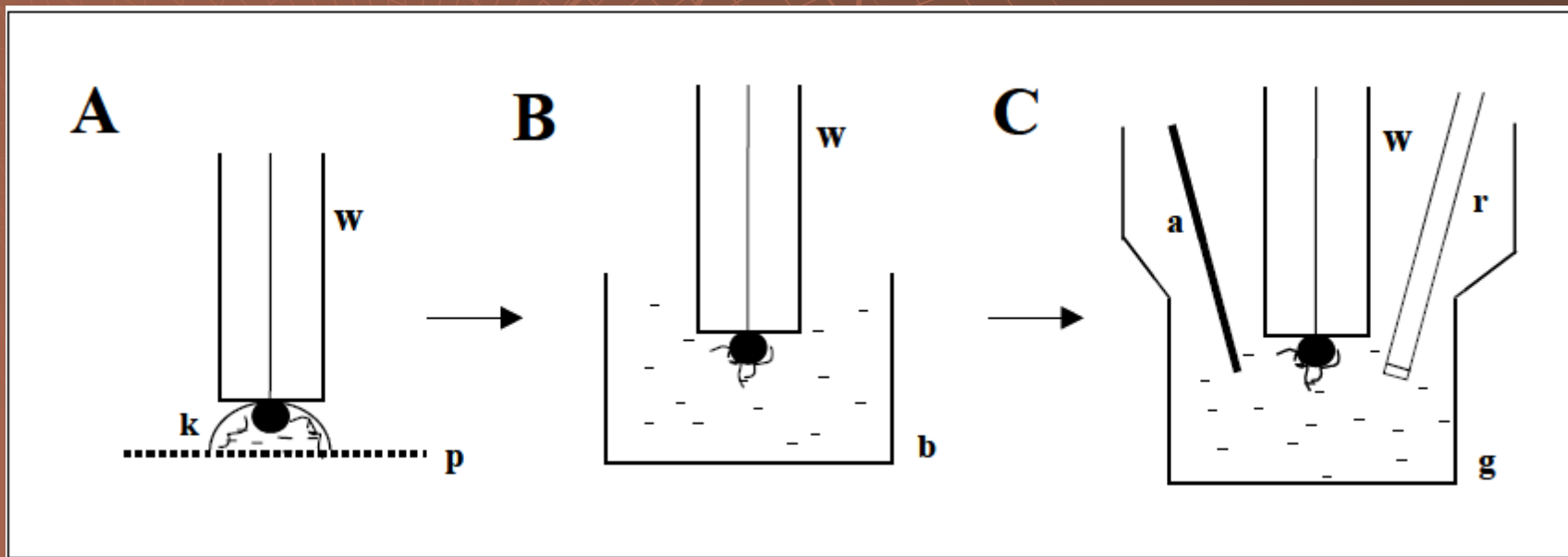
Měření : exc.340 nm
em.440 nm



- zhasení fluorescence přidavkem
bílkoviny

Polarografie

Princip : Brdičkova reakce – SH skupiny bílkoviny vstupují v přítomnosti Co^{2+} katalytické reakce na Hg elektrodě ████ 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 aminokyselino- vém složení	Aminoskupiny [<i>Např.</i> $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]
Lowry	0 – 0.1 mg	Částečně závislá na aminokyselino- vém složení	Kyseliny, chelátory (EDTA), reduktanty (DTT, phenol), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Bradford	0 – 0.01 mg	Závislá na aminokyselino- vém složení	Detergenty (SDS, Triton X100, mýdlo)
BCA	0 – 0.05 mg	Většinou nezávislá na aminokyselino- vém složení	Redukující látky (2- merkaptoethanol, DTT), chelátory (EDTA)

Stanovení biologické aktivity

Enzymatické, imunologické,
toxické, hormonální
receptorové atd.



Vlastní separace

Obecné schéma

Získání vstupního materiálu



Rozrušení buněk



Separace



Vstupní materiál

Mikroorganismy

Bakterie, kvasinky, plísně, řasy

- Výhody - lze je snadno získat v dostatečné množství
- selekce mutantů o požadovaných vlastnostech
 - genetické inženýrství
 - termofilní organismy
 - psychofilní organismy



Mikroorganismy

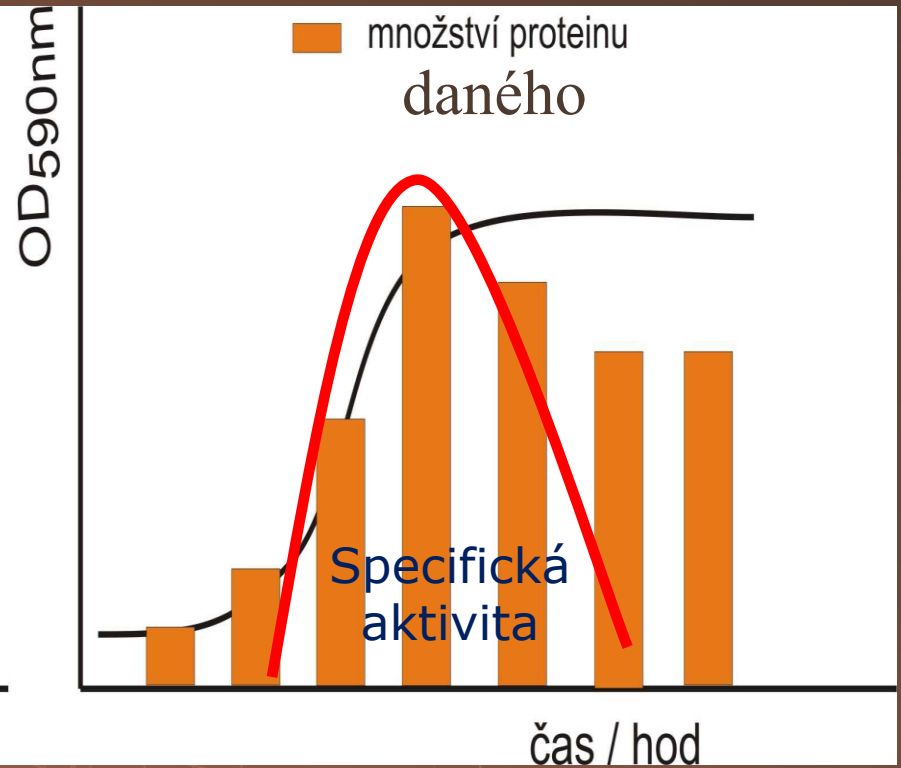
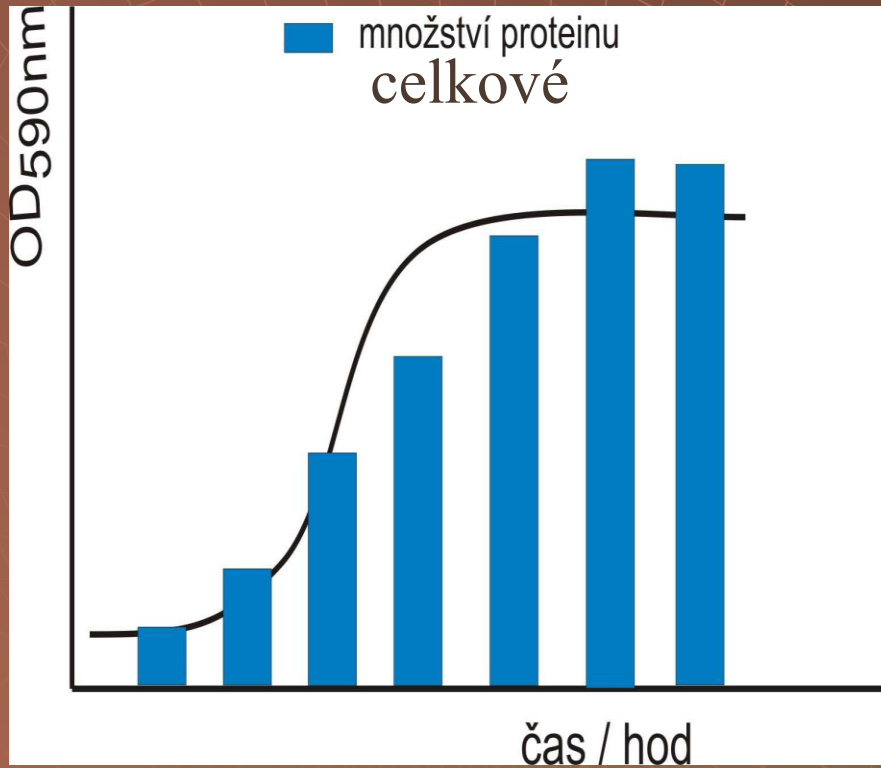


- CCM uchovává více než 3 000 kmenů bakterií (asi 1 400 druhů) a 800 kmenů vláknitých hub (přibližně 550 druhů), které nabízí ve svém Katalogu kultur.
- Specializovaná sbírka vodních hyfomycetů obsahuje asi 500 kmenů (60 rodů se 130 druhy).

Selekce optimálních producentů

- ◆ maximální produkce enzymu
- ◆ optimální vlastnosti enzymu
- ◆ snadné získání producenta
- ◆ snadnost purifikačního postupu

Mikroorganismy



Bezobratlí

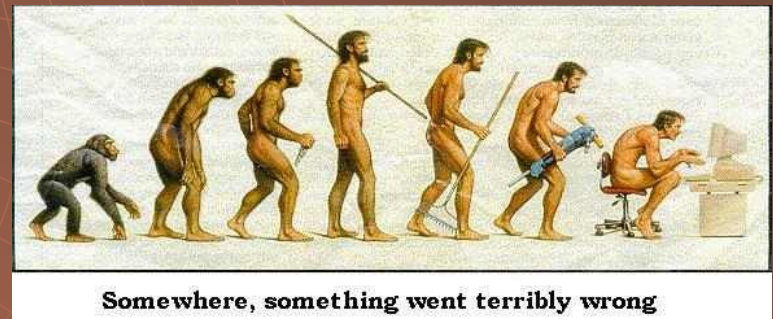
Hmyz, plži, mlži

Nevýhody - málo se používá, nsnadno 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



Fytotrony



Manipulace s biologickým materiálem

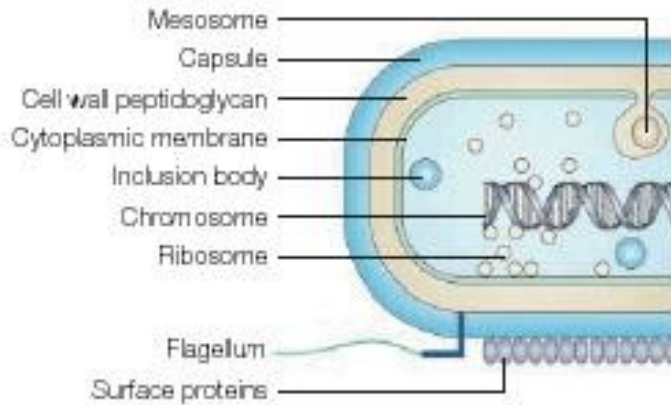
- ◆ Pokud možno zpracovat co nejdříve
- ◆ Zmražení – při - 60 – -80 °C
- ◆ Rozmrazování – co nejrychleji



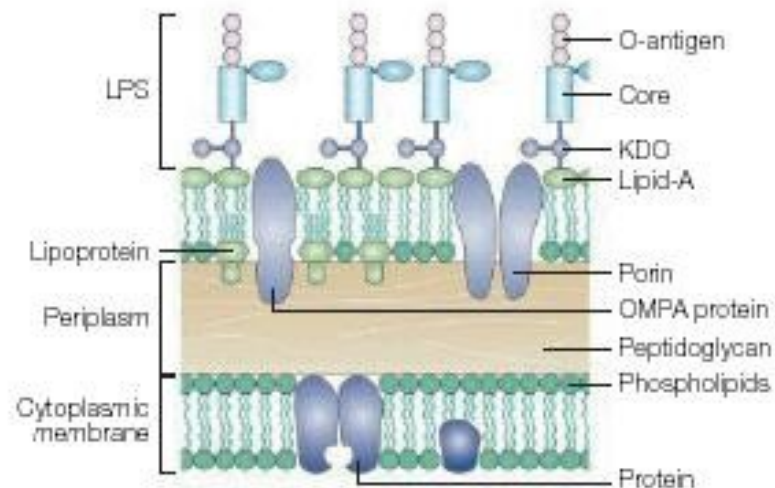
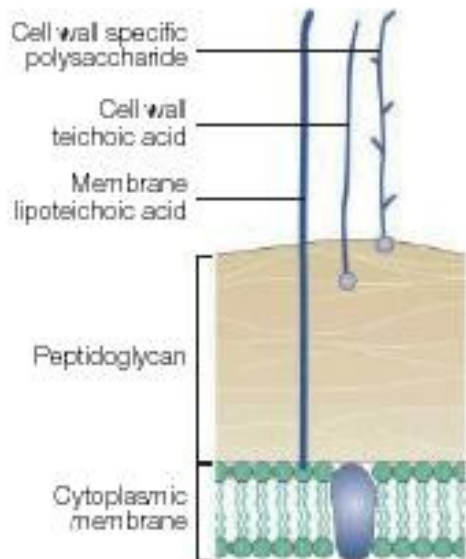
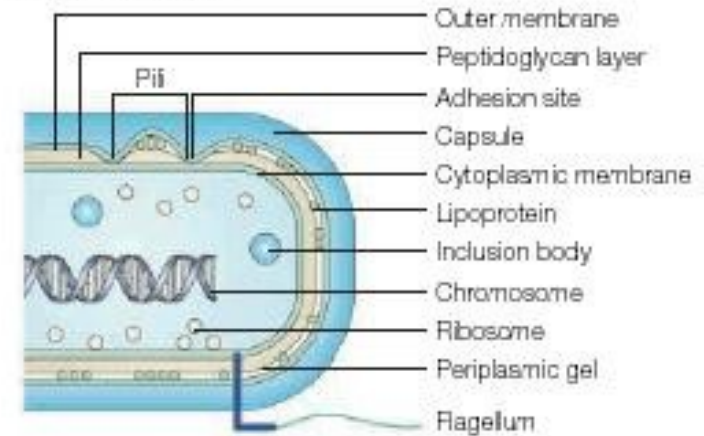
Rozbití a extrakce

Bakterie

a Gram positive



b Gram negative

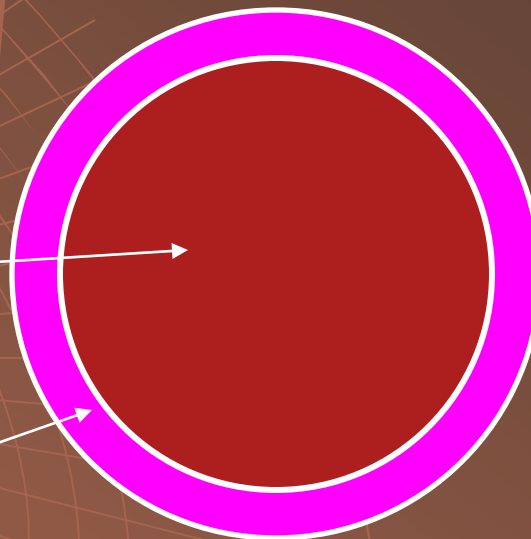


Bakterie

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

cytoplasma

periplasma



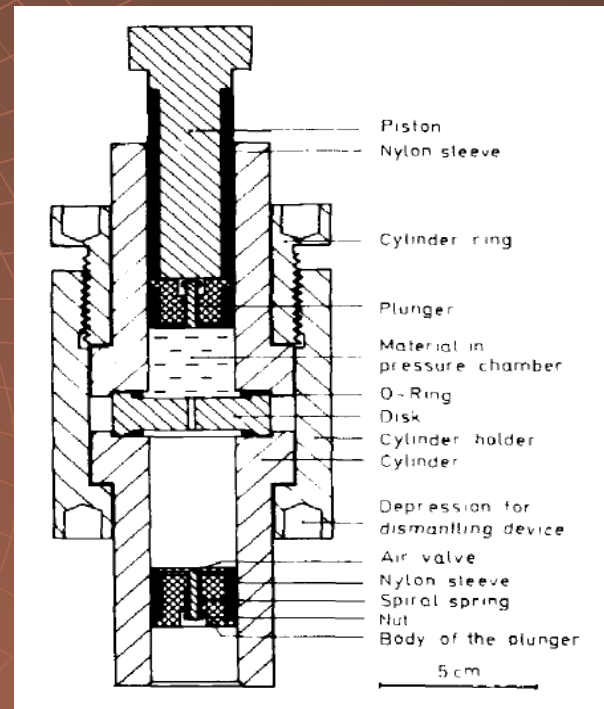
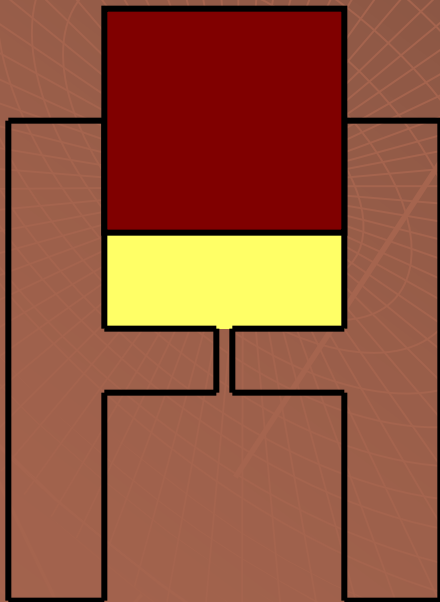
Balotina

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



French (X) press

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



French (X) press

Pressure Cells

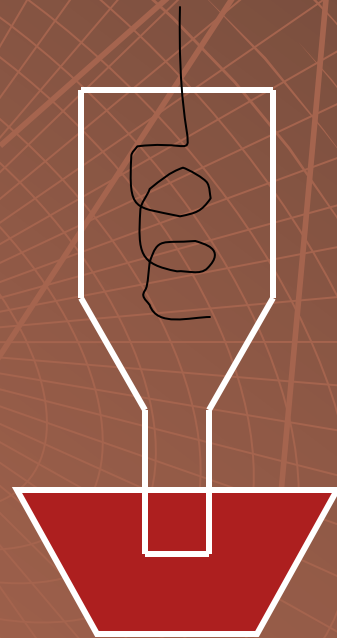


Mechanical Press



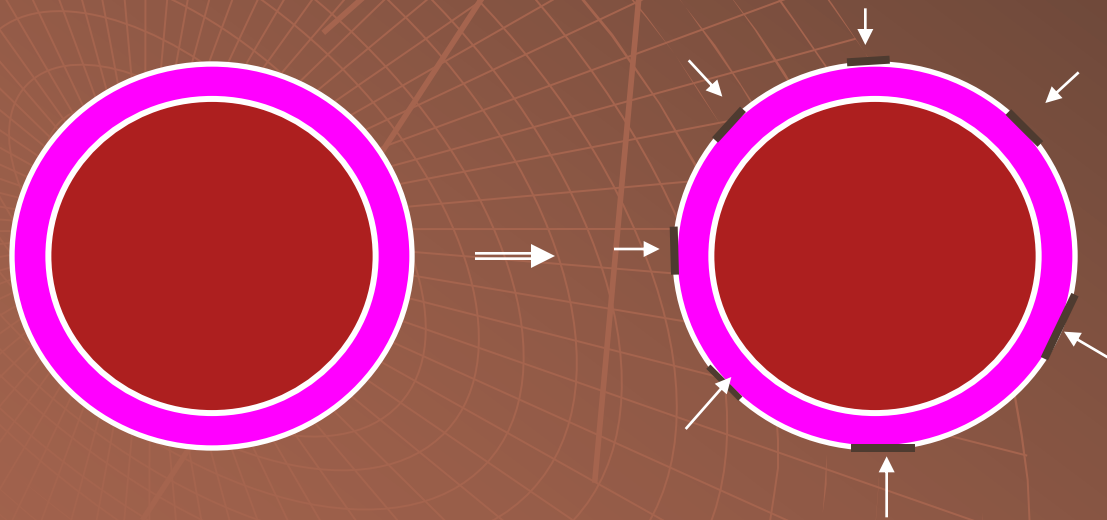
Ultrazvuk

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 H₂O – bakterie popraskají

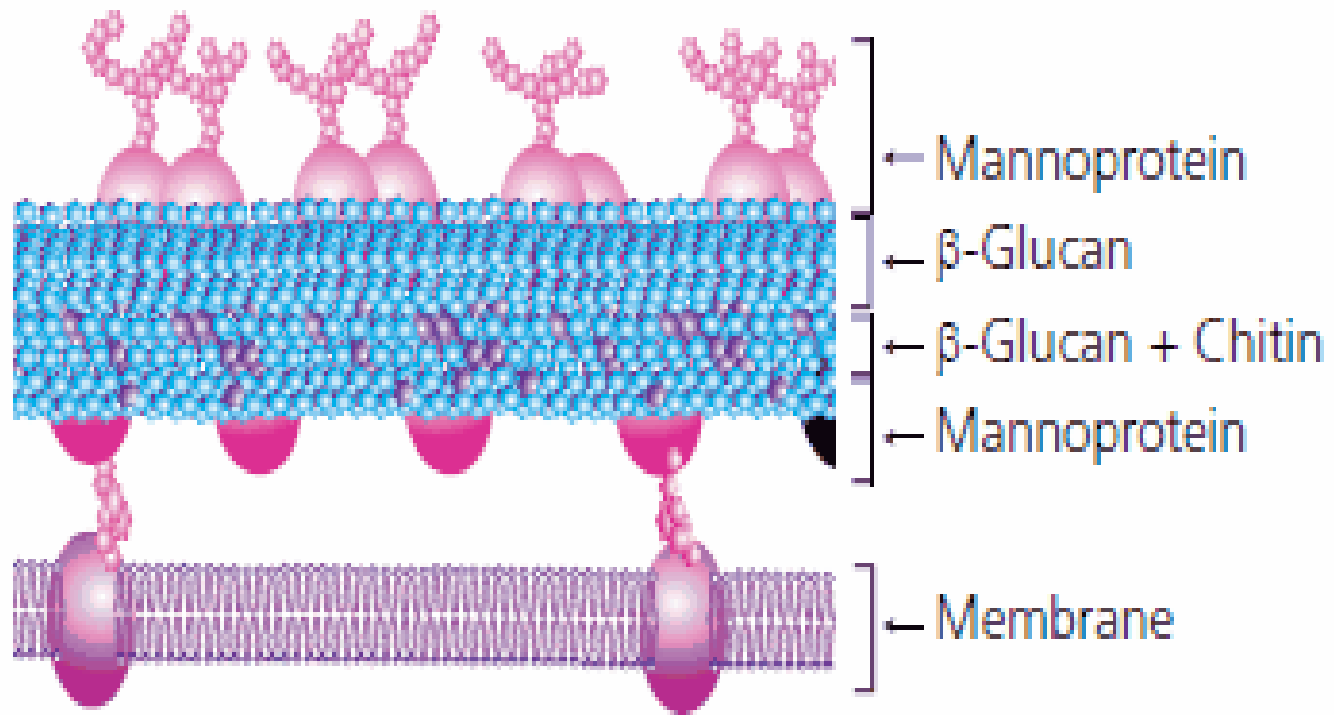


Další

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

Kvasinky

Yeast Cell Wall



Kvasinky

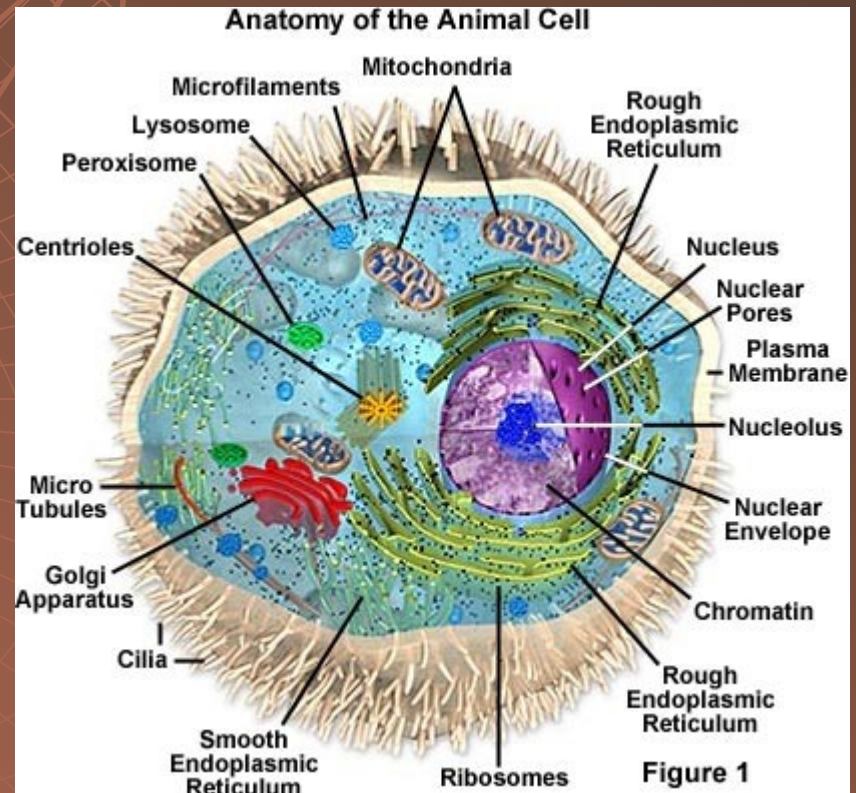
Toluenová autolýza

Princip – toluen extrahuje při 35 – 40 °C
fosfolipidy buněčné stěny
osmotický šok enzymová
autolýza

Balotina, French press,

Živočišné tkáně

- ◆ Bez buněčné stěny
- ◆ Velmi křehké
- ◆ Tkáňové kultury

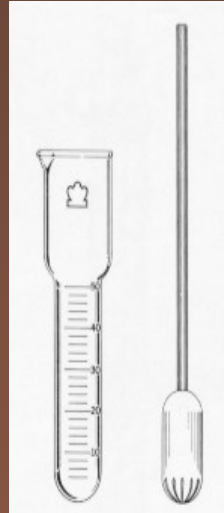


Živočišné tkáně

- ◆ Třecí miska s pískem



- ◆ Ruční homogenizatory – Potter – Elvehjemův

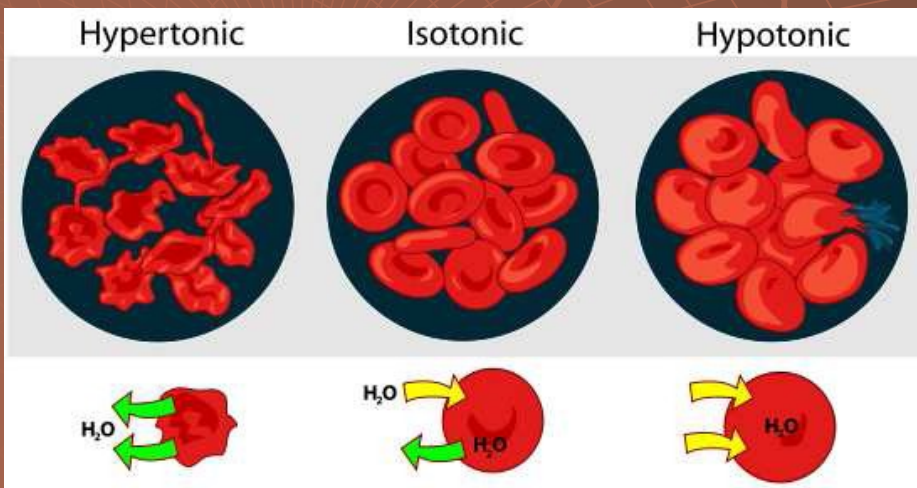


Živočišné tkáně

- ◆ Mixery

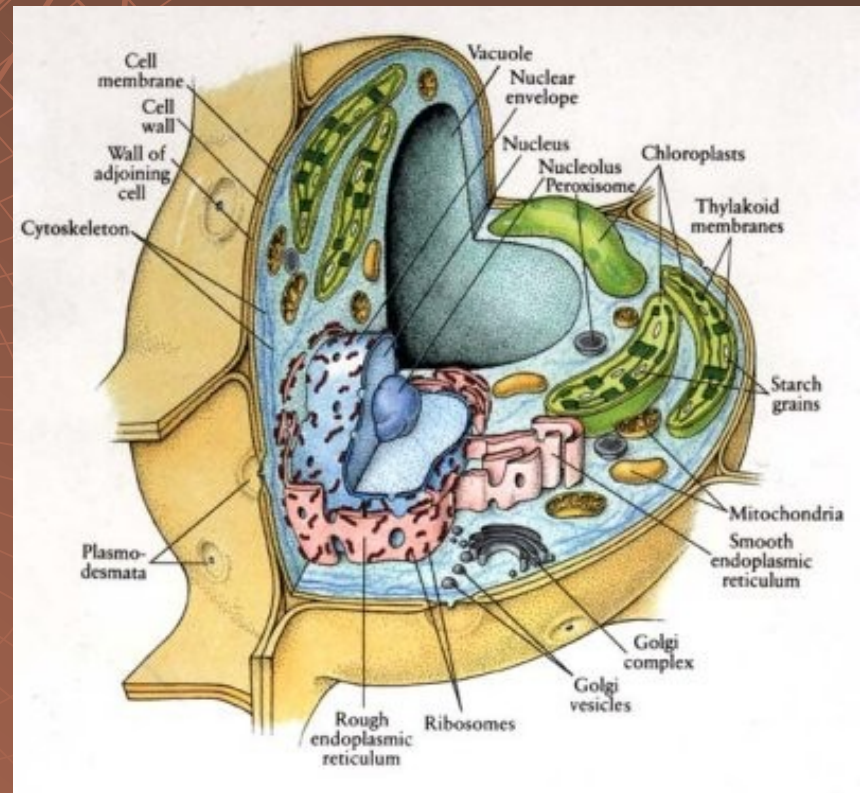


- ◆ Osmotická lyse - erythrocyty



Rostlinné tkáně

- ◆ Silná buněčná stěna - celuloza
- ◆ 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 °C chlazení
- ◆ pH – optimální pro danou bílkovinu – práce v pufrech
- ◆ I – v prostředí o definované iontové síle
- ◆ Přídavky látek – ■ merkaptoethanol, EDTA, kovové ionty, inhibitory proteas

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 (<i>inhibits serine and cysteine proteases with trypsin-like specificity</i>)				
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-Na₂	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

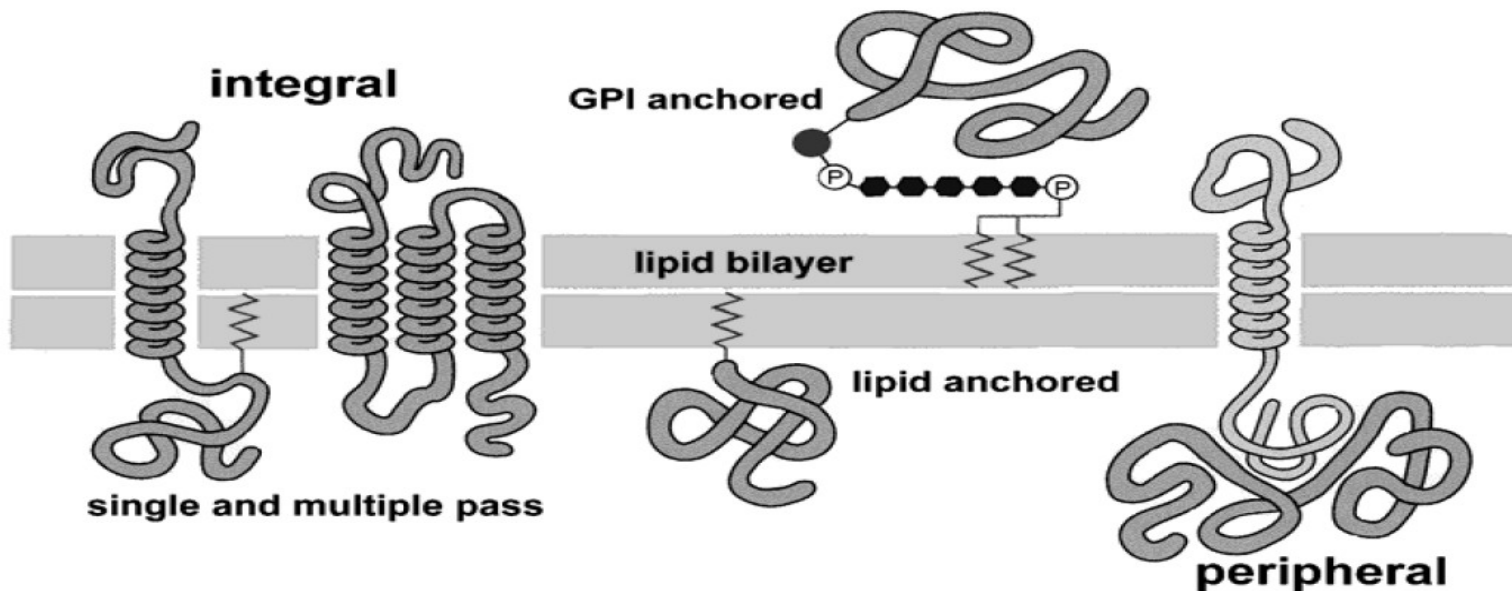
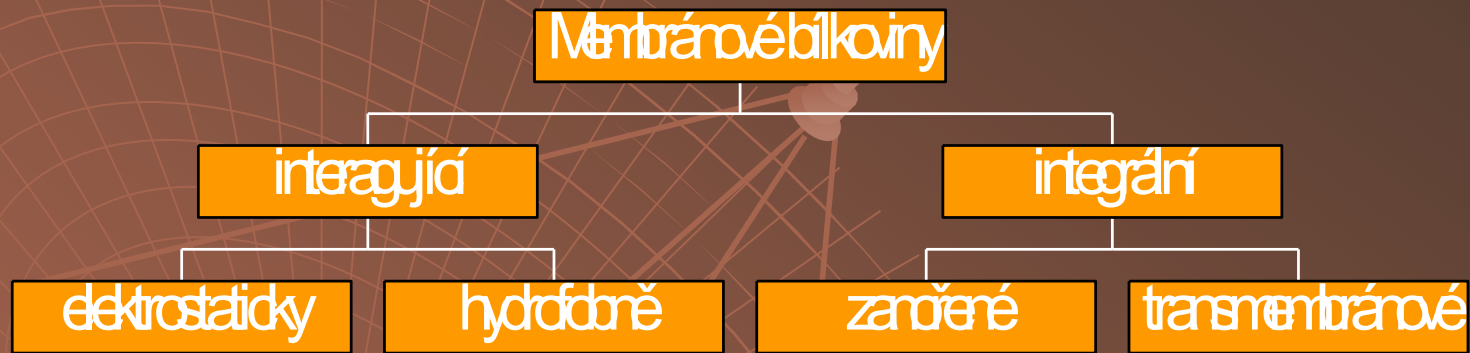
Separace subcelulárních organel

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

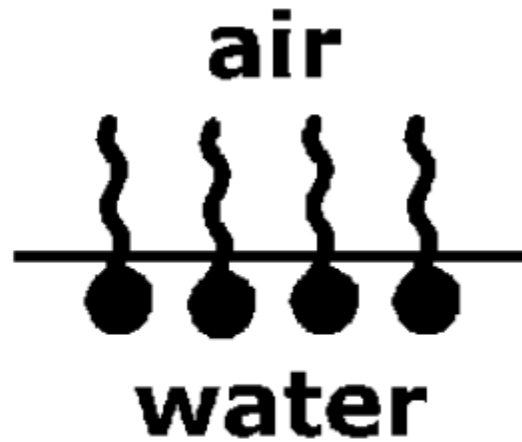


Izolace membránových bílkovin

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







Detergency

CMC



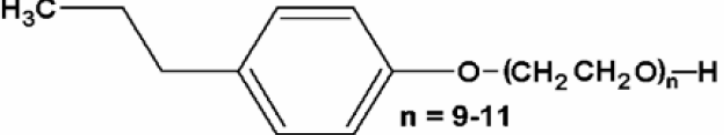
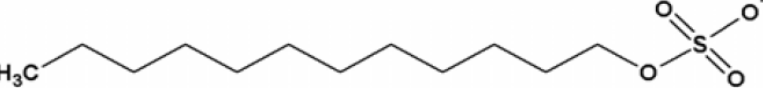
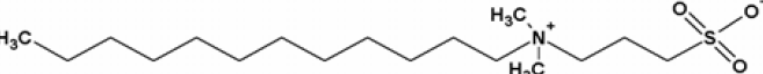
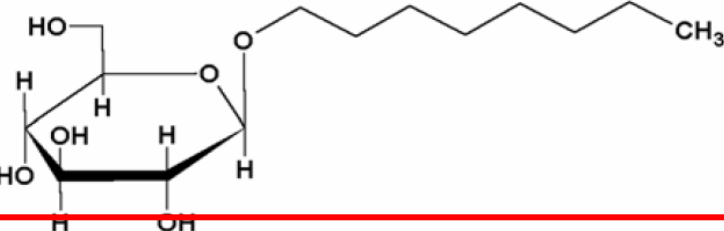
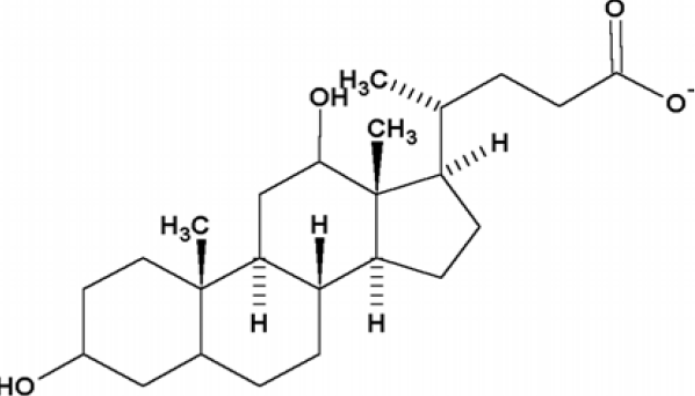
n

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 %	???	rozpuští membrány, tvoří komplex s DNA, odstranění polysacharidů
NEIONOGENNÍ					
Triton X-100 [octylphenolpoly(ethylenglyco lether).]	0,2	647 n=10	1 – 5 mM		solubilizace proteinů
Tween 20 [poly(oxyethylene) _n sorbitan-monolaurate]	0,06		> 10 mg/mg membr. lipid;		imunoblotty, ELISA
AMFOTERNÍ					
CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)	4	614,9	6,5-13 mM		solubilizace membránových proteinů

Detergency

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)