

# Biochemické metody



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Literatura

## Understanding Bioanalytical Chemistry

Principles and Applications

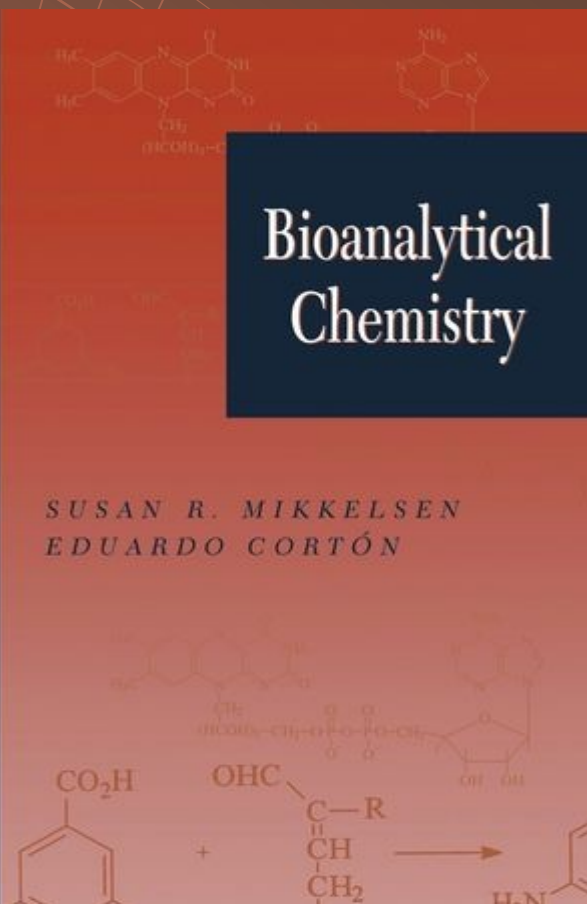


Victor A. Gault and Neville H. McClenaghan

WILEY-BLACKWELL

## Bioanalytical Chemistry

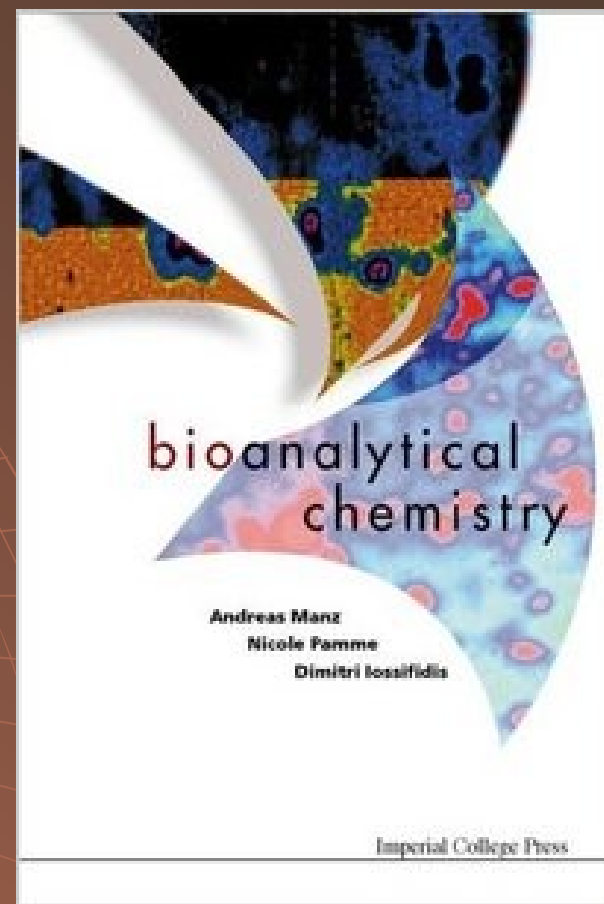
SUSAN R. MIKKELSEN  
EDUARDO CORTÓN



## 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.*

# Separační metody

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



# Separace

◆ Analytické

kvalitativní

kvantitativní

◆ Preparativní

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

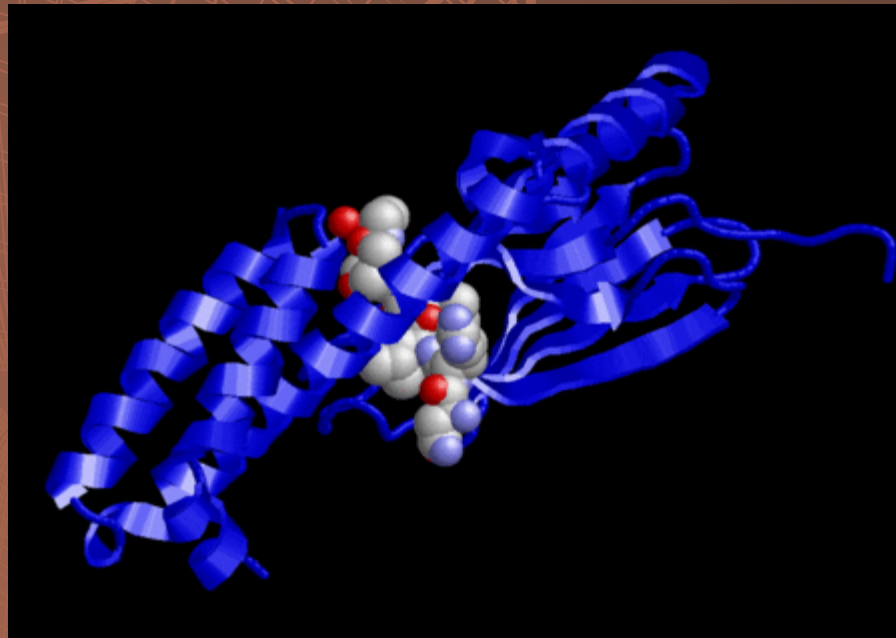
# Problémy se vzorkem

- ◆ Komplexnost
- ◆ Malá množství
- ◆ Labilita

# Zásady pro práci s biologickým materiálem

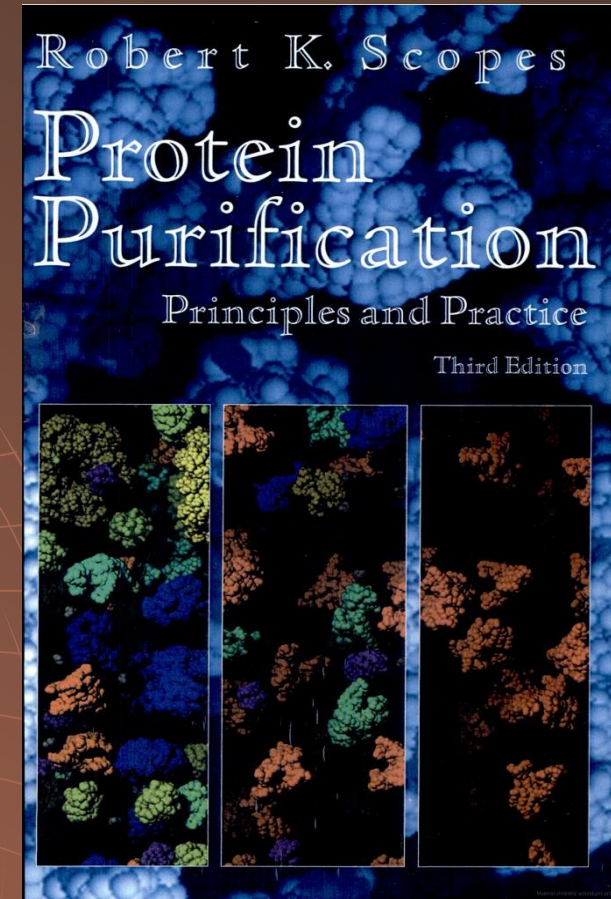
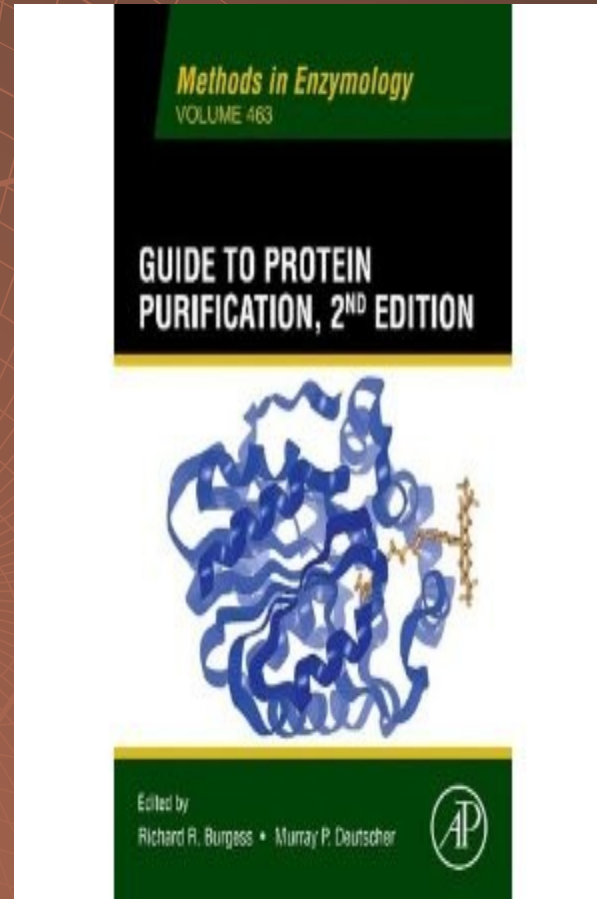
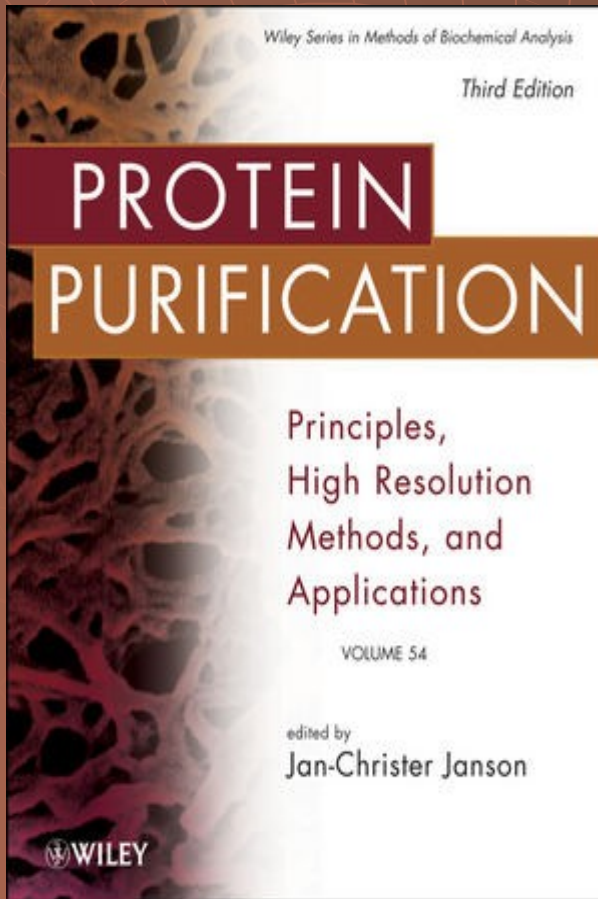
1. Teplota
2. pH + iontová síla
3. Koncentrace
4. Pěnění
5. Lokální přebytky
6. Proteasy, RNAsy, DNAsy

# 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



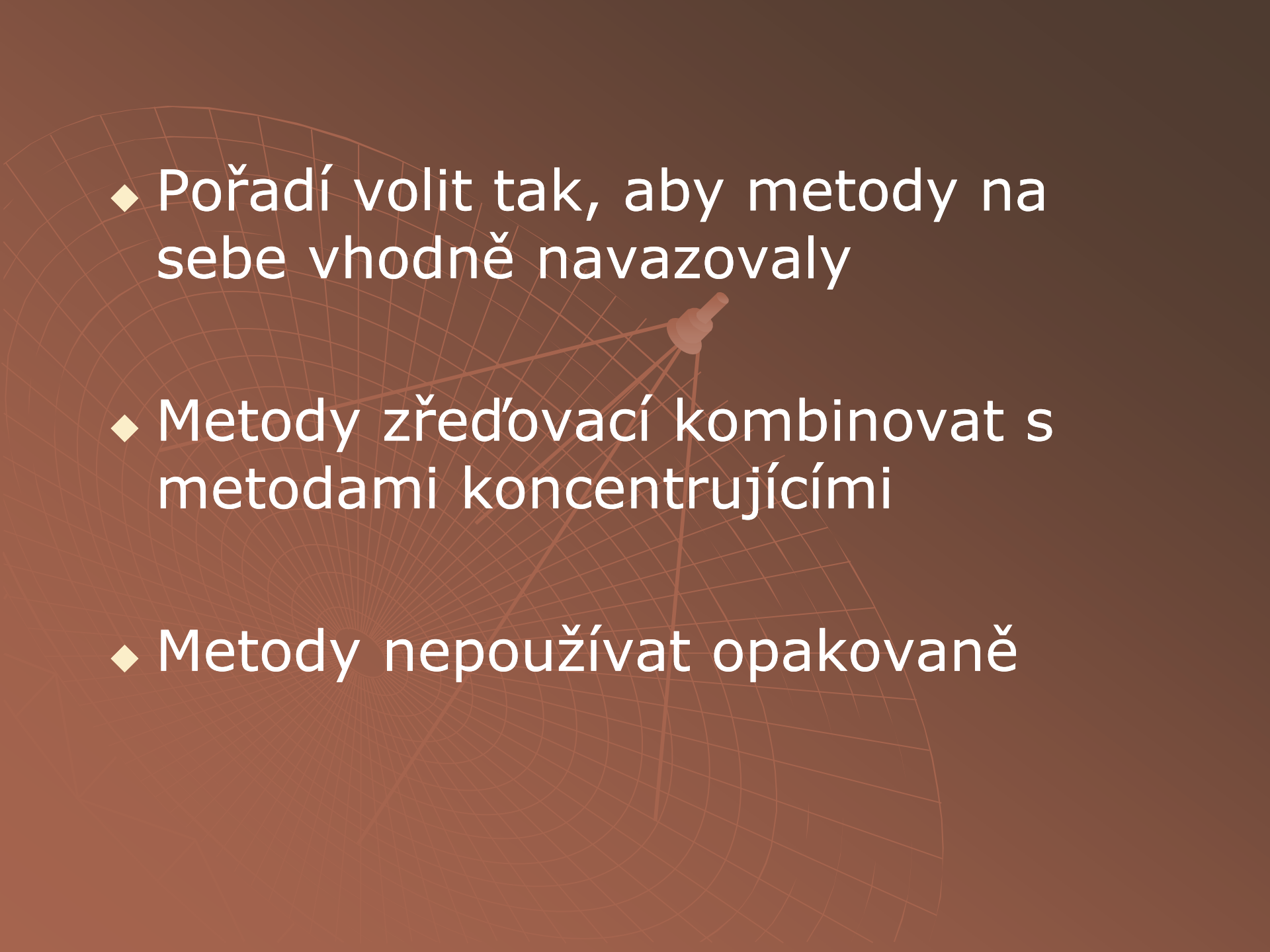
# Volba a kombinace separačních metod

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



# Základní zásady

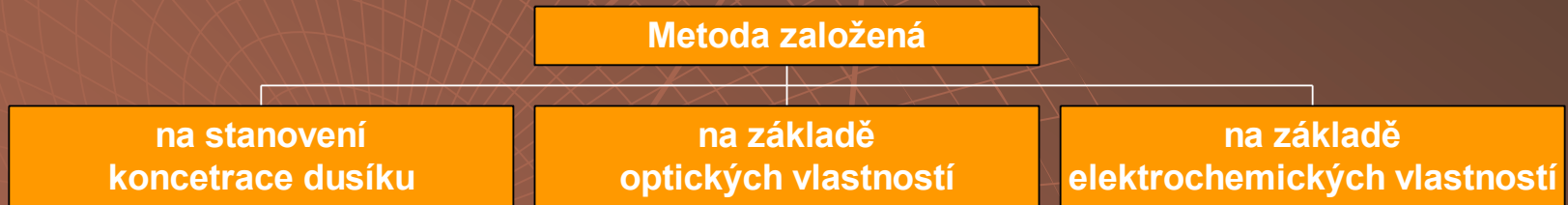
- ◆ Na začátek zařadit metody s vysokou kapacitou a malým výtěžkem a rozlišením ■ velké množství levného vstupního materiálu
- ◆ Později metody s vysokým rozlišením a výtěžkem, kapacita méně významná ■ vzorku již investovaná práce

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

# Sledování průběhu separace

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 %

# Stanovení koncentrace bílkoviny



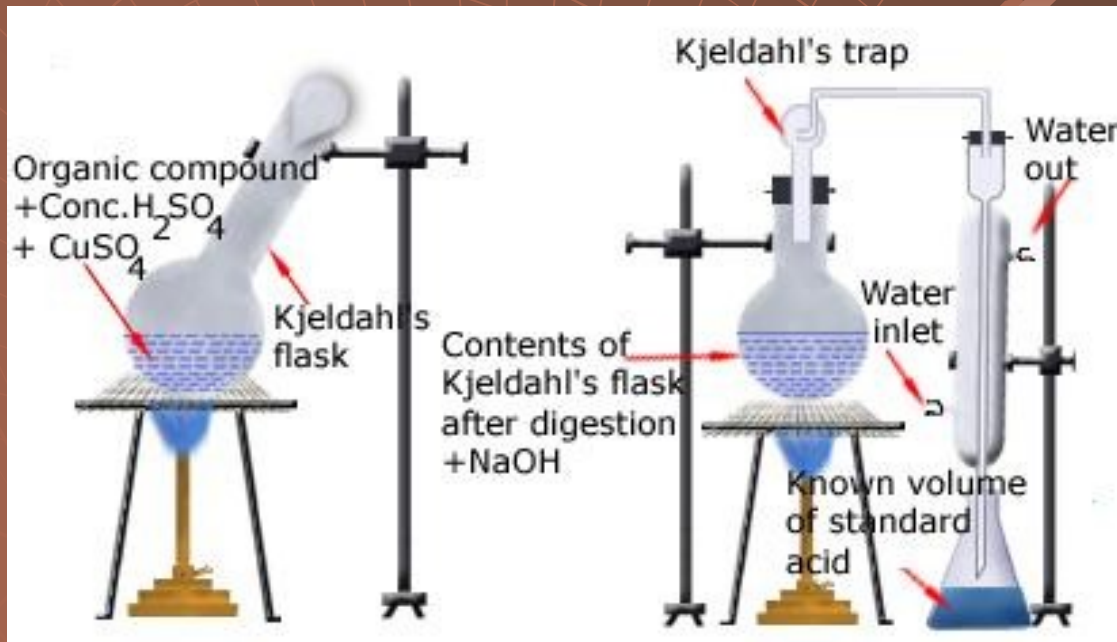
# Kjeldahlova metoda – stanovení



- ◆ Mineralizace vzorku – převedení organického N na  $\text{NH}_4^+$
- ◆ Stanovení  $\text{NH}_4^+$  - titrace, fotometrie, selektivní elektrody



# Kjeldahlova metoda – stanovení $N_2$

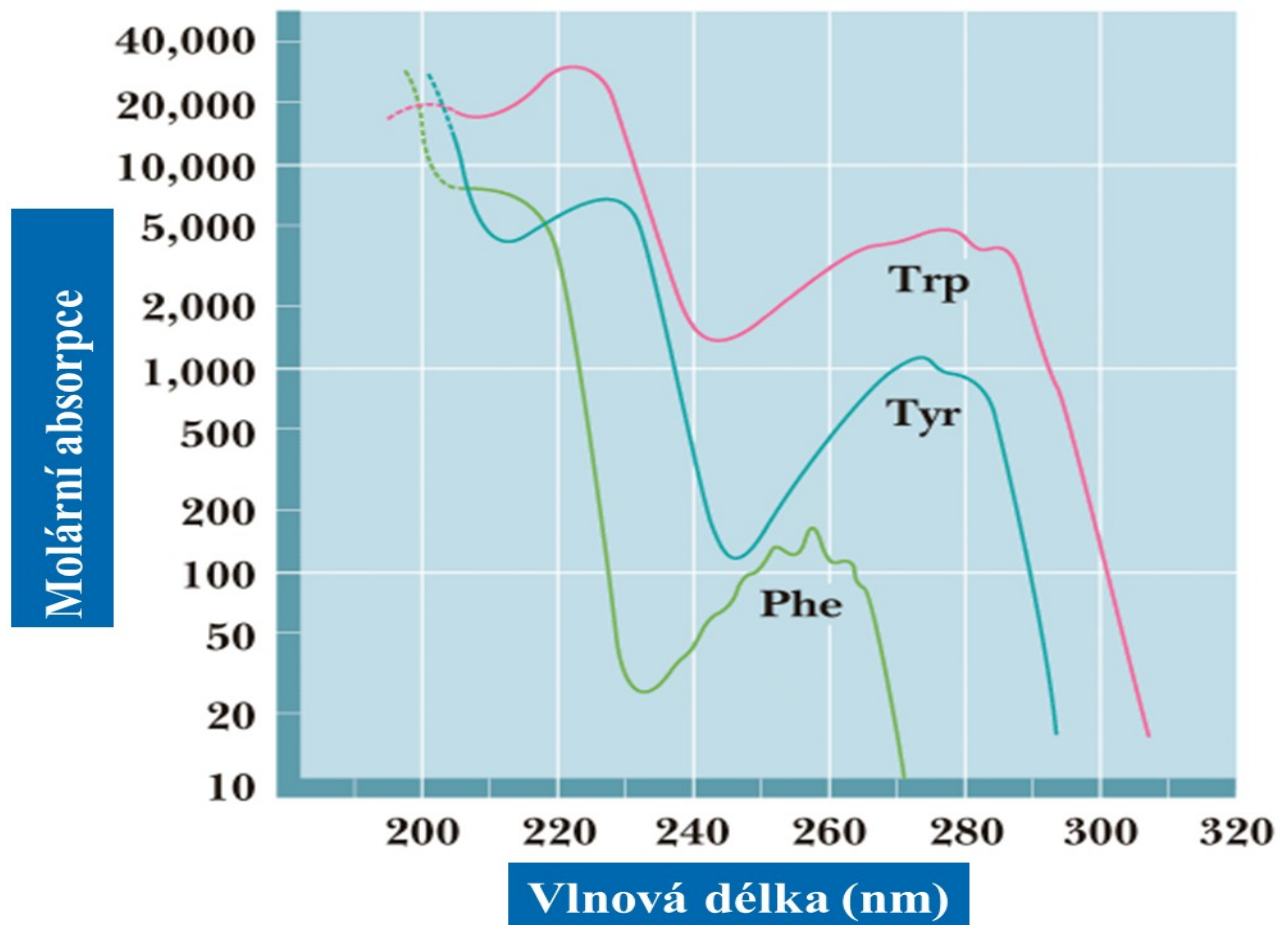


# UV spektrofotometrie

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

Výhody - nedestruktivní metoda  
- není třeba kalibrace

# UV spektrofotometrie



# UV spektrofotometrie

## 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

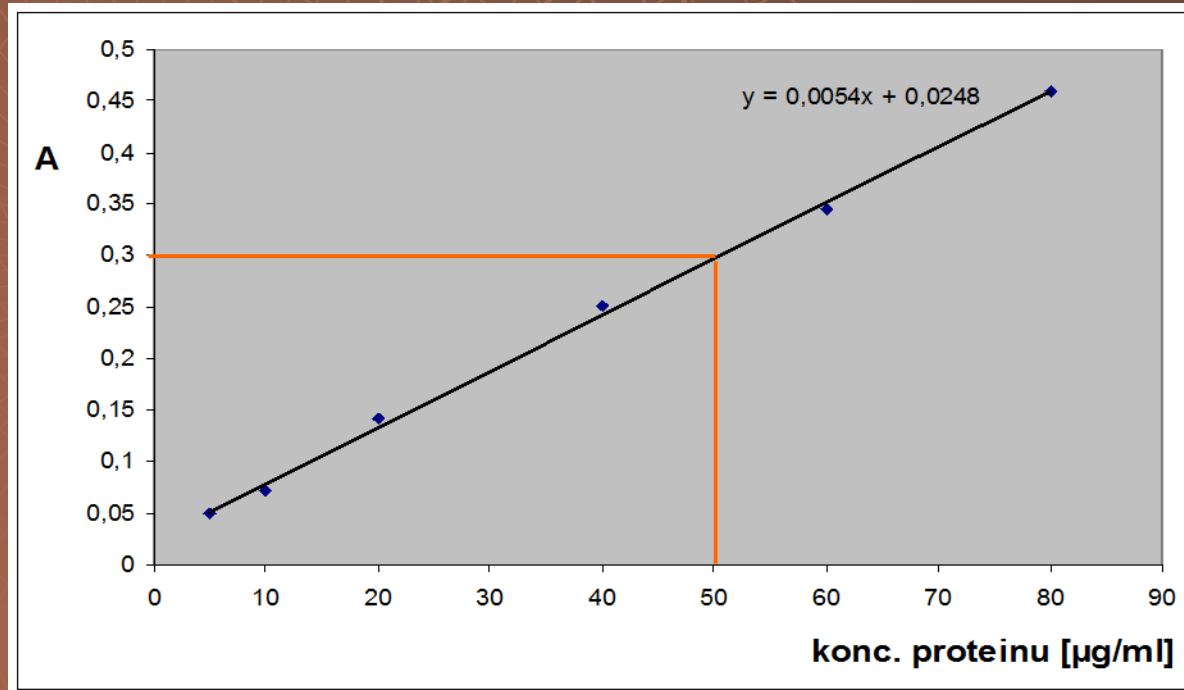
**při znalosti aminokyselinového složení** je možné spočítat extinkční koeficient proteinu  $e_{280}$ . Podmínkou je přítomnost tryptofanu nebo tyrosinu v molekule.

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



# VIS spektrofotometrie

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

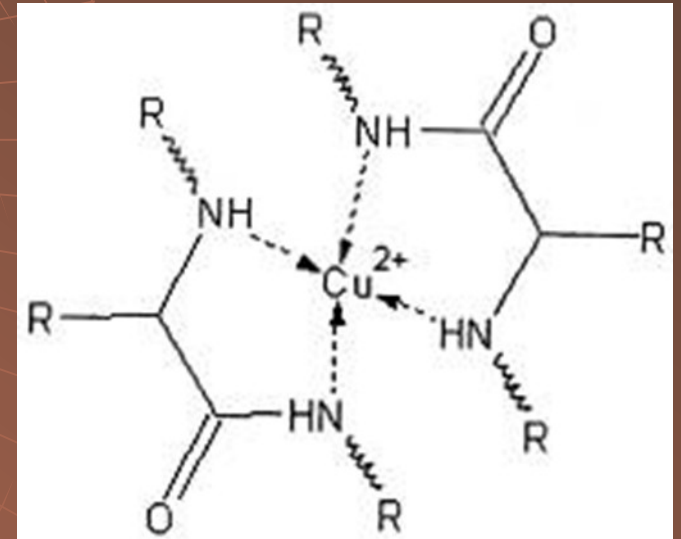


# Biuretová metoda

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



Měření : 540 – 560 nm  
310 nm



# Folinova metoda

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

Měření : 725 nm

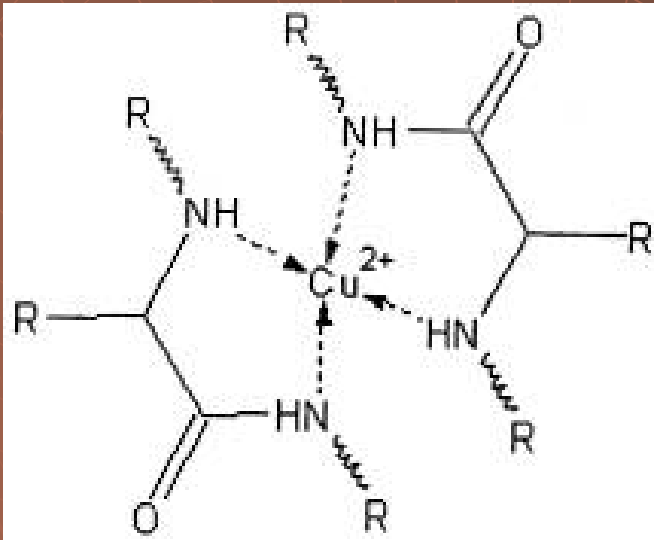


# Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a  
Biuretové metody

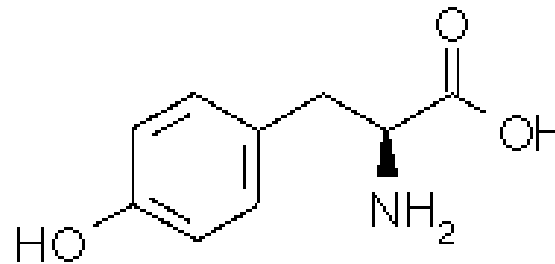
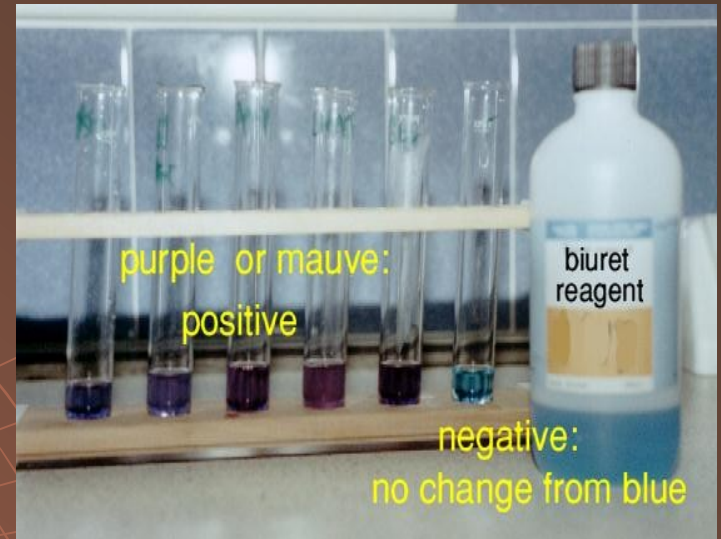
Měření : 600 nm

# Lowryho metoda



•biuret ↑

•Lowry ↓



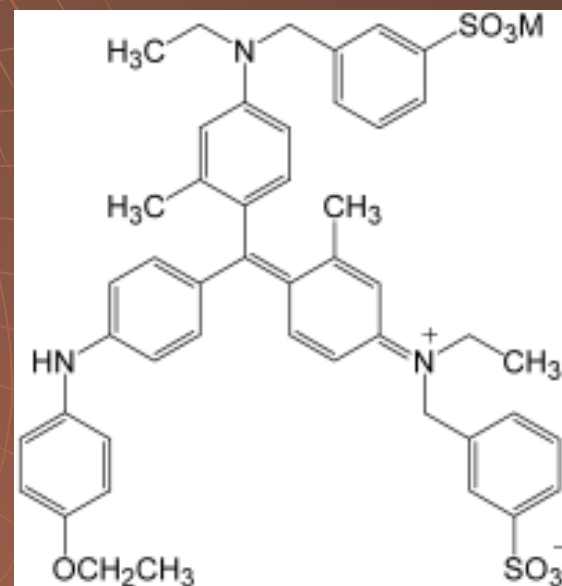
tyr y Tyrosin



# Metoda dle Bradfordové

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

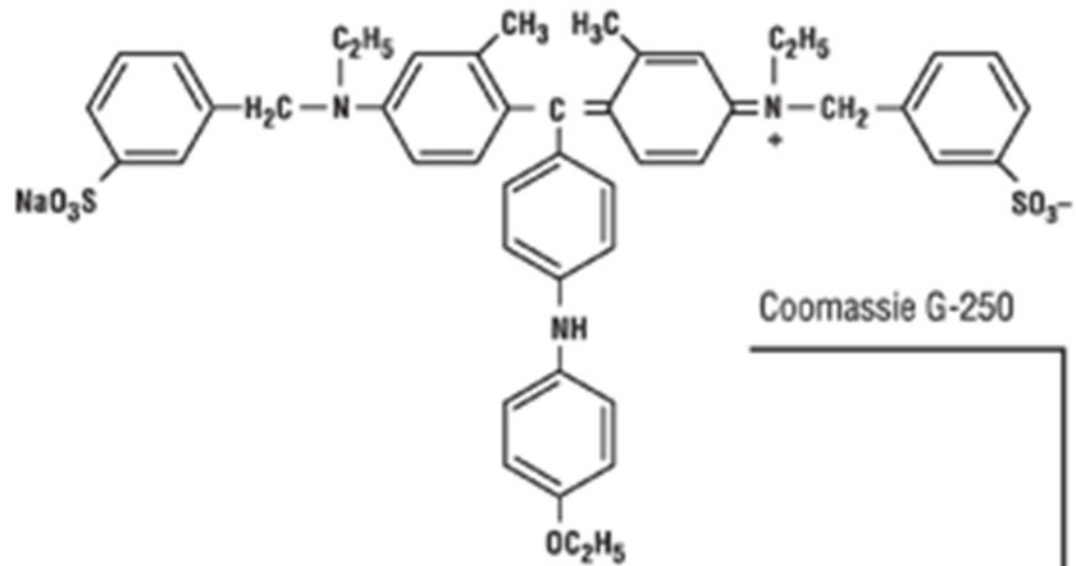
Meření : 595 nm



# Metoda dle Bradfordové

**PROTEIN**  
Basic and Aromatic  
Side Chains

+



Coomassie G-250

465 nm

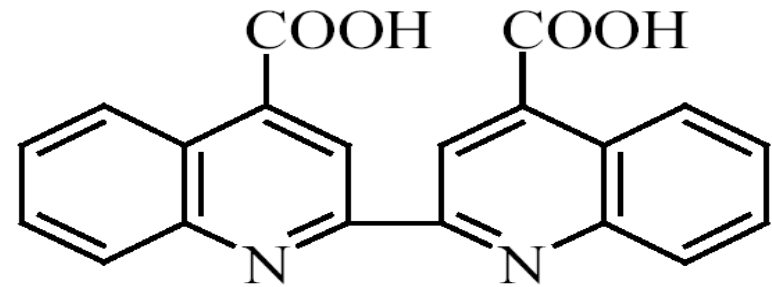


A<sub>max</sub> = 595 nm

Protein-Dye Complex

# BCA metoda

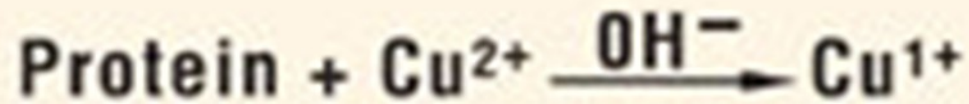
Princip :  $\text{Na}^+$  sůl k. bicinchoninové (BCA), komplexuje  $\text{Cu}^+$  tvořené reakcí peptidové vazby s  $\text{Cu}^{2+}$



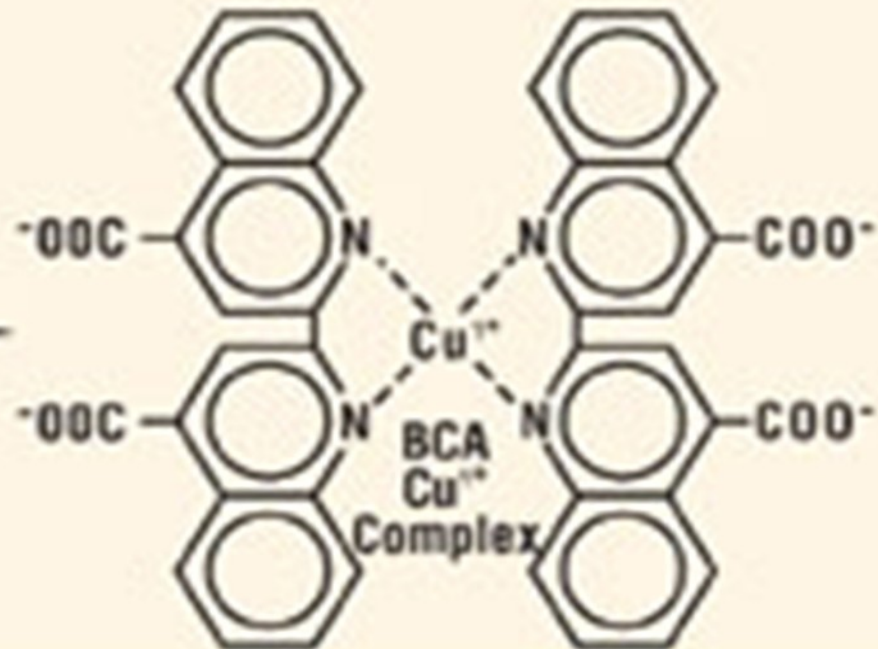
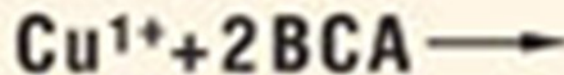
Měření : 562 nm

# BCA metoda

## STEP 1.



## STEP 2.

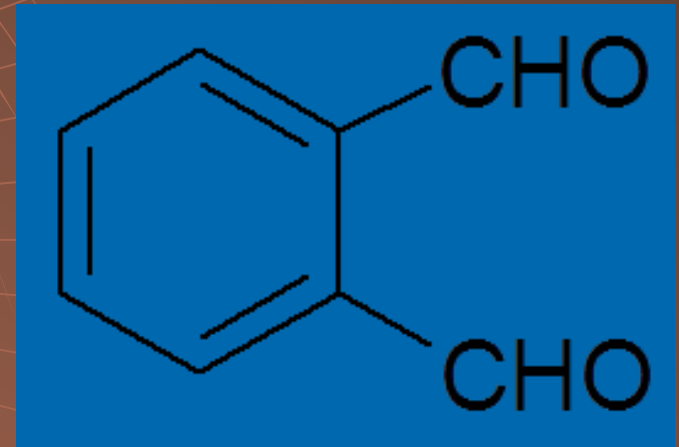




# Fluorescence

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

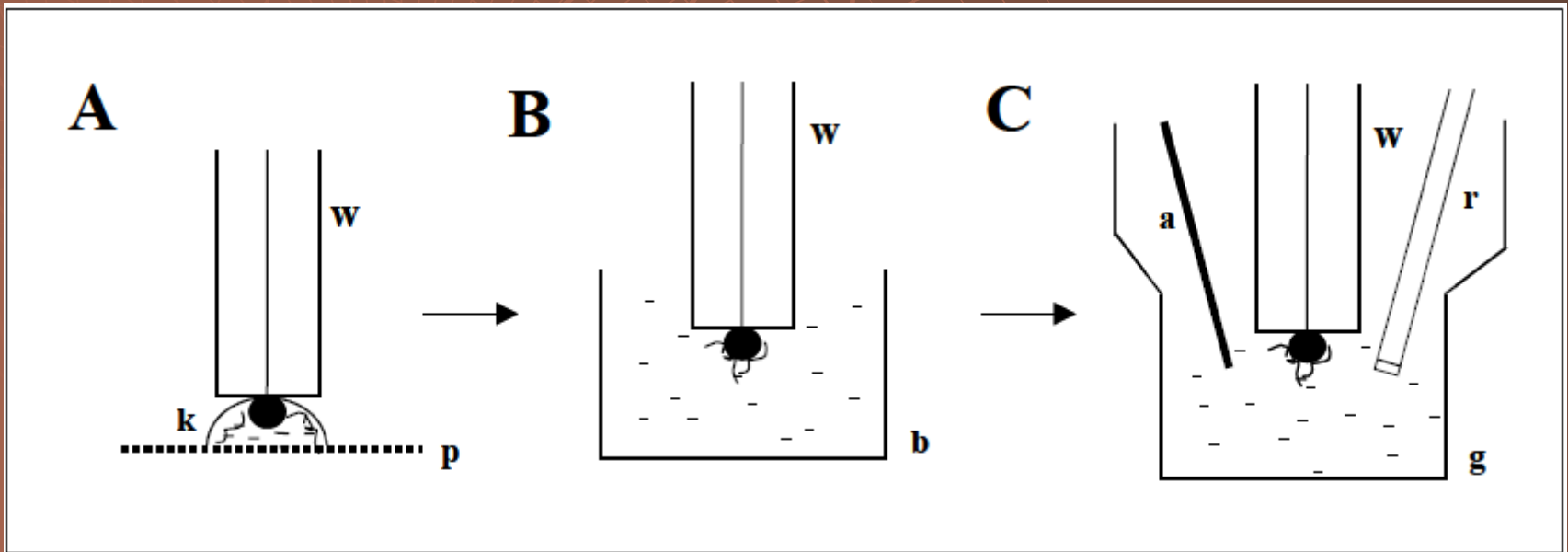
Měření : exc.340 nm  
em.440 nm



- zhasení fluorescence přidavkem  
bílkoviny

# Polarografie

Princip : Brdičkova reakce – SH skupiny bílkoviny vstupují v přítomnosti  $\text{Co}^{2+}$  katalytické reakce na Hg elektrodě ████ roud



# Nejčastěji používané metody

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

# Nejčastěji používané metody

<b>Stanovení</b>	<b>Citlivost</b>	<b>Přesnost</b>	<b>Interference</b>
<b>Biuret</b>	0 – 1 mg	Vysoká, nezávislá na aminokyselino- vém složení	Aminoskupiny [Např. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ]
<b>Lowry</b>	0 – 0.1 mg	Částečně závislá na aminokyselino- vém složení	Kyseliny, chelátory (EDTA), reduktanty (DTT, phenol), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
<b>Bradford</b>	0 – 0.01 mg	Závislá na aminokyselino- vém složení	Detergenty (SDS, Triton X100, mýdlo)
<b>BCA</b>	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

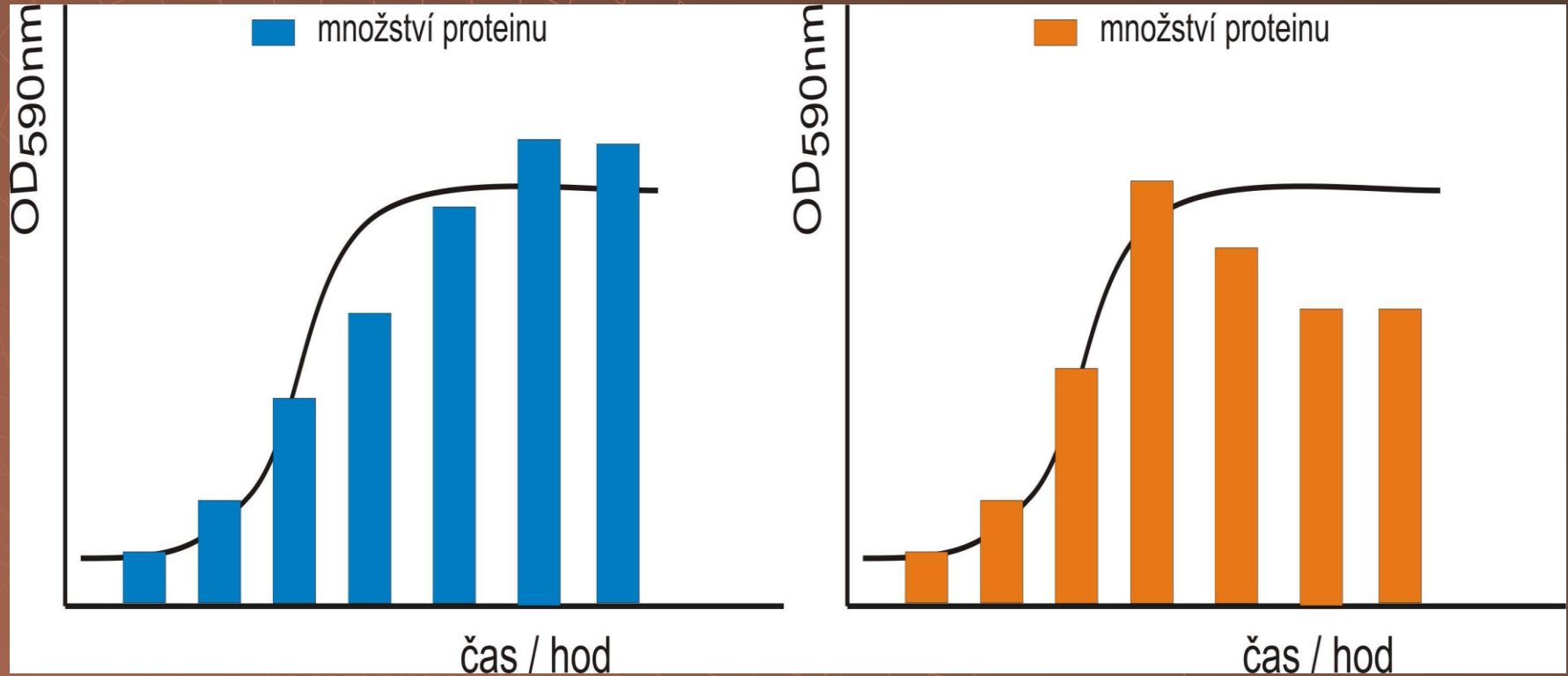


- CCM uchovává více než 3 000 kmenů bakterií (asi 1 400 druhů) a 800 kmenů vláknitých hub (přibližně 550 druhů), které nabízí ve svém Katalogu kultur.
- Specializovaná sbírka vodních hyfomycetů obsahuje asi 500 kmenů (60 rodů se 130 druhy).

# Selekce optimálních producentů

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

# Mikroorganismy





# Bezobratlí

Hmyz, plži, mlži

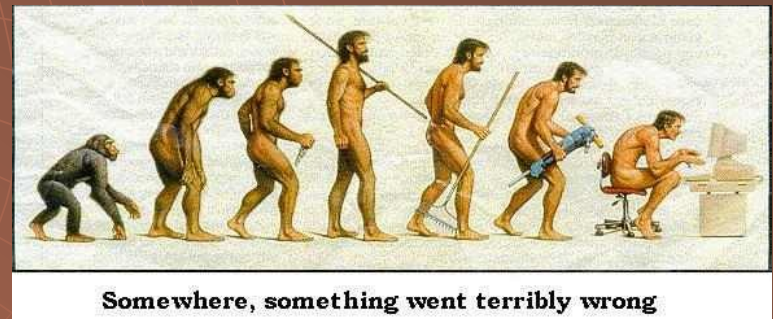
Nevýhody - málo se používá, nesnadno se získává





# 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  $-60 - 80$  °C
- ◆ Rozmrazování – co nejrychleji

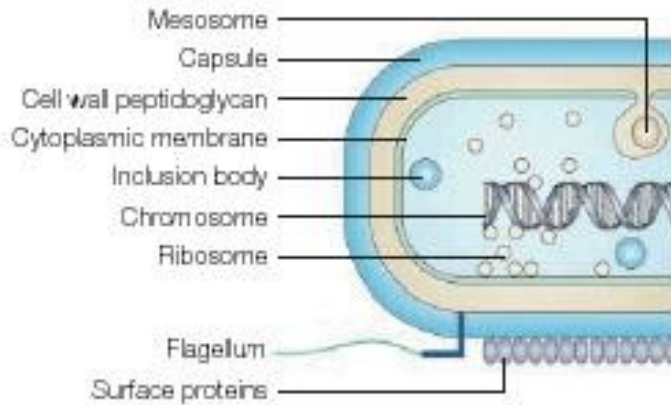




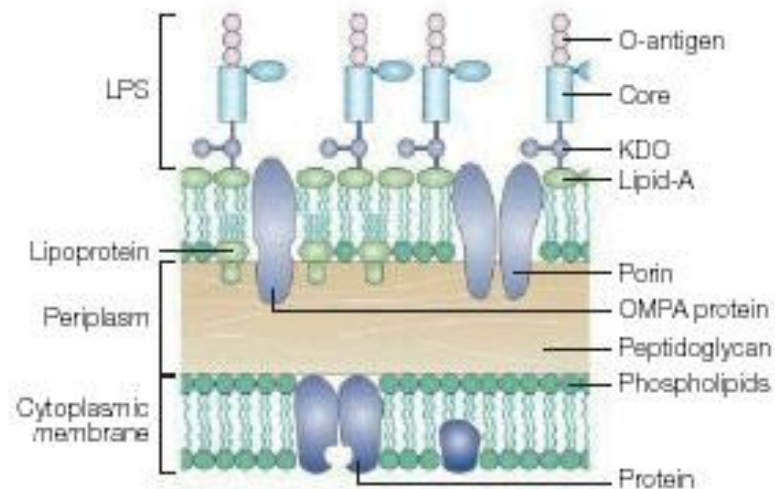
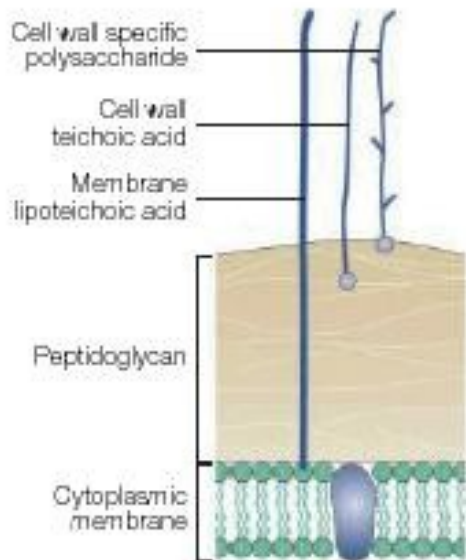
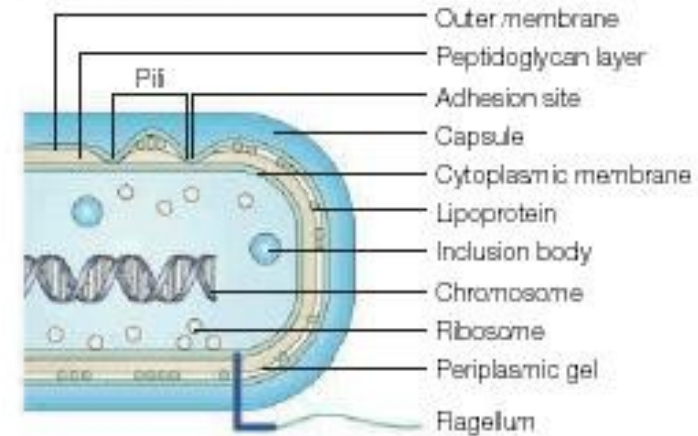
# Rozbití a extrakce

# Bakterie

**a Gram positive**



**b Gram negative**



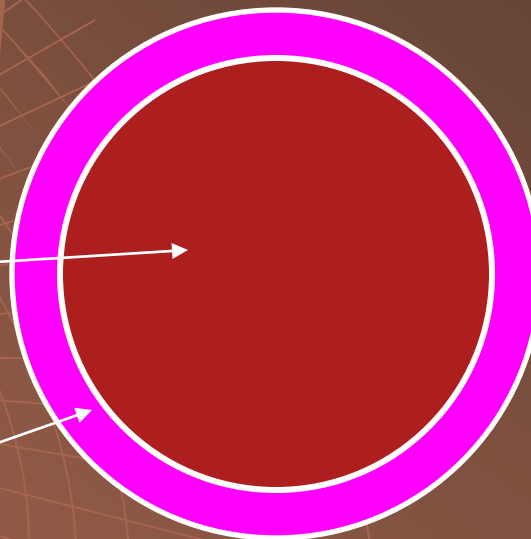


# Bakterie

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

cytoplasma

periplasma



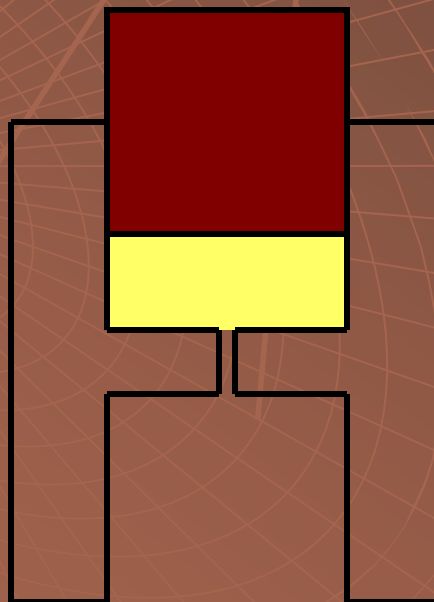
# Balotina

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

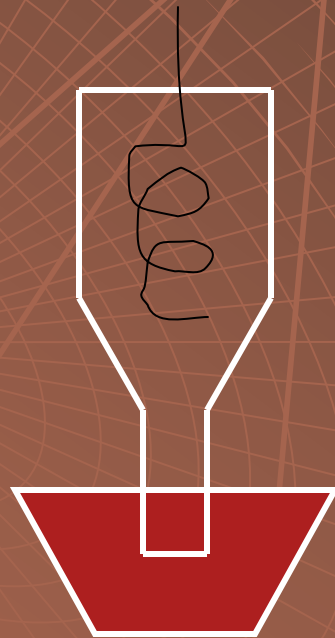


Mechanical Press



# Ultrazvuk

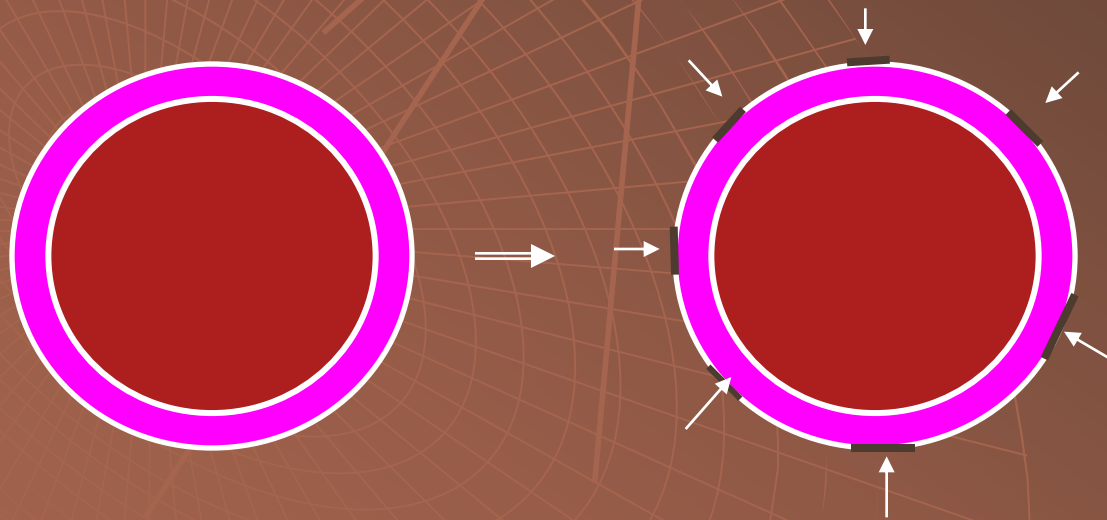
Princip – ultrazvuk ( $> 20$  kHz) v roztoku vyvolává střižní síly – nutno chladit





# Lysozym + osmotický šok (mírný osmotický šok)

Princip – lysozym rozruší buněčnou stěnu, následně je bakteriální suspenze zředěna destilovanou H<sub>2</sub>O – bakterie popraskají

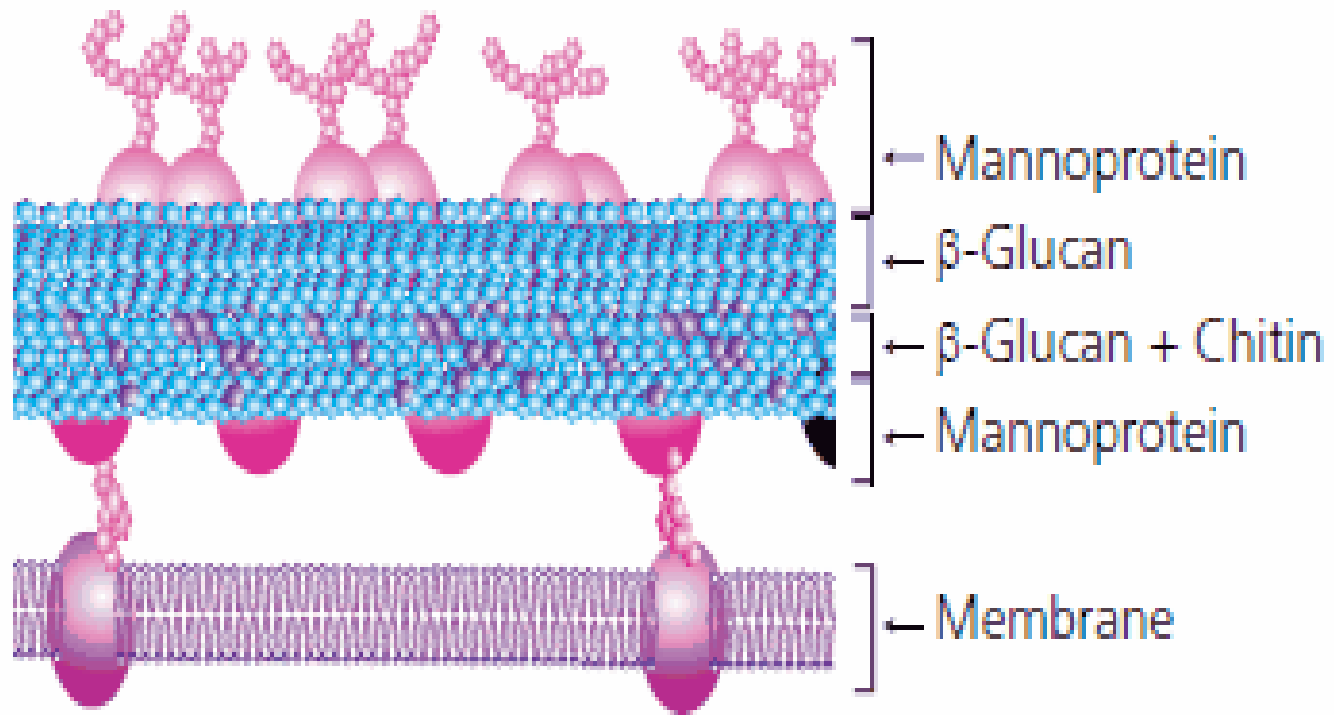


# Další

- ◆ Alumina  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – 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 ■■■ smotický šok ■■■  
enzymová autolýza

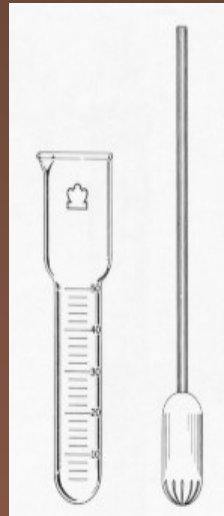
Balotina, French press,

# Živočišné tkáně

- ◆ Třecí miska s pískem



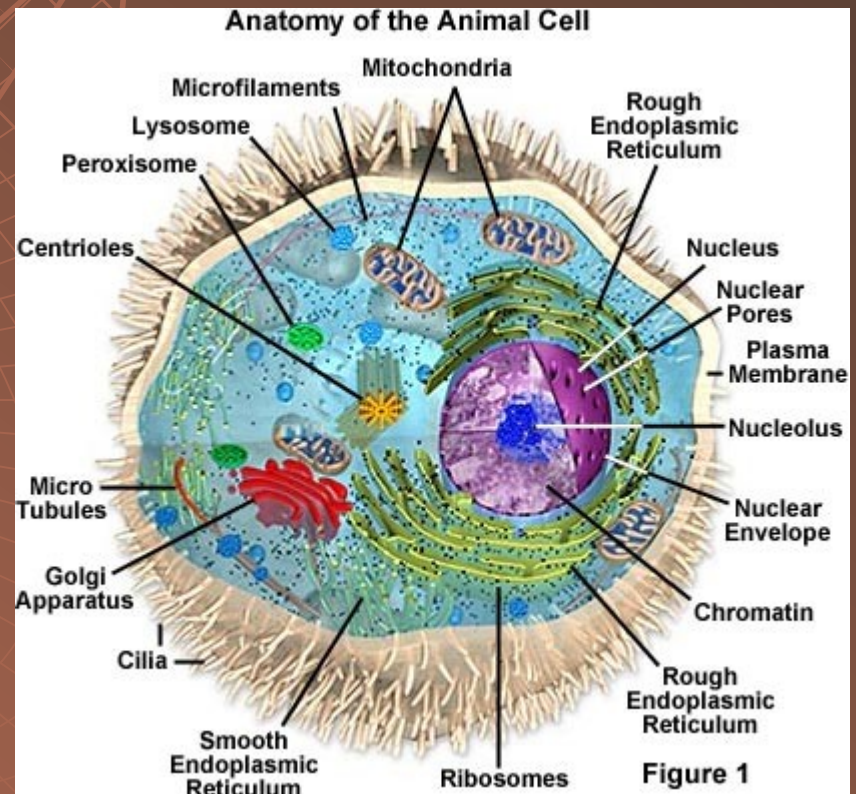
- ◆ Ruční homogenizatory – Potter – Elvehjemův





# Živočišné tkáně

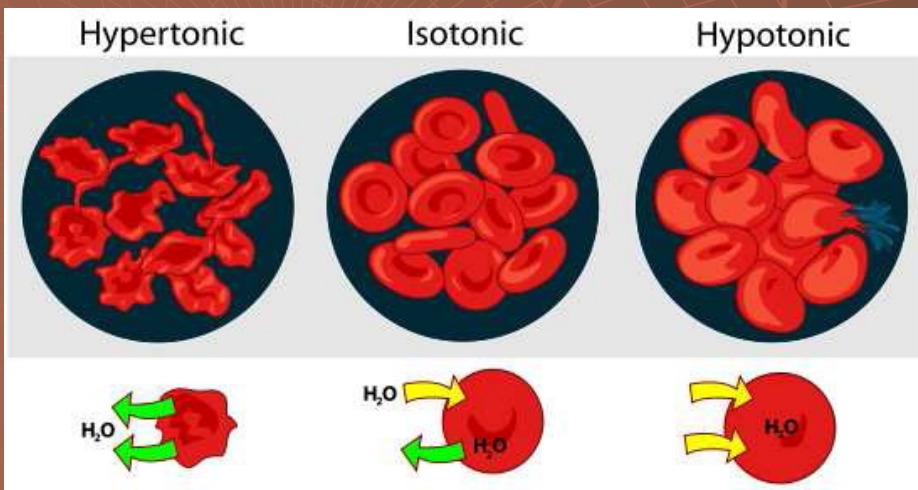
- ◆ Bez buněčné stěny
- ◆ Velmi křehké
- ◆ Tkáňové kultury



# Živočišné tkáně

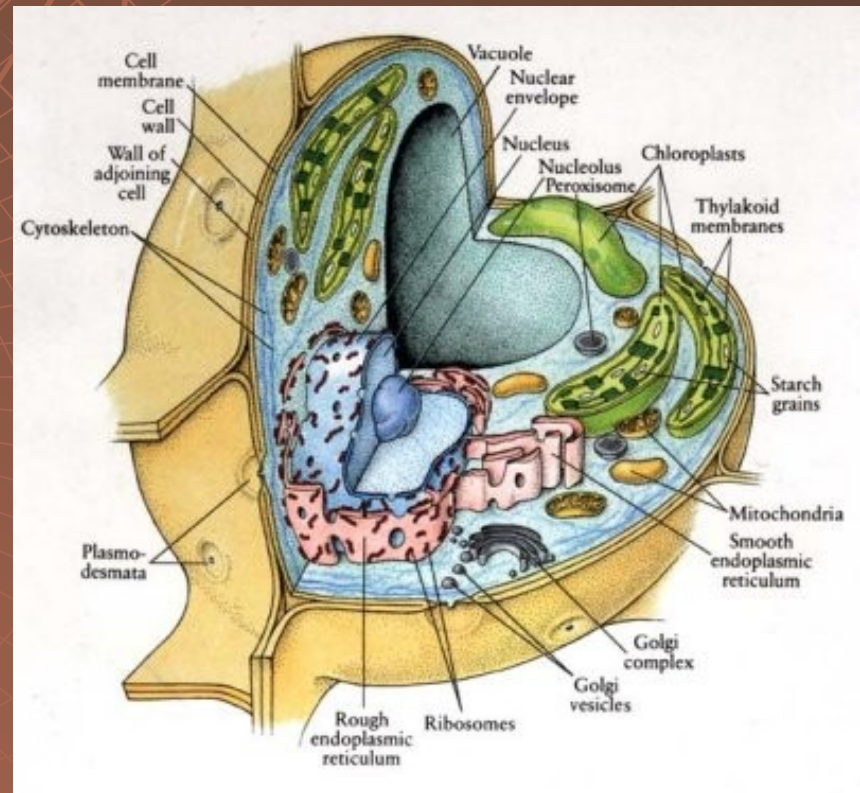
- ◆ Mixery

- ◆ 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



# 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 – EDTA, ■  
merkaptoethanol, kovové ionty,  
inhibitory proteas

# Inhibitory proteas

Protease Inhibitor	General inhibitors for			
	Serine proteases <sup>a</sup>	Cysteine proteases <sup>b</sup>	Metallo-proteases <sup>c</sup>	Aspartic proteases <sup>d</sup>
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				
<b>cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets*</b>				
<b>cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*</b>				
$\alpha_2$ -Macroglobulin				

Inhibitors included in the set	Specificity of inhibition	Quantity Supplied
<b>Antipain-dihydrochloride</b>	Papain, Trypsin, Cathepsin A and B	3 mg
<b>Aprotinin</b>	Trypsin, Plasmin, Chymotrypsin, Kallikrein	0.5 mg
<b>Bestatin</b>	Aminopeptidases	0.5 mg
<b>Chymostatin</b>	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -Chymotrypsin	1 mg
<b>E-64</b>	Cysteine Proteases	3 mg
<b>EDTA-Na<sub>2</sub></b>	Metalloproteases	10 mg
<b>Leupeptin</b>	Serine and Cysteine Proteases such as Plasmin, Trypsin, Papain, Cathepsin B	0.5 mg
<b>Pefabloc SC</b>	Serine Proteases	20 mg
<b>Pepstatin</b>	Aspartic Proteases	0.5 mg
<b>Phosphoramidon</b>	Metalloproteinases, specifically Thermolysin	3 mg

# Separace subcelulárních organel

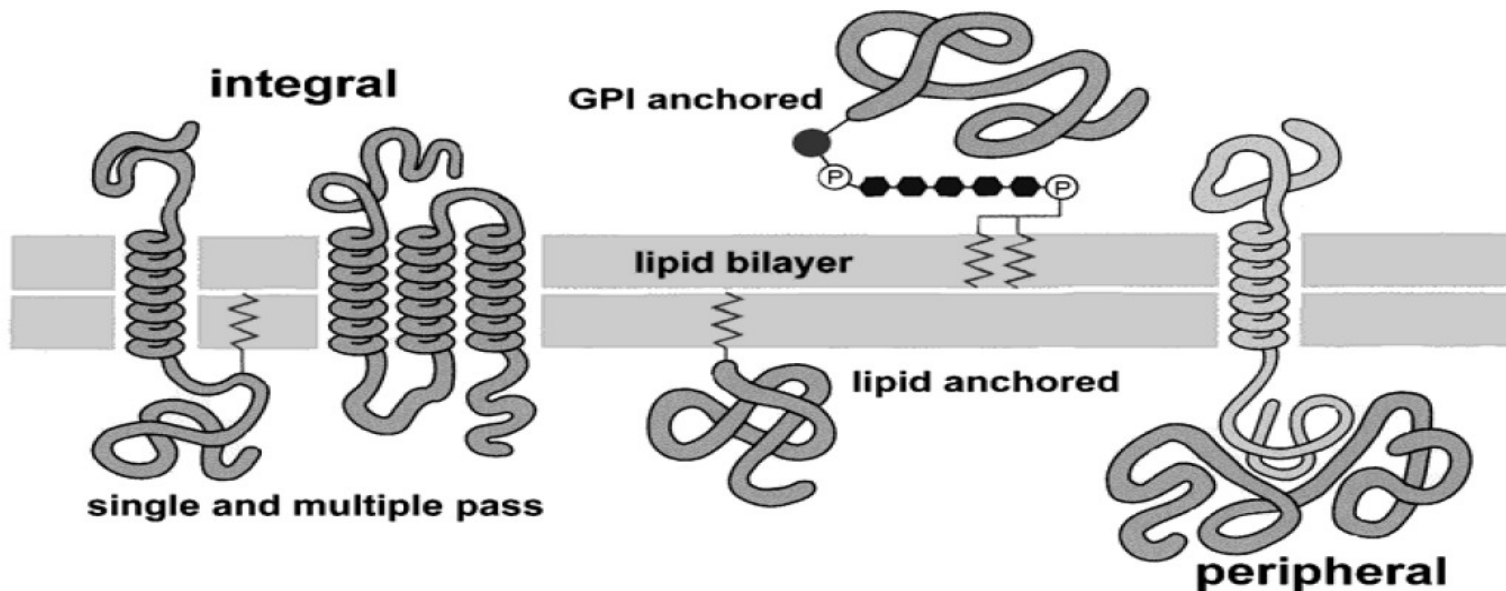
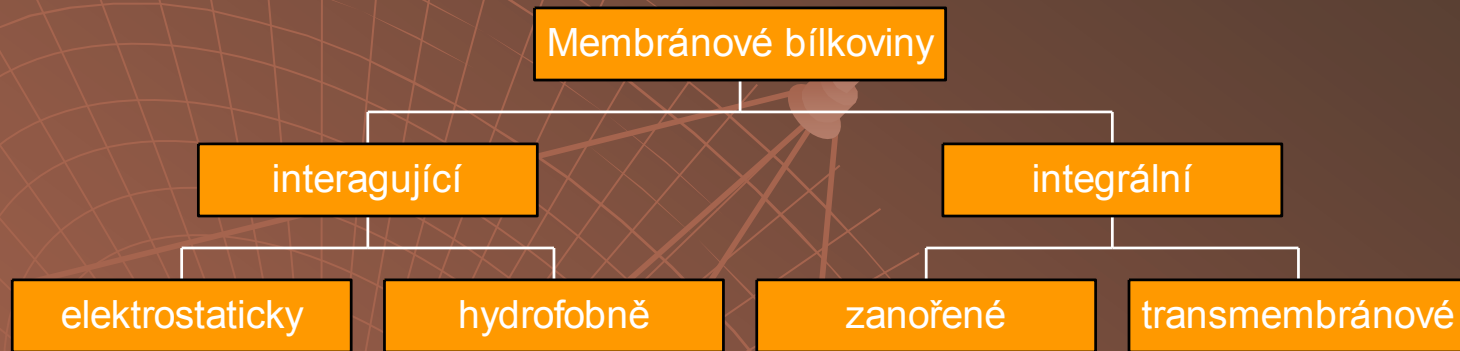
Organela	Tíhové zrychlení	Čas
Eukar.buňky	1 000 g	5
Jádra, chloroplasty	4 000 g	10
Mitochondrie, bakterie	15 000 g	20
Lysozomy, membrány	30 000 g	30
Ribozomy, fragmenty end.retikula a Gold.systém	100 000 g	60



# 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

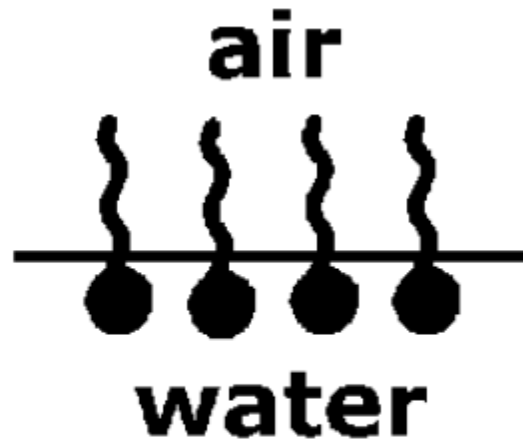
# Membránově vázané bílkoviny



# Izolace membránových bílkovin







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

# Detergency



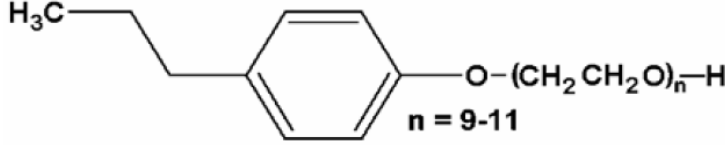
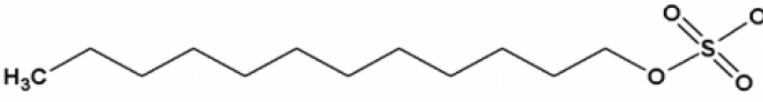
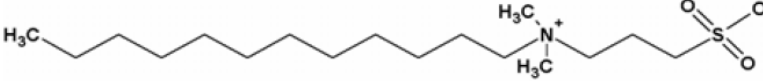
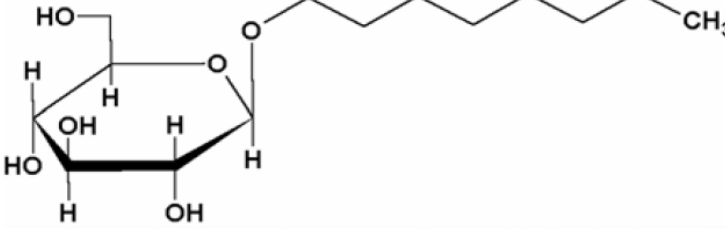
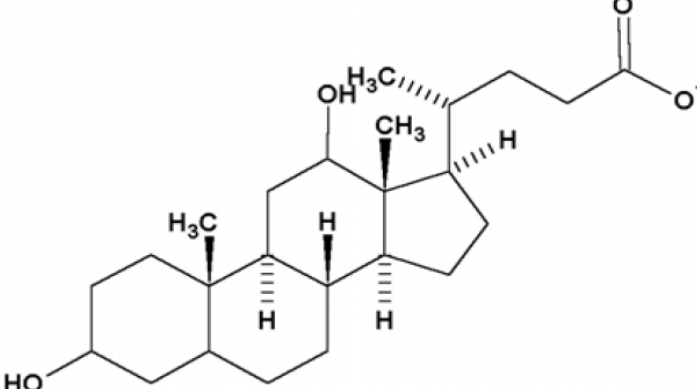


# Detergenty

Detergent	CMC mM	MMW Da	koncentrace	odstranění	aplikace
<b>ANIOGENNÍ</b>					
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
<b>KATIOGENNÍ</b>					
CTAB (hexadecyltrimethyl amonium bromide)	4-5	337	0,1 – 1 %	???	rozpuštění membrány, tvoří komplex s DNA, odstranění polysacharidů
<b>NEIONOGENNÍ</b>					
Triton X-100 [octylphenolpoly(ethylen glyco lether) <sub>n</sub> ]	0,2	647 n=10	1 – 5 mM		solubilizace proteinů
Tween 20 [poly(oxyethylene) <sub>n</sub> sorbitan- monolaurate]	0,06		> 10 mg/mg membr. lipid;		imunoblotty, ELISA
<b>AMFOTERNÍ</b>					
CHAPS (3-[[3- cholamidopropyl]dimethylam monio]-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 <sup>®</sup> (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)