

METODY STUDIA PROTEINŮ I

Michael Jelínek

michael.j@email.cz

- 1. Organizace praktik z Buněčné a molekulární biologie**
- 2. Obecné principy specifické detekce molekul**
- 3. Mikroskopické techniky**
- 4. Stanovení koncentrace proteinu**
- 5. Stanovení hladiny proteinu v roztoku**
SDS-PAGE + Western blot

1) ORGANIZACE PRAKTIK Z BMB

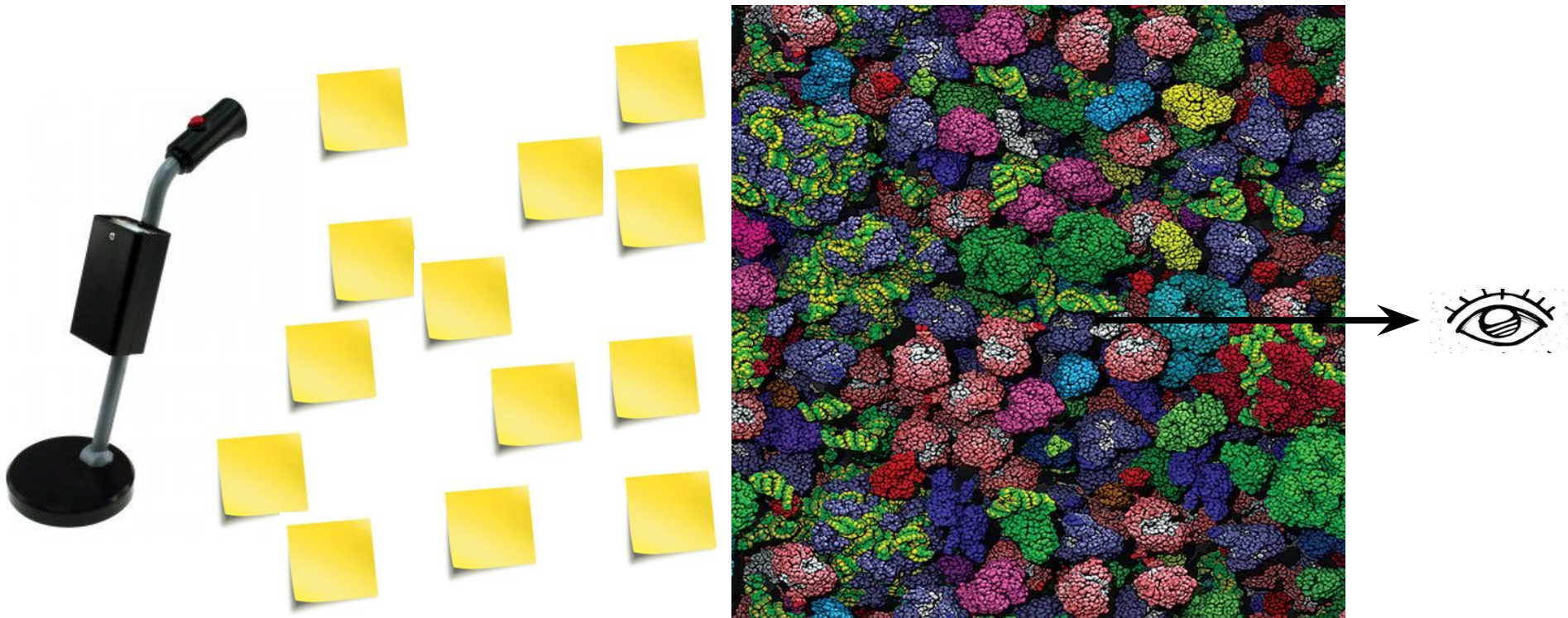
- 2 části (2 x 4 vyučovací hodiny)
- Pro udělení zápočtu nutná účast a úspěšné absolvování výstupního testu (součástí druhé části praktik)
- Případnou neúčast lze v odůvodněných případech nahradit s jinou skupinou (po domluvě s vedoucím praktik)
- Nutné mít s sebou: laboratorní plášť, kalkulačka
- Nutno znát teorii z přednášky „Metody studia proteinů I“

2 praktické úlohy:

- 1) Detekce aktinu a DNA v nádorových buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie
- 2) Porovnání hladiny proteinů v různých vzorcích pomocí proteinové elektroforézy a následného barvení polyakrylamidového gelu

2) OBECNÉ PRINCIPY SPECIFICKÉ DETEKCE MOLEKUL

2.1. Jak najít to, co nás zajímá, mezi všemi ostatními molekulami v buňce? (nutno zajistit specifičnost detekce)



2.2. Jak „zviditelnit“ výsledek této specifické detekce?

Většina biologických struktur nemá žádnou barvu...

(nutno vybrat vhodný systém detekce signálu pro danou situaci)

2.1 ZAJIŠTĚNÍ SPECIFICKÉ DETEKCE

Molekula ve vzorku je rozeznána na základě známé a specifické interakce s jinou molekulou.

Molekulou interagující s **cílovou molekulou** může být:

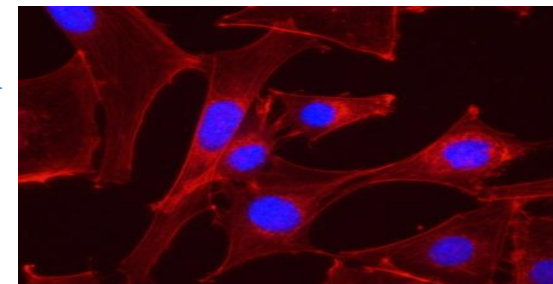
2.1.1 Malá organická molekula, která se **specificky** váže k **cílové molekule/strukturu** (např. faloidin k F-aktinu, DAPI a etidium bromid k DNA).

2.1.2 Protein **specificky** rozpoznávající **cílovou molekulu/strukturu**, nejčastěji protilátka

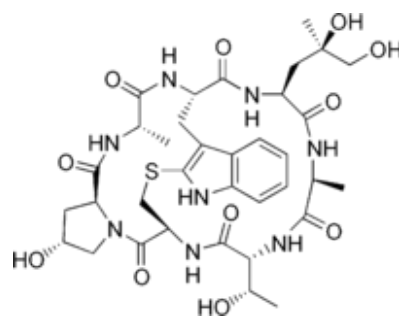


2.1.1 Malé organické molekuly, které se specificky vážou k cílové struktuře

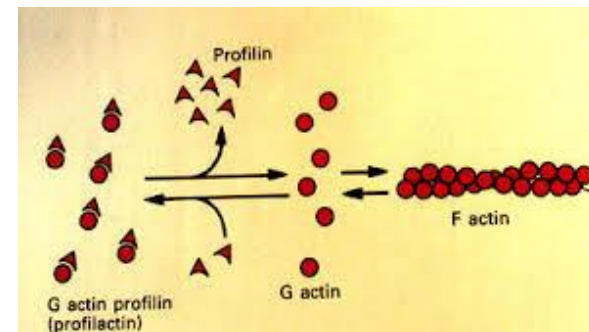
DAPI, faloidin, paclitaxel, nocodazol, ethidium bromid...



Muchomůrka



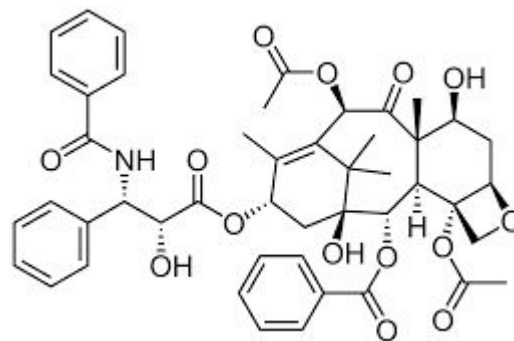
Faloidin



Polymerizace aktinu



Tis



Paclitaxel



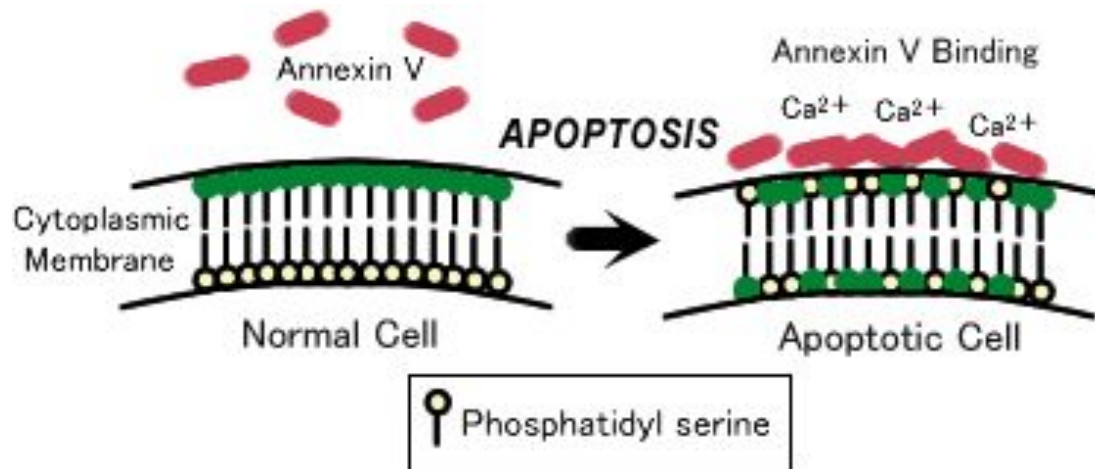
Polymerizace tubulinu

2.1.2 Proteiny rozeznávající specifické buněčné struktury

Dnáza I - vazba na G aktin v jádře

Konkavalin - vazba na glukozo-manozové zbytky, možná detekce nádorových buněk

Annexin - vazba na fosfatidylserinové zbytky - detekce apoptotických buněk



2.1.2 Proteiny rozeznávající specificky buněčné struktury - protilátky

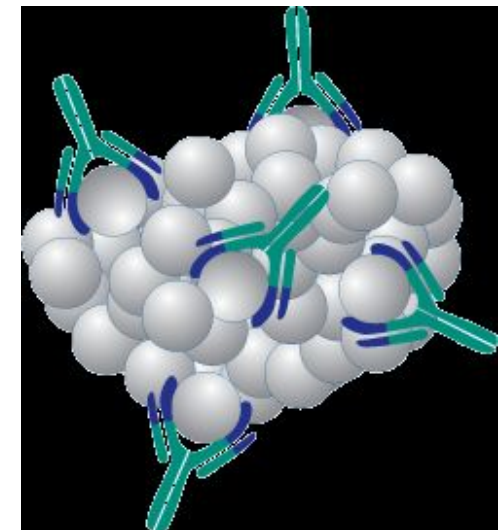
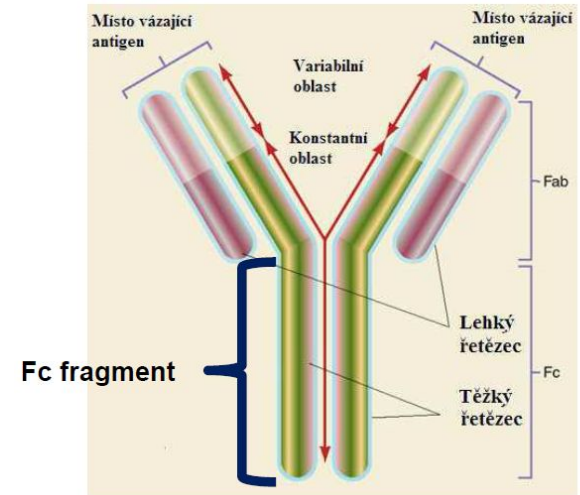
Nejčastěji používaný systém pro detekci proteinů - protilátky = IMUNODETEKCE

PROTILÁTKY lze teoreticky připravit proti jakémukoliv proteinu

Imunoglobuliny produkované imunitním systémem (Ig třídy A, D, E, G, M), rozpoznávají specifické **epitopy** na molekule **antigenu**

antigen = látka, která navozuje produkci protilátek proti sama sobě imunitním systémem, (obvykle cizorodá molekula)

epitop = specifická povrchová oblast antigenu, která může být rozeznávána protilátkou. Protilátka se zde nekovalentně, ale pevně váže.



2.2 MOŽNOSTI DETEKCE SIGNÁLU

Detekující molekulu většinou není možné přímo pozorovat (výjimka např. DAPI).

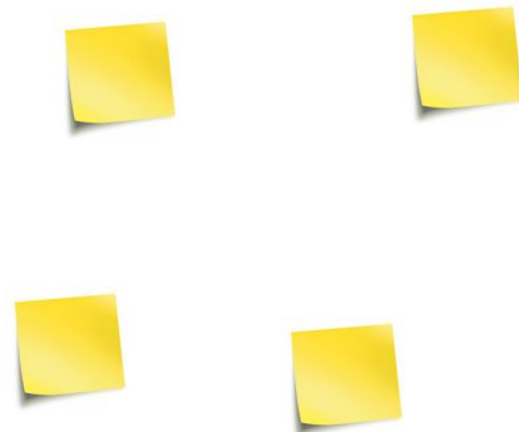
Proto musí být detekující molekula konjugována s jinou molekulou, která již vizualizaci umožňuje.

Konjugáty:

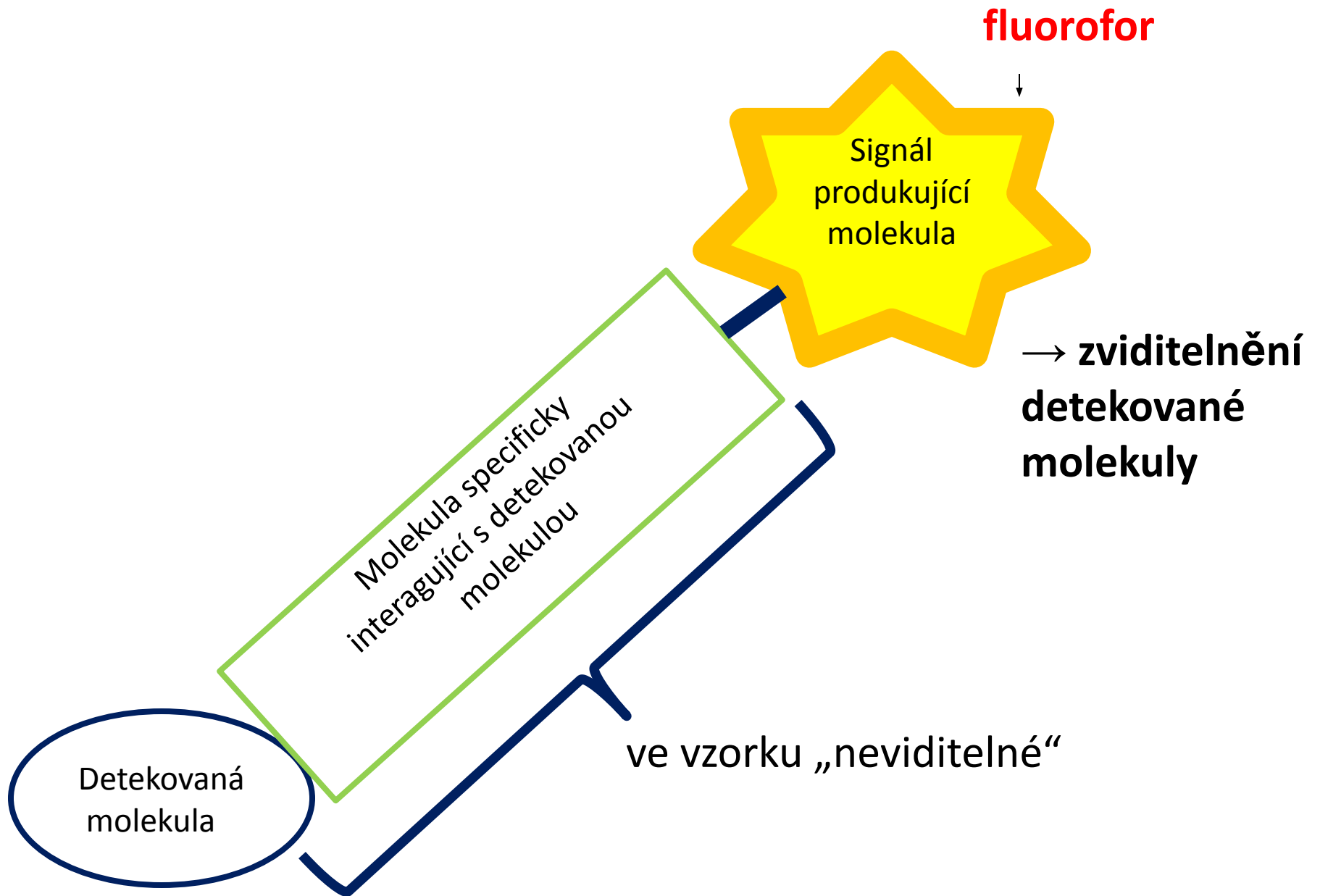
2.2.1 Těžký kov

2.2.2 Fluorofor

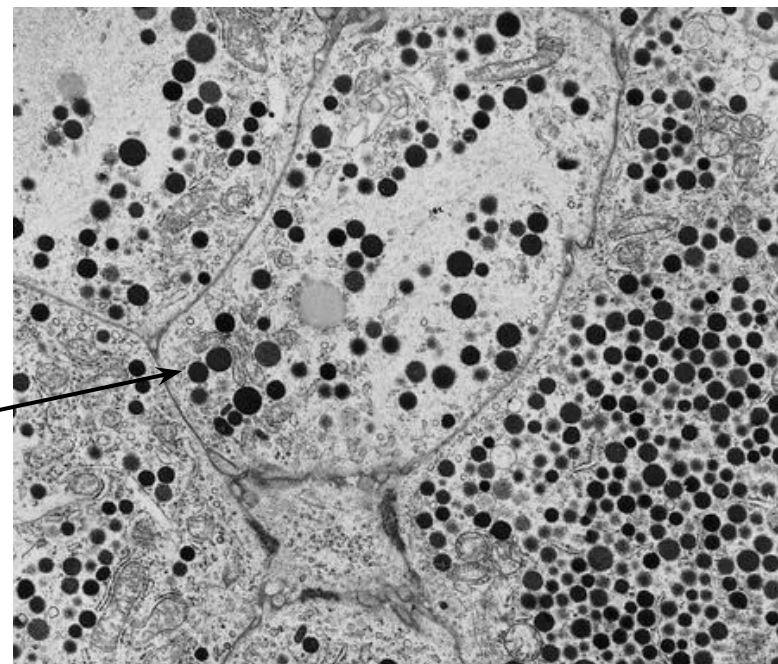
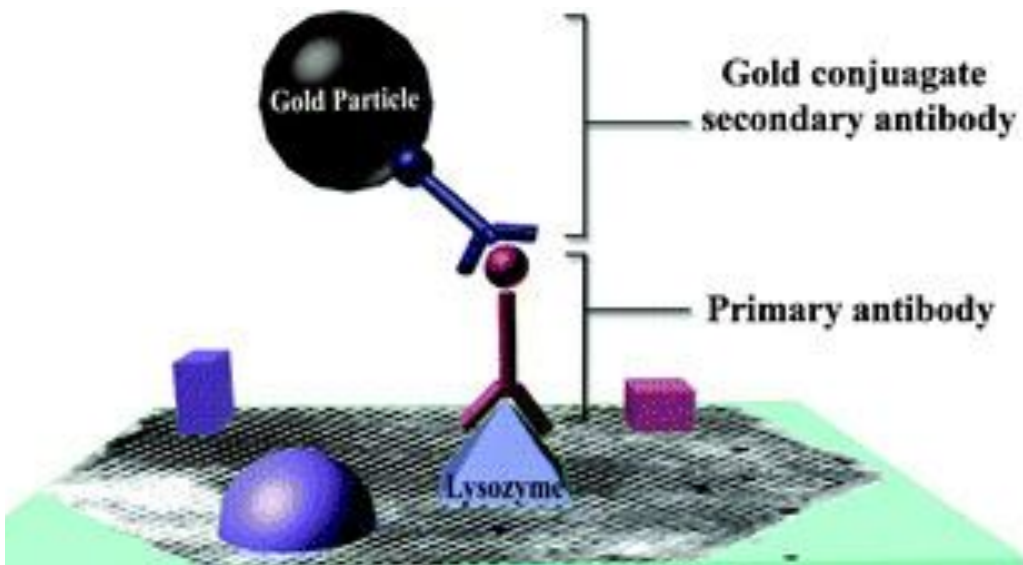
2.2.3 Enzym, jehož aktivita umožňuje vizualizaci detekované molekuly - světlo, barevná vizualizace



Struktura konjugátu



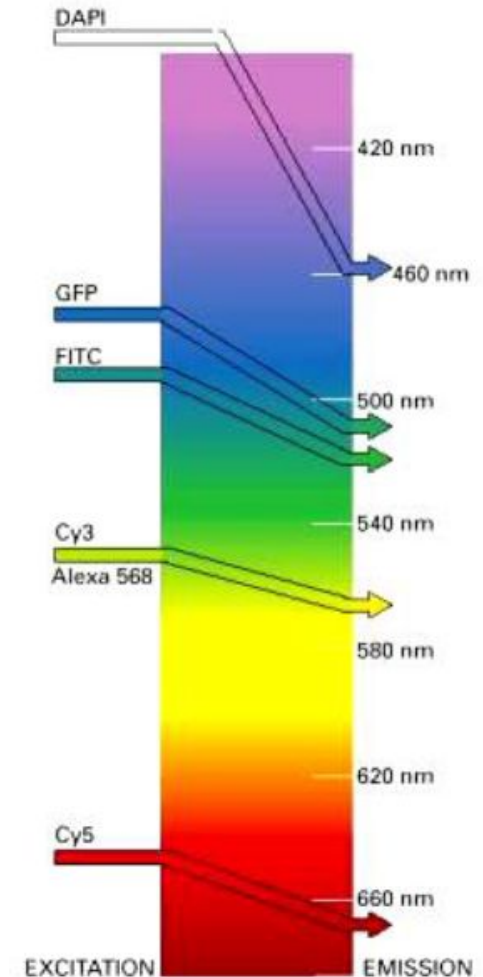
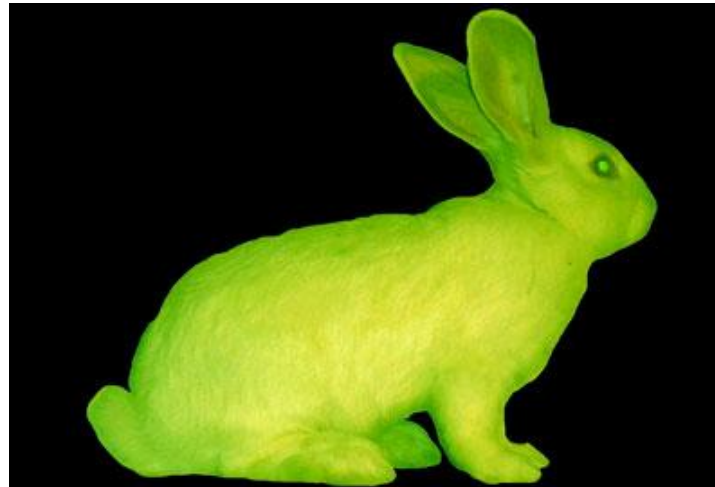
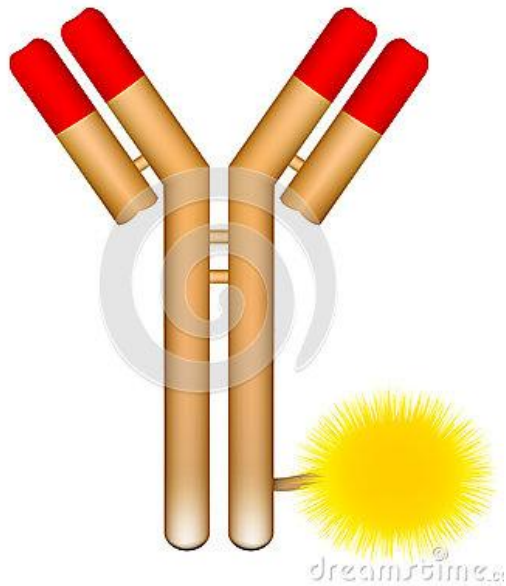
2.2.1 Vizualizace pomocí konjugovaného těžkého kovu



produkce somatostatinu v buňkách
pankreatu

2.2.2 Vizualizace pomocí konjugace fluoroforu

fluorofor = molekula schopná absorbovat záření určité vlnové délky (=být excitována) a vyžářit (=emitovat) záření jiné vlnové délky (=detekovaný signál)



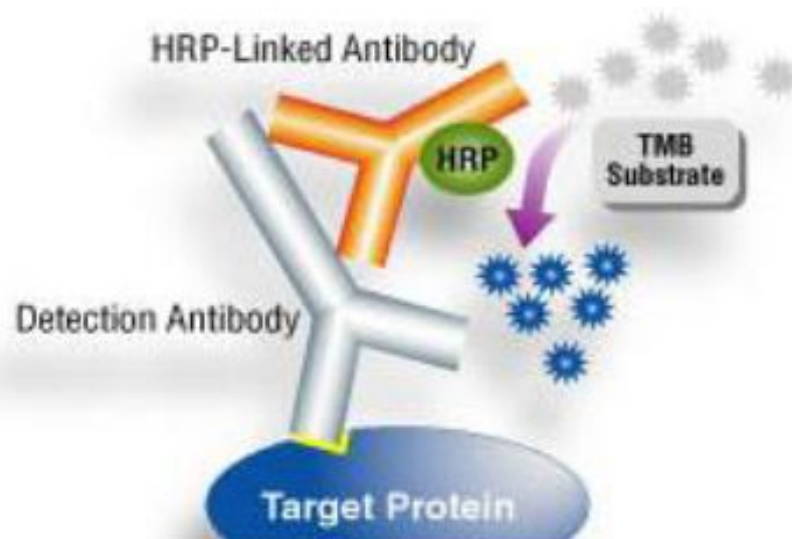
2.2.3 Vizualizace pomocí aktivity konjugovaného enzymu

Zviditelnění detekované molekuly po reakci enzymu se substrátem

A. Chemiluminiscence - jako enzym se obvykle používá křenová peroxidáza (= horse radish peroxidase = HRP). HRP štěpí peroxid a vzniklé radikály aktivují luminol - vzniká světlo, které je detekováno (např. western blot).

B. Chromogenní (barevná reakce) - vzniká barevný produkt (např. imunofluorescence, ELISA)

- produkt musí být nerozpustný pro **lokalizaci** detekované molekuly - imunofluorescence
- produkt musí být rozpustný pro **měření intenzity vzniklého zbarvení** v roztoku - ELISA



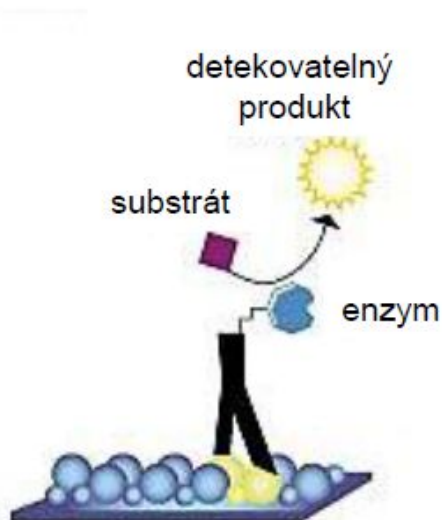
Přímá a nepřímá detekce

značená primární protilátka (přímá detekce)

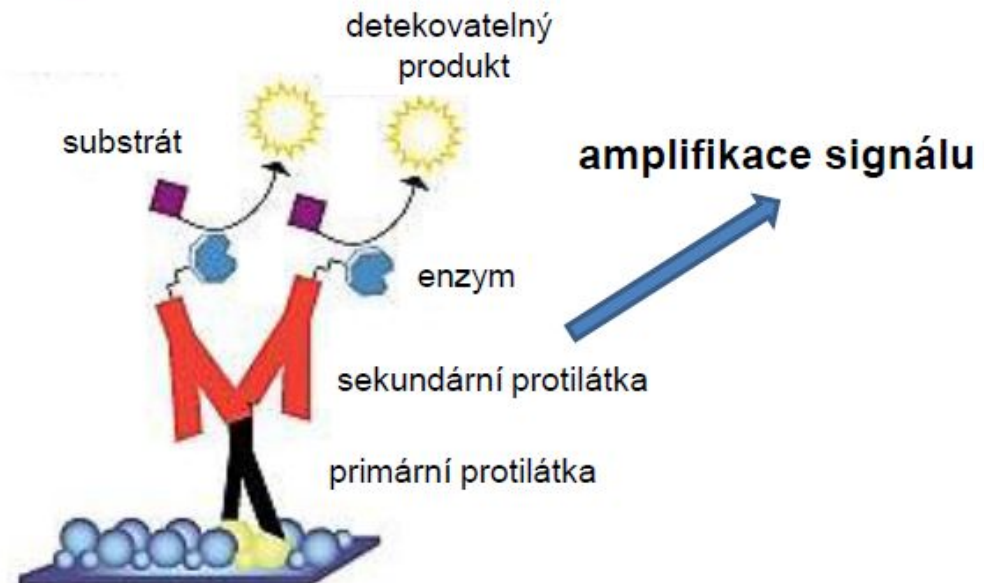
vs

neznačená primární a značená sekundární protilátka (nepřímá detekce)

Přímá detekce



Nepřímá detekce



3) MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY

3.1 Imunohistochemie

3.2 Elektronová mikroskopie

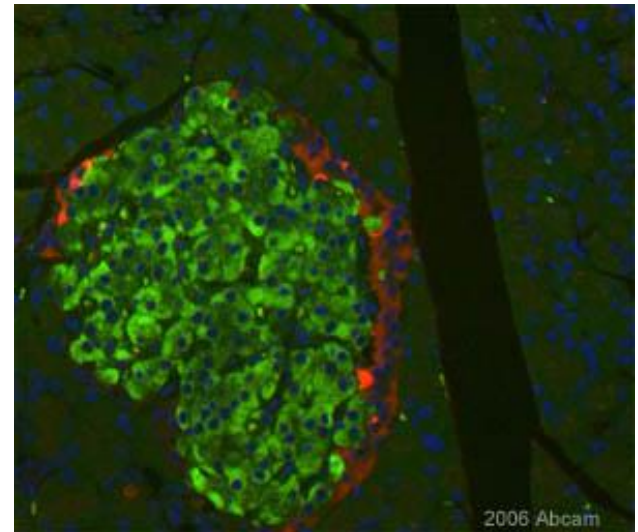
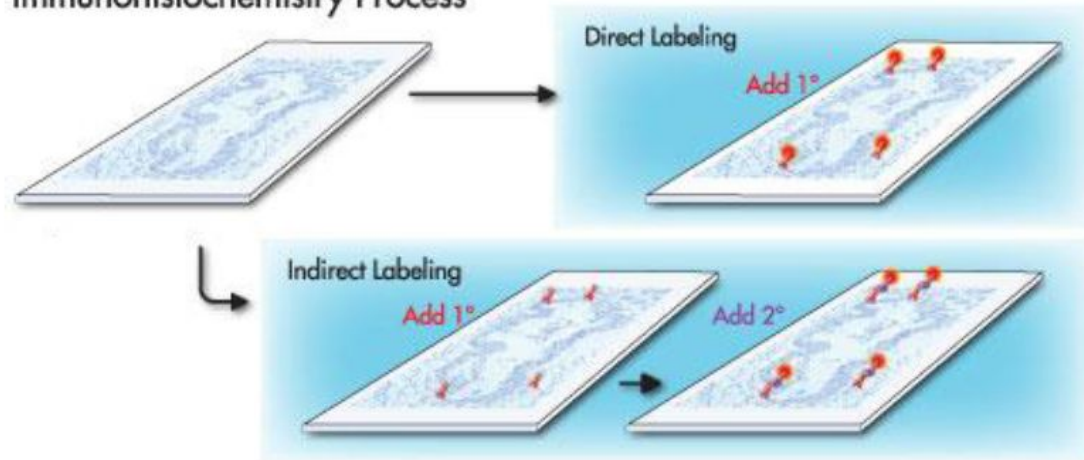
3.3 Fluorescenční mikroskopie

3.1 IMUNOHISTOCHEMIE

detekce v mikroskopickém preparátu (obvykle tenký řez tkáně) - **poměrně často používáno**

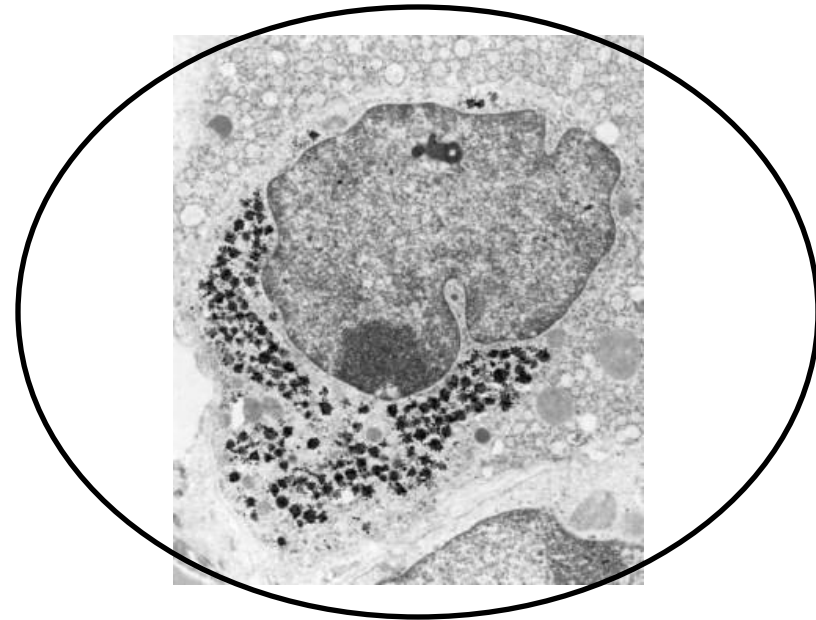
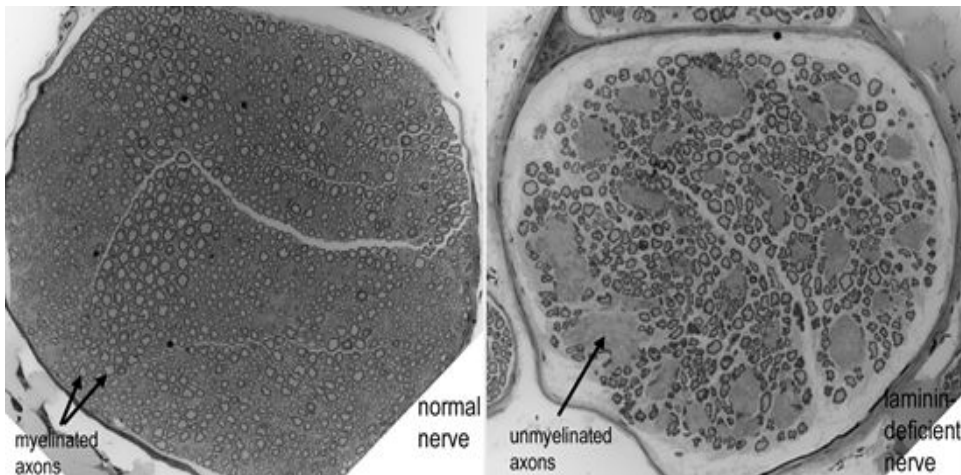
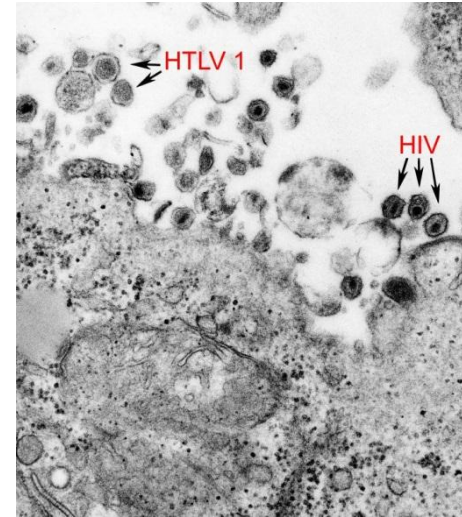
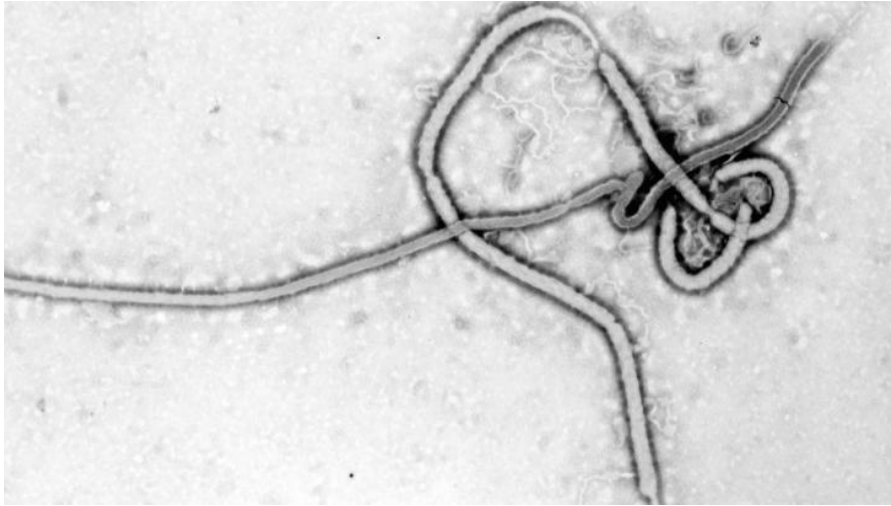
obvykle pomocí specifických protilátek a vzniku nerozpustného produktu, případně imunofluorescence

Immunohistochemistry Process



inzulin v pankreatických buňkách

3.2 ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE



Méně časté využití

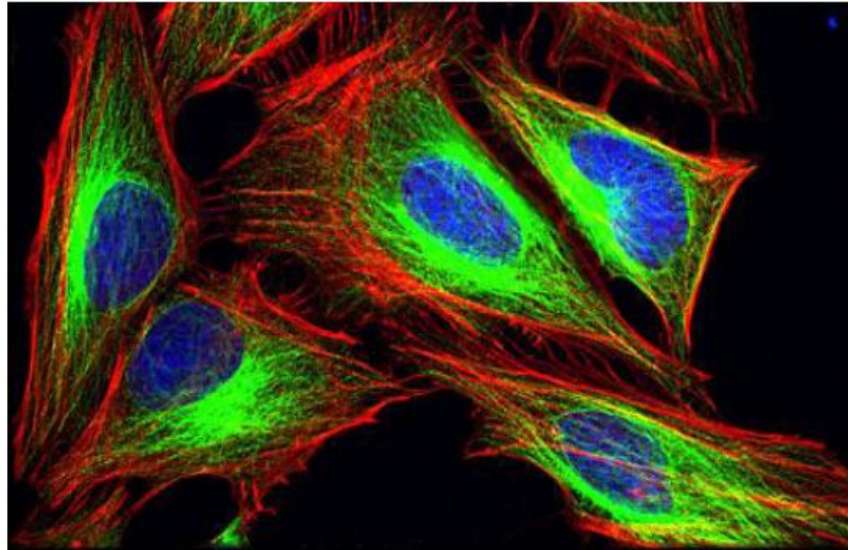
Somatostatin v D buňkách pankreatu

3.3 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

použití jednoho fluoroforu vs použití více fluoroforů

Použití různých fluoroforů - možnost sledování více typů molekul, případně jejich kolokalizaci (výskyt na stejné buňce nebo stejném místě v buňce)

praktika: barvení aktinu a DNA



- DNA: DAPI
- tubulin: protilátka proti tubulinu konjugovaná s fluoroforem FITC
- aktin: phalloidin konjugovaný s fluoroforem TRITC

4) STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ V ROZTOKU

založené na spektrofotometrickém stanovení (měření absorpance)

4.1 Stanovení z UV spektra

4.2 Určení koncentrace pomocí BCA

4.3 Bradfordova metoda (bude použita v praktiku)

4.1. Stanovení koncentrace z absorbance UV záření

Proteiny přirozeně absorbují v UV spektru (260 – 280 nm) díky přítomnosti **aromatických** aminokyselin (tyrosin, tryptofan).

Není nutná kalibrační křivka.

Výpočet dle rovnice [Protein] (mg/mL) = $1.55 \cdot A_{280} - 0.76 \cdot A_{260}$

Všechny metody založené na stanovení přítomnosti pouze určitých aminokyselin předpokládají stejné zastoupení těchto AMK v porovnávaných vzorcích!!!



4.2. Metoda používající BCA

Detekční činidlo obsahuje **BCA (bicinchoninic acid)**.

Kolorimetrická reakce založena na interakci činidla přímo s peptidovou vazbou (a ne pouze na interakci s určitými AMK).

Purpurové zbarvení měřitelné při použití vlnové délky 562 nm.



Blank

Koncentrace proteinu

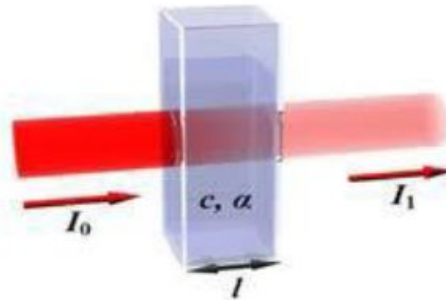
4.3. Metoda dle Bradforda

Princip: kolorimetrická reakce po smíchání Bradfordova (Bradfordové) činidla s roztokem obsahujícím proteiny

Bradfordovo činidlo obsahuje barvivo **Coomassie Brilliant Blue** - váže se na bazické a aromatické aminokyselinové zbytky v proteinech (Arg, Phe, Try, Pro).

Přítomnost proteinů změni barvu roztoku z hnědé na modrou.

Absorbance se měří při vlnové délce 595 nm (absorbance je přímo úměrná koncentraci proteinů).



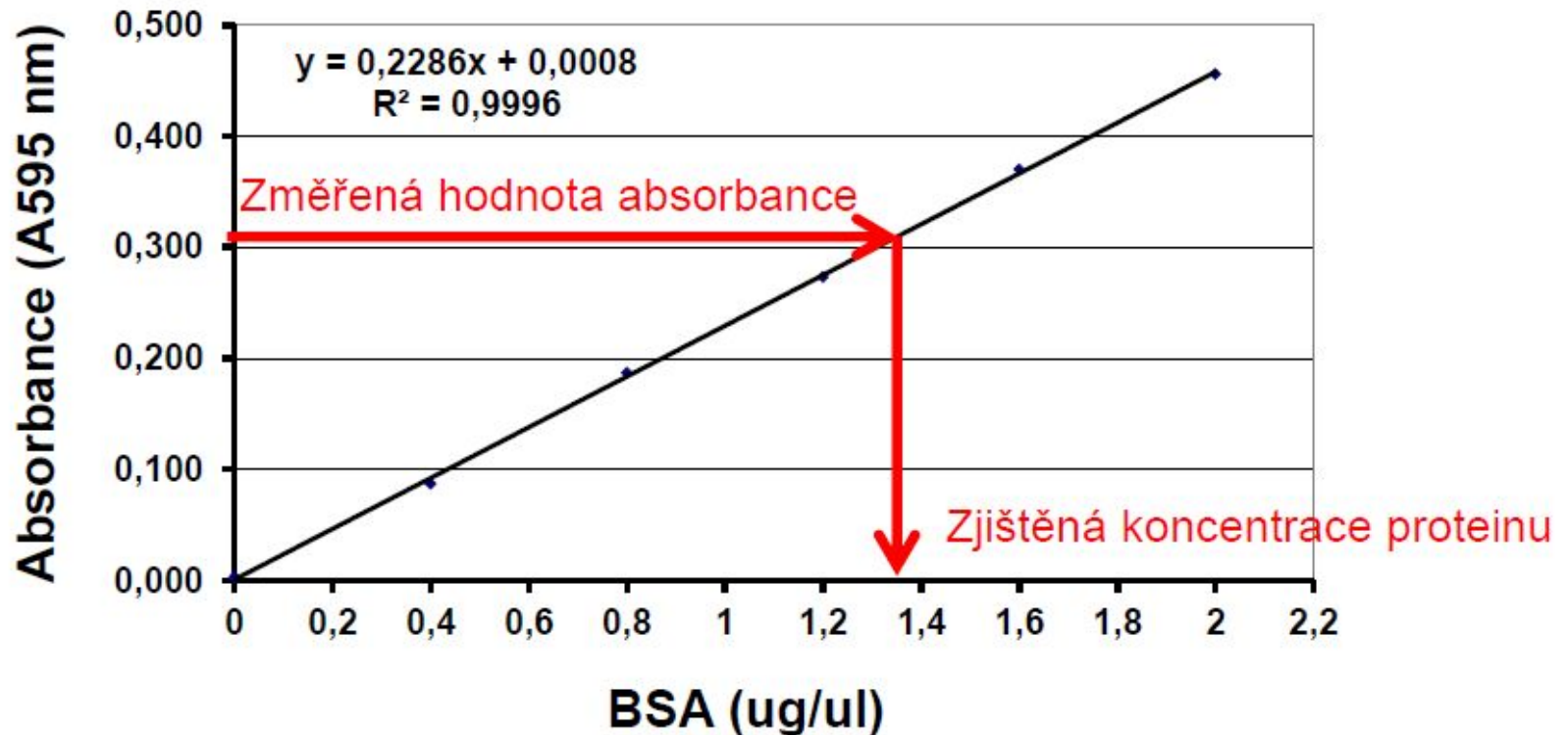
Blank

Koncentrace proteinu

Princip stanovení koncentrace proteinů:

Nutno vytvořit kalibrační křivku ze série roztoků o známé koncentraci proteinu

Nejčastěji je používán bovinní sérový albumin (=BSA)



5) STANOVENÍ HLADINY PROTEINŮ

Metody založené na imunodetekci:

- *ELISA*
- *průtoková cytometrie*
- **SDS-PAGE + Western blot**

= sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

stanovení (porovnání) hladiny určitého proteinu v různých vzorcích

Vzorky jsou obvykle ve formě roztoku obsahujícího proteiny, např. lyzát tkáně, buněk.

Před vlastní analýzou je nutná dezintegrace (lýze) buněk - uvolnění buněčného obsahu do roztoku.

Buňky mohou být rozbity chemicky, mechanicky a dalšími fyzikálními přístupy, příp. jejich kombinací.

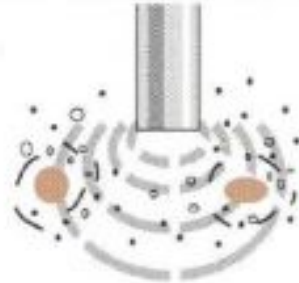
ROZBÍJENÍ BUNĚK A TKÁŇÍ

Prvním krokem purifikace většiny proteinů je rozbití buněk nebo tkáně

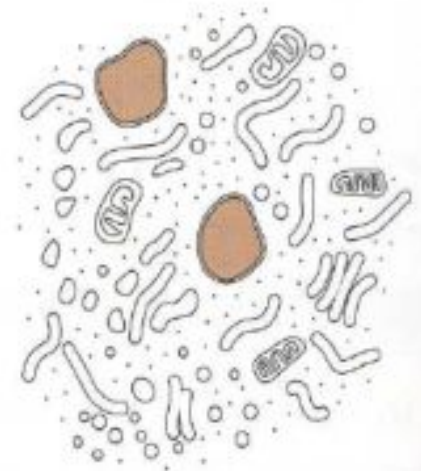
Použitím jemných mechanických postupů, zvaných homogenizace, lze perforovat plasmatické membrány buněk, takže se z buněk uvolní jejich obsah. Používané čtyři metody jsou tu ukázány schematicky.



suspenze buněk nebo tkáň



① rozbití buněk ultrazvukem



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

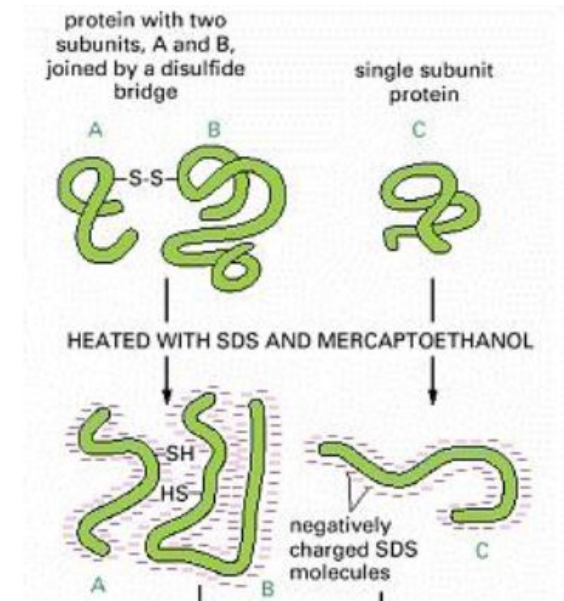
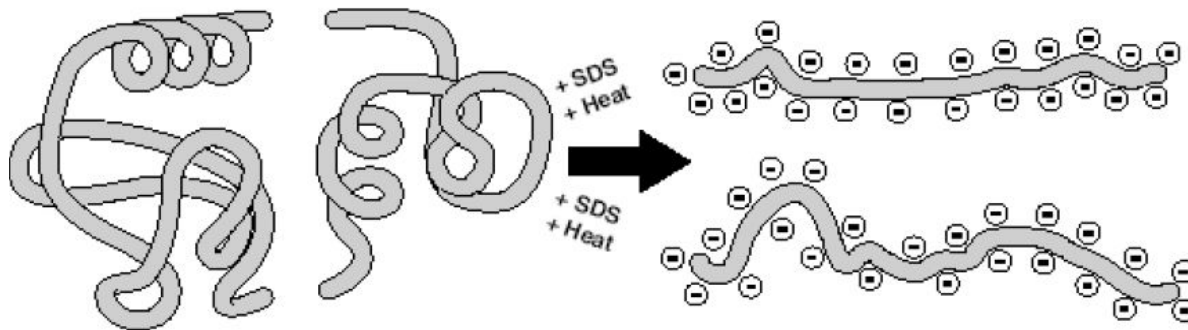
Vznikající hustý homogenát nebo extrakt obsahuje větší i menší molekuly z cytosolu, jako jsou enzymy, ribosomy a různé metabolity, ale také membránou uzavřené organely.

5.1 Příprava vzorků

Před separací jsou proteiny pomocí denaturačního činidla rozvolněny na **jednotlivé polypeptidové řetězce**.

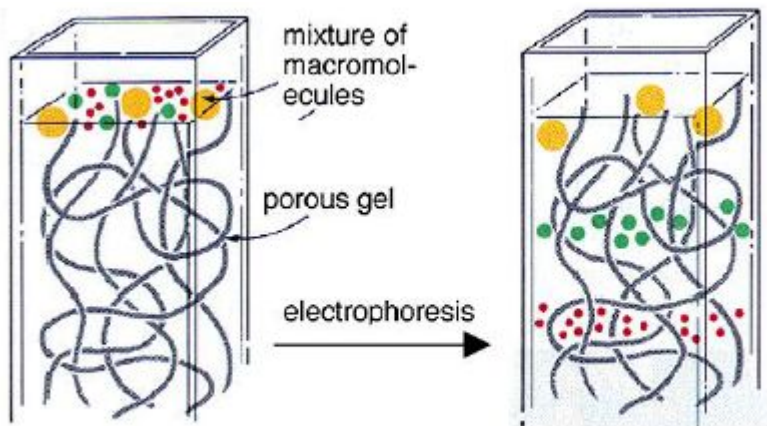
Pro rozvolnění proteinů do primární struktury je většinou použit **SDS**.

merkptoethanol, dithiotreitol - redukce S-S můstků



Proteiny také mají, v důsledku inkubace s SDS, homogenní záporný náboj.

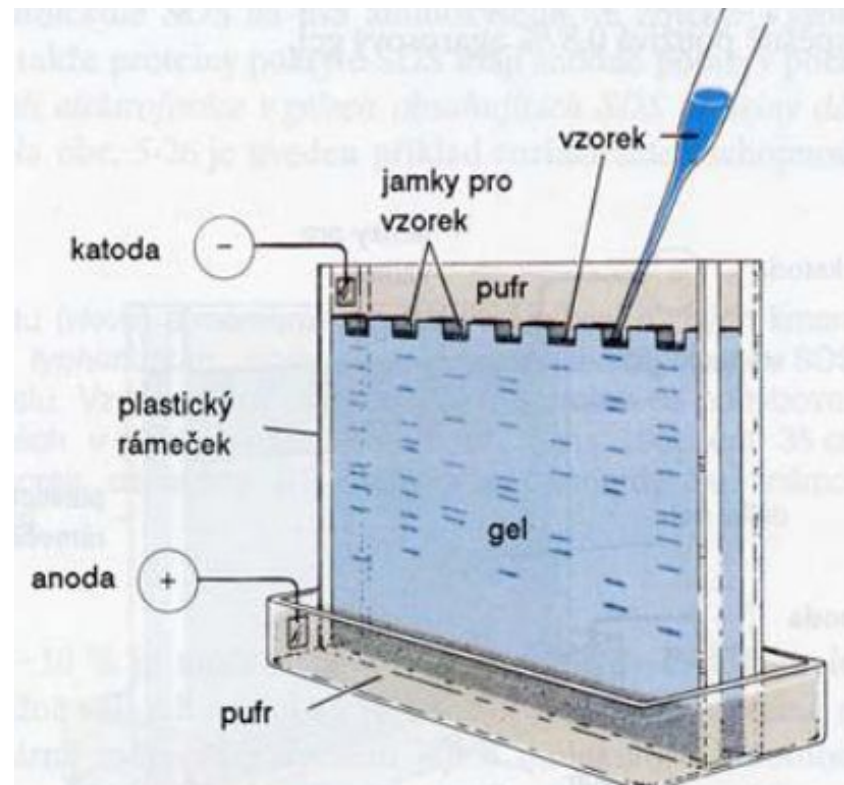
5.2 Princip elektroforézy



Gelová elektroforéza - gel s vhodnou velikostí pórů, aby se molekuly s různou velikostí pohybovaly rozdílnou rychlostí

Proteiny: obvykle se používá **polyakrylamidový gel**

elektroforéza **DNA, RNA:** obvykle **agarózový gel** - větší velikost pórů než polyakrylamidový gel



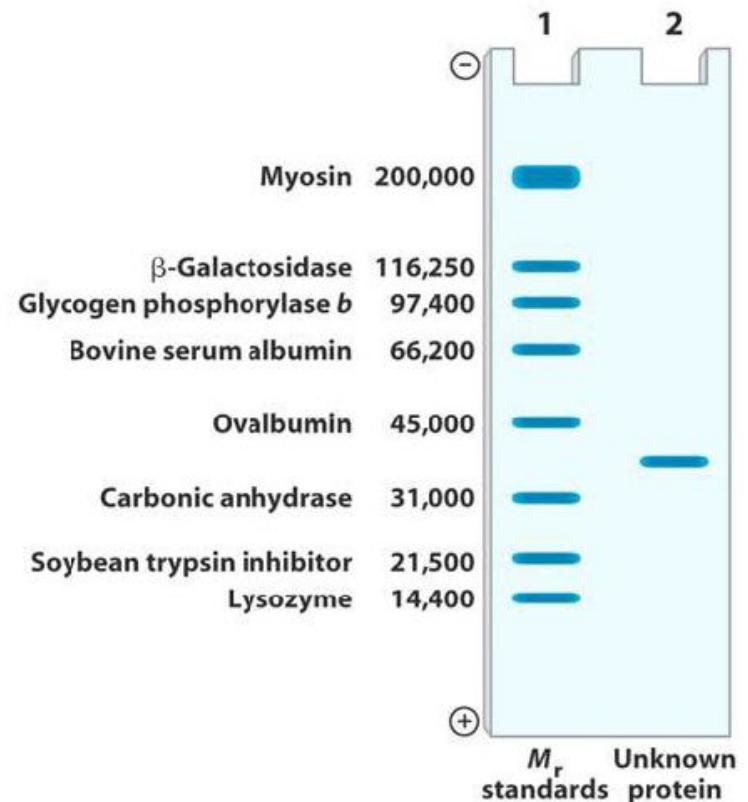
5.3 Průběh elektroforézy

Záporně nabitě proteiny taženy ke kladné elektrodě.

Čím delší polypeptidový řetězec, tím více inhibován při průchodu gelem - menší proteiny doputují dále než větší.

Separace proteinů probíhá víceméně pouze podle molekulové hmotnosti.

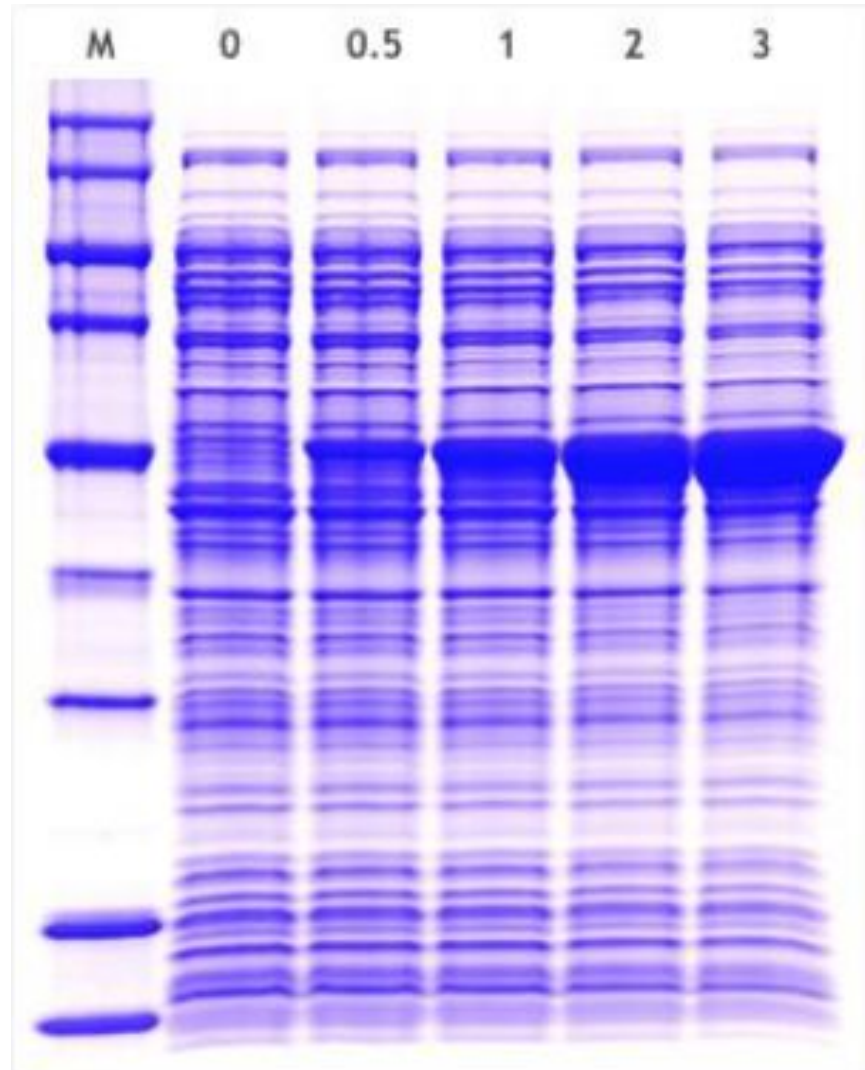
Molekulovou hmotnost detekovaného proteinu lze určit porovnáním velikosti proteinu s markerem molekulových hmotností = komerčně dostupná směs proteinů o známých velikostech



5.4 Barvení gelu

Modrá barvička Coomassie blue se váže nespecificky na proteiny (viz metoda dle Bredforda), každý proužek (band) na gelu představuje skupinu proteinů o dané velikosti.

Marker Vyrůstající koncentrace proteinu



5.5. Western blot

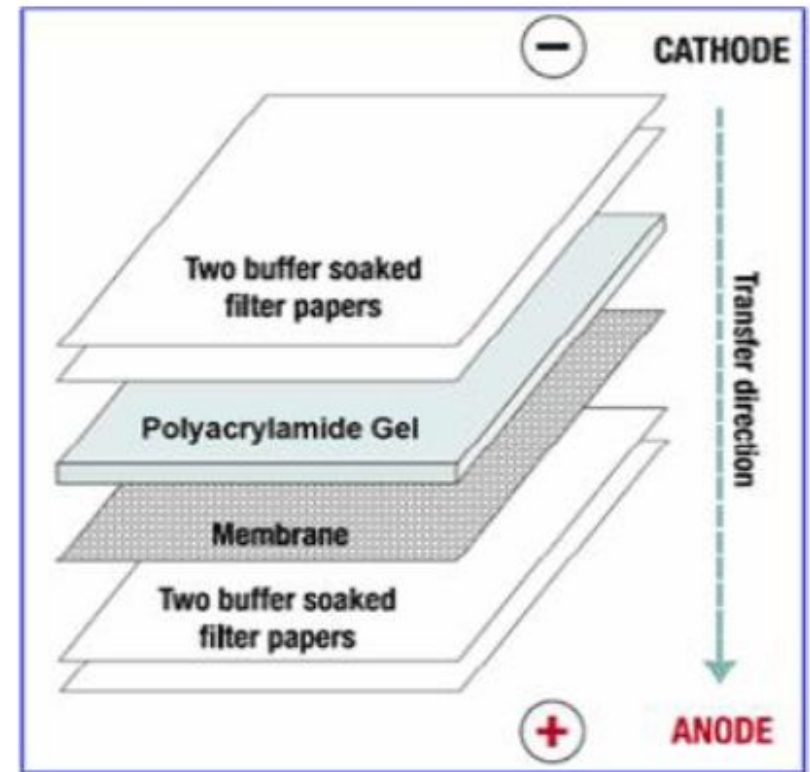
SOUTHERN blot (technika přenosu **DNA**)
zavedené Edwinem Southernem (1975)

NORTHERN blot (technika přenosu **RNA**)

WESTERN blot: Použití nejčastěji pro
porovnání míry exprese proteinů pomocí
imunodetekce - přenos **proteinů**

**1. Přenos proteinů separovaných pomocí
SDS-PAGE na povrch nespecificky vázající
proteiny (nitrocelulózová nebo PVDF
membrána)**

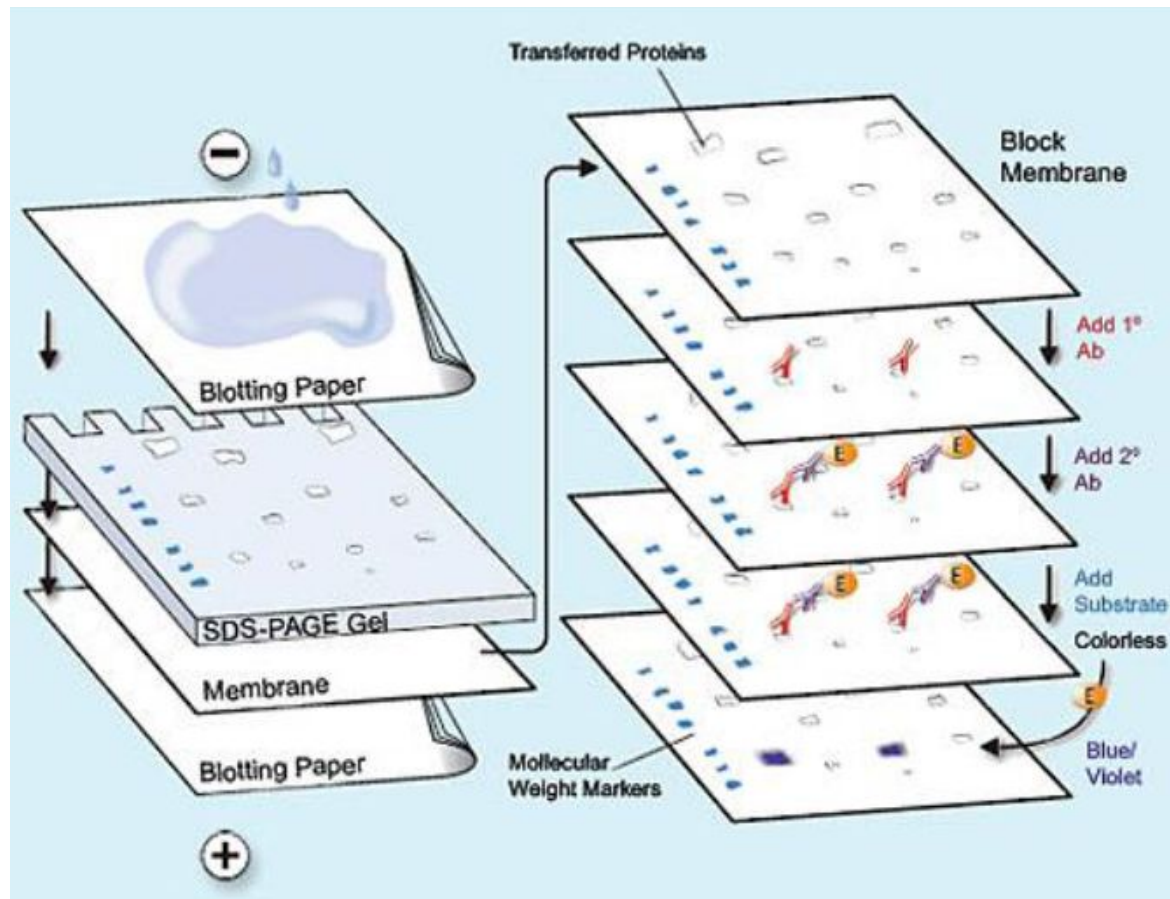
Pohyb záporně nabitých proteinů v
elektrickém poli z gelu na membránu.
Membrána umožňuje snadný přístup
protilátek k proteinům na membráně.



2. Blokace membrány (obvykle BSA nebo odtučněné mléko) = obsazení všech vazebných míst na membráně, ne tam, kde už proteiny jsou.

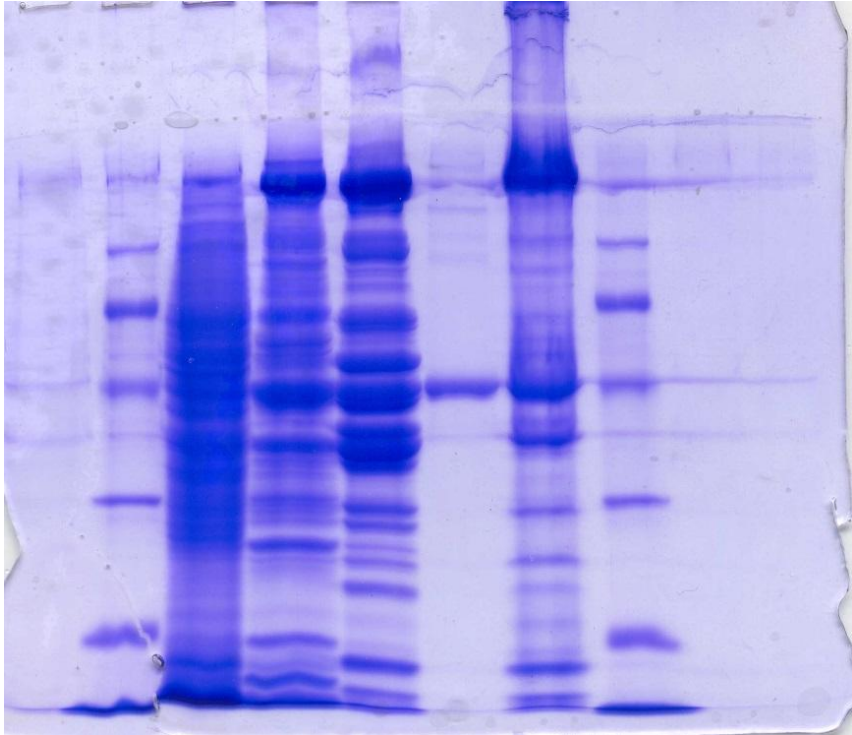
3. Detekce proteinu na membráně pomocí specifických protilátek

Detekce konkrétních proteinů obvykle pomocí **chemiluminiscence** (příp. fluorescence) nebo **barevné reakce** za vzniku nerozpustného produktu



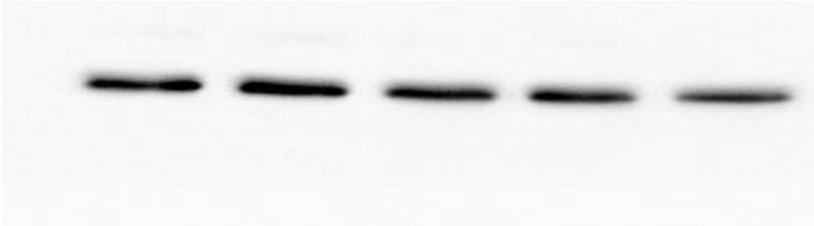
**Barvení pomocí
Coomassie**

VS



Western blot

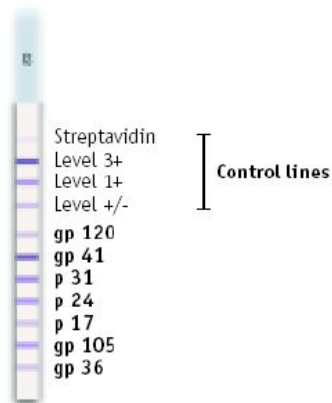
Aktin



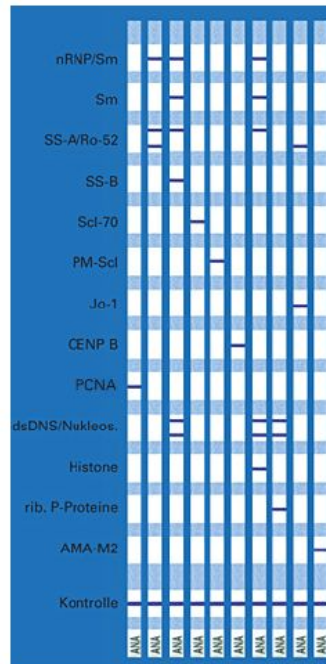
5.6. Klinická aplikace

1. Detekce antigenu v tělních tekutinách pacienta - **infekční borelióza, EBV, HIV, HSV, Helicobacter pylori**
2. Detekce protilátek v tělních tekutinách pacienta - **autoprotiátky, např. antinukleární protilátky (ANA), protilátky proti neuronálním antigenům**

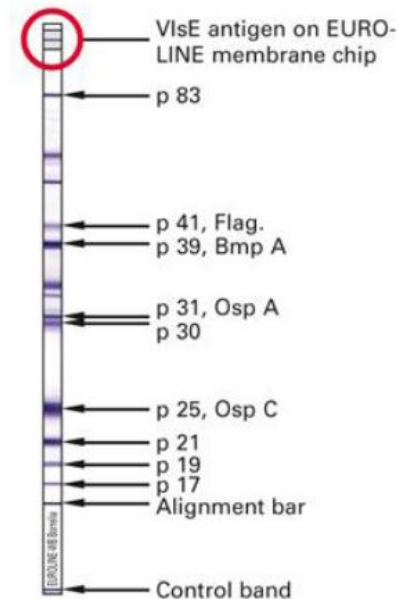
Line immunoassay for confirmation and discrimination of antibodies HIV-1 and HIV-2



EUROLINE ANA-Profile 3



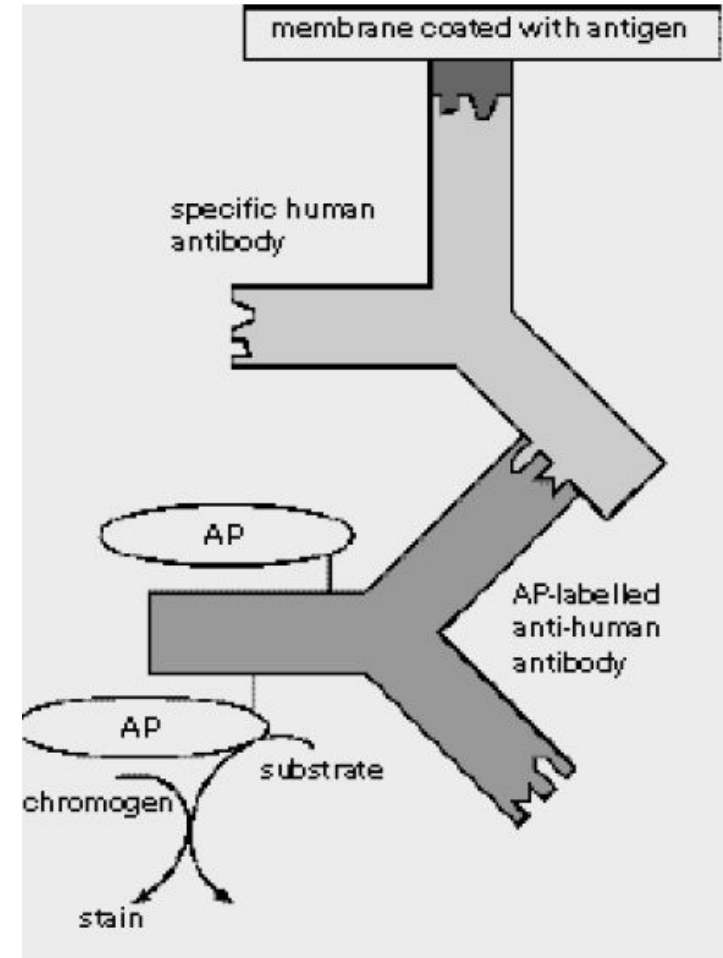
EUROLINE-WB: detection of antibodies against Borrelia



Nepřímé určení hladiny antigenu

- Jestliže je vzorek séra pacienta pozitivní, specifické protilátky z jeho séra jsou použity jako primární protilátky pro detekci antigenu.
- Navázané protilátky reagují s anti-humánními protilátkami značenými alkalickou fosfatázou (AP).

Přítomnost antigenu v krvi pacienta je tedy finálně potvrzena/vyvrácena.



Co si musím z přednášky pamatovat?

- Na praktika se chodí včas a s pláštěm!
- Biologické molekuly se detekují a vizualizují mnoha způsoby (nejčastěji používaný detekční systém představují protilátky, vizualizační systém pak fluorofory a enzymy)
- Běžné mikroskopické techniky, které se používají pro detekci molekul (imunohistochemie a fluorescenční mikroskopie)
- Tři metody určení koncentrace proteinů v roztoku (UV, BCA, „Bradford“)
- Základní princip proteinové elektroforézy, western blotu a imunodetekce (separace proteinů podle molekulové hmotnosti, detekce pomocí specifických protilátek)
- Jaké je klinické využití výše popsaných metod a postupů.