

DETEKCE, IZOLACE A SEPARACE PROTEINŮ

I

Michael Jelínek
Jan Šrámek
Nela Pavlíková
Pavla Elčknerová

V praktiku budou řešeny dvě úlohy:

- 1) Fluorescenční barvení nádorových buněk
- určení senzitivity k cytostatiku
- 2) Izolace, separace a barvení proteinů -
určení hladiny proteinu ve vzorcích

Úloha 1: Určit citlivost buněčné populace k cytostatiku

Fluorescenční barvení mikrofilament a DNA

aktin: faloidin konjugovaný s **fluoroforem TRITC - červený signál**

DNA: **DAPI - modrý signál**

testované buňky - buněčná linie **MCF-7** (buňky nádoru prsu), zafixované formaldehydem

Kontrolní buňky jsou nepravidelné s kompaktními jádry.

vs

Cytostatikum buňky „zakulucuje“ a indukuje fragmentaci jader.

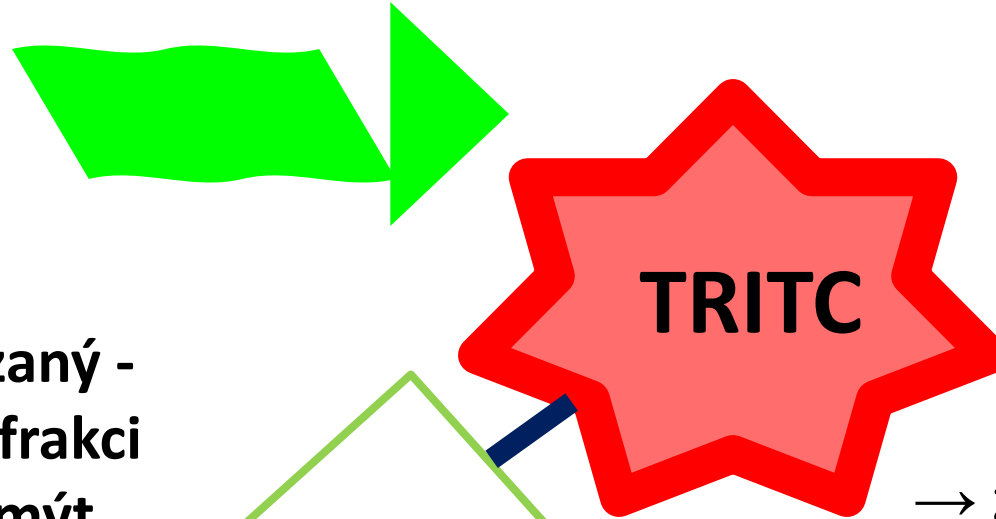
Pracovní postup:

1. Permeabilizace buněk roztokem Tritonu X v PBS (phosphate buffered saline)
2. Odstranění přebytečného roztoku Tritonu X pomocí opakovaného promytí roztokem PBS
3. Barvení aktinu = inkubace buněk s konjugátem
4. Odstranění nenavázaného konjugátu pomocí opakovaného promytí PBS
5. Barvení DNA pomocí roztoku obsahujícím DAPI
6. Pozorování ve fluorescenčním mikroskopu, focení

Permeabilizace

- Buňky jsou zafixované - je možné je uchovat až několik týdnů
- Plazmatická membrána je intaktní - buňky je možné barvit pouze na povrchu
- Proto je nutné buňky permeabilizovat - „proděravět“
- Použijeme mírný detergent TRITON X

Fluorescenční barvení - detekce mikrofilament



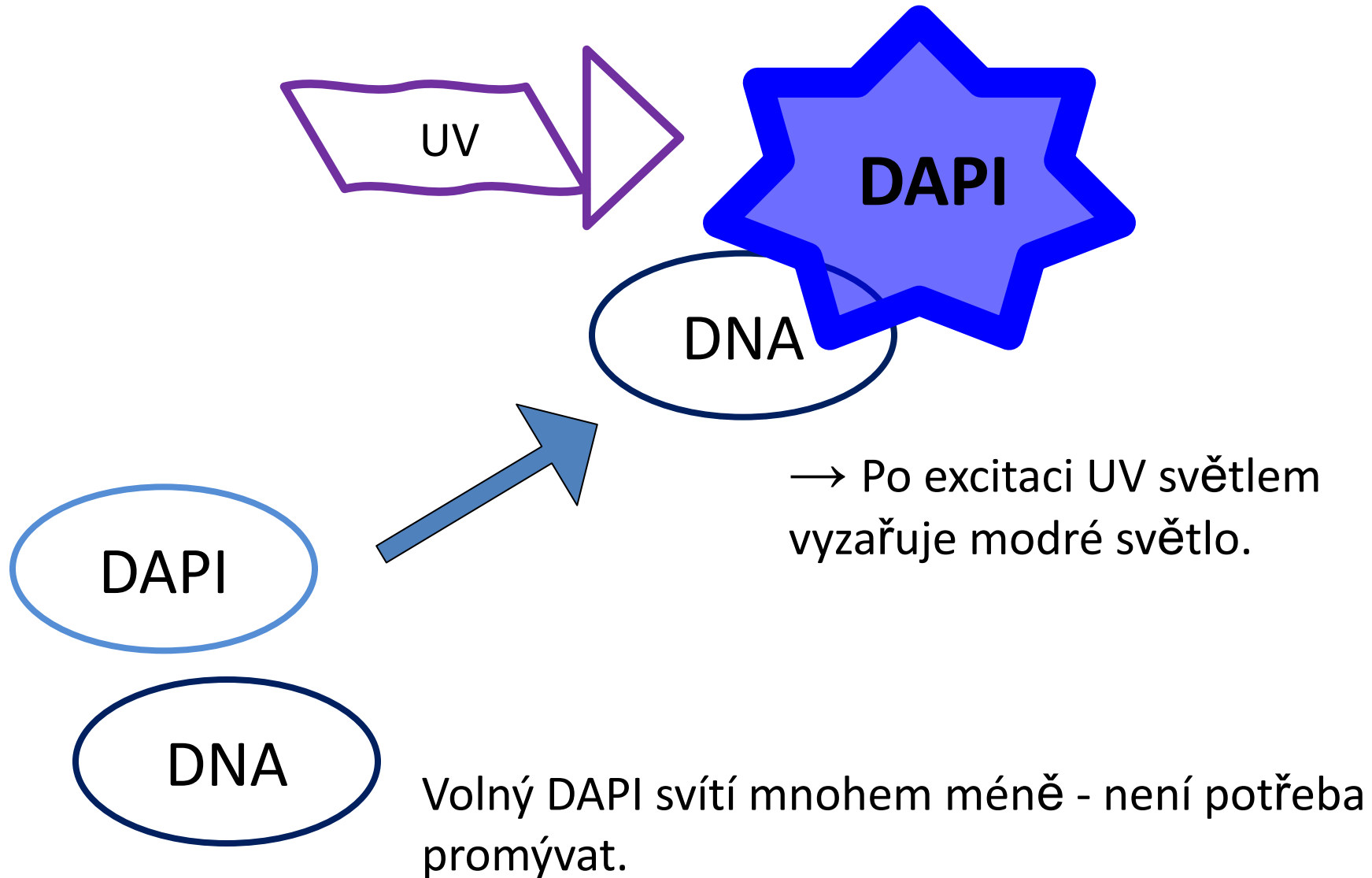
Svíí i nenavázaný -
nenavázanou frakci
je potřeba odmýt

→ zviditelnění
detekované molekuly
po excitaci zeleným
světlem

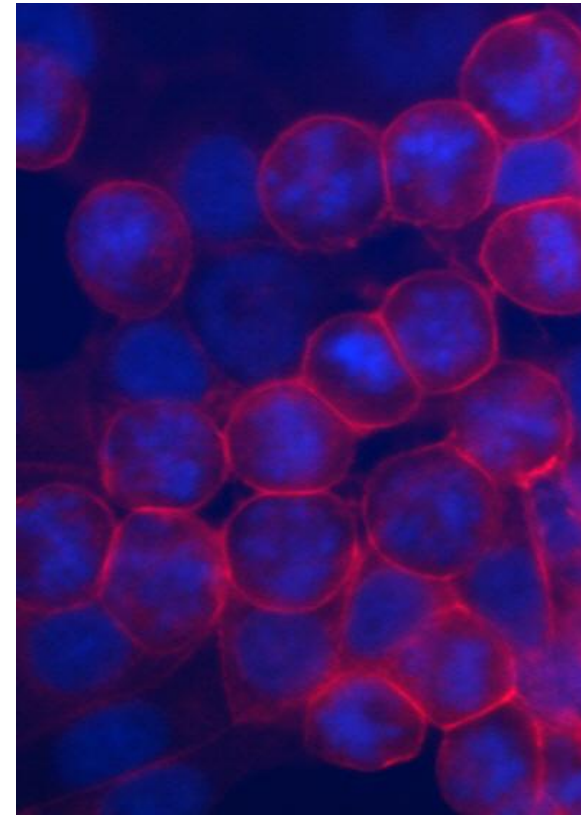
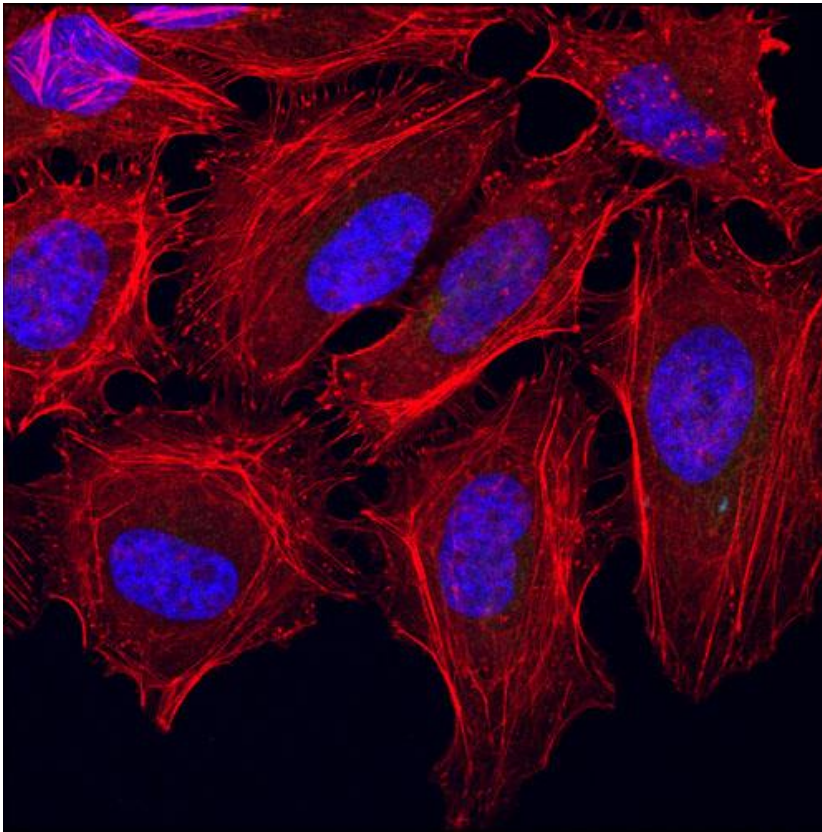
ve vzorku „neviditelné“

F-aktin

Fluorescenční barvení - detekce DNA



Fluorescenční barvení **mikrofilament** a **DNA**



Jaký je tvar buněk a jader v barvených buňkách?

Jsou buňky senzitivní nebo rezistentní k účinku cytostatika?

Úloha 2: Porovnání hladiny proteinu ve vzorcích - *Izolace, separace a barvení proteinů*

Dnes I. část - Izolace proteinů, měření koncentrace proteinů

Izolace proteinů z tkáně: prvním krokem je dezintegrace tkáně a buněk

V našem experimentu používáme pro rozbití buněk detergent SDS.

Testované vzorky: „sval“, „mléko“, „játra“, „přečištěné sérum“

Pracovní postup:

Izolace proteinů

- přenos kousků tkání do zkumavky
- dezintegrace buněk pomocí lyzačního pufru obsahujícího SDS (sodium dodecylsulfát)
- oddělení směsi proteinů od nezlyzovaných zbytků centrifugací

Stanovení koncentrace proteinů

- pomocí Bradfordovy metody

Princip metody dle Bradforda

- kolorimetrická reakce po smíchání Bradfordova činidla s roztokem obsahujícím proteiny
- Bradfordova činidlo obsahuje barvivo **Coomassie Brilliant Blue**
 - váže bazické a aromatické aminokyselinové zbytky v proteinech (ARG, PHE, TRY a PRO)
- po navázání barviva na aminokyseliny dochází ke změně barvy roztoku z hnědé na modrou
- detekce při 595 nm



Úloha 2: Porovnání hladiny proteinů ve vzorcích - *Izolace, separace a barvení proteinů*

Příště II. část - separace proteinů, barvení separovaných proteinů

