

Izolace proteinů ze savčích buněk

Velmi často je nezbytné v laboratorní praxi izolovat určitý protein z biologického materiálu. Cílem je především získat čistý, aktivní produkt v co nejvyšším možném množství. Úspěšnost izolačního procesu bývá ovlivněna mnoha faktory od typu vstupního biologického materiálu, přes stabilitu a obsah izolovaného proteinu, nároky na čistotu vzhledem k dalšímu použití produktu, až po časovou a finanční náročnost celého procesu.

Prvním stupněm při izolaci intracelulárních proteinů a dalších vysokomolekulárních biologicky aktivních látek je dezintegrace buněk použitého biologického materiálu. Při dezintegraci (lýzi) lze použít celou řadu postupů, které můžeme rozdělit na fyzikální způsoby (rychlé zmrazení a rozmrazení, rozbíjení buněk skleněnými střepey, sonikace), chemické způsoby (alkalické prostředí, organická rozpouštědla, chelatační činidla) a biologické způsoby (enzymová lýze, autolýza). Při izolaci celkových proteinů z lidských buněk se velmi často k lýzi používá celá řada pufrů obsahujících různé detergenty k narušení integrity buněk. Pufr volíme podle toho, jaký typ proteinů chceme izolovat. Např. pro získání vzorku celkových proteinů se používá NP-40, pro cytoplazmatické proteiny Tris-HCl pufr, pro proteiny cytoskeletu Tris-Triton pufr, pro membránové proteiny NP-40 nebo RIPA pufr a při izolaci jaderných či mitochondriálních proteinů je také vhodný RIPA pufr. Tyto pufrы se samozřejmě liší složením, nejdůležitější je pak volba použitého detergentu, který je v pufru obsažen. Do lyzačních pufrů se obvykle přidávají inhibitory proteáz a fosfatáz, což jsou enzymy, které by normálně degradovaly izolované proteiny. Je tedy nezbytné zastavit jejich funkci právě přidáním vhodných inhibitorů.

Proteiny během lyzačního kroku po narušení buněčných membrán přecházejí do lyzačního pufru. Od zbytků buněk jsou pak odděleny centrifugací, kdy proteiny jsou obsaženy v supernatantu a ostatní buněčné zbytky zůstávají na dně mikrozukmavky v podobě pelety. Získané proteiny je nezbytné dále purifikovat, k čemuž slouží celá řada metod. Proteiny mohou být ze vzorku odděleny pomocí dialýzy, tedy na základě difuze nízkomolekulárních látek přes membránu z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí s nižší koncentrací dané látky. Další možností je použití chromatografických metod, např. chromatografie na iontoměničích, chromatografie s hydrofobní interakcí nebo gelová permeační chromatografie. Při použití těchto technik můžeme oddělit jeden konkrétní protein ze směsi celkových proteinů.

Úloha 1: Přípravte proteinové extrakty z lidských buněk HEK 293

Pomůcky: centrifuga, vortex, automatické pipety, špičky, mikrozkušavky, nádoba s ledem, škrabka na buňky

Chemikálie: fosfátový pufr PBS 1x (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH = 7,4), NP-40 (150 mM NaCl; 1.0% NP-40 nebo Triton X-100, 50 mM Tris pH 8,0) pufr obsahující inhibitory fosfatáz a proteáz

Biologický materiál: kultura lidských embryonálních ledvinových buněk HEK 293

Postup:

Připraví vedoucí cvičení:

1. Do kultivační lahve T75 nasadíte 3 x 10⁶ buněk.
2. Inkubujte 48 hod při 37 °C v 5% atmosféře CO₂.
3. Odsajte médium a vrstvu buněk promyjte 2 x 5 ml předehřátého PBS 1x.
4. Přidejte 500 µl roztoku trypsinu 1x.
5. Inkubujte 5 min nebo do doby, než se buňky pustí podkladu.
6. Trypsinizaci zastavte přidáním 500µl FBS (fetální bovinní sérum) nebo plnohodnotného média.

Pracujte ve dvojicích/jednotlivě:

7. Buňky opláchněte PBS 1x a na ledu seškrabejte do 200 µL pufru NP-40 s přidavkem fosfatázových a proteázových inhibitorů.
8. Třepejte 40 min na ledu.
9. Centrifugujte vzorky při 12 000 rpm, 25 min, 4 °C.
10. Přepipetujte supernatant obsahující vzorek celkových proteinů do čistých mikrozkušavek umístěných na ledu.
11. Zjistěte koncentraci proteinů ve vzorcích dle metody Bradfordové.

Stanovení množství proteinů v buněčném lyzátu

Výběr konkrétní metody pro stanovení množství proteinů v biologickém vzorku závisí na mnoha faktorech. Roli zde hraje především množství a charakter analyzovaného proteinu, vyžadovaná míra přesnosti a specifičnosti stanovení, přítomnost interferujících látek ve vzorku a v neposlední řadě také finanční, časová a materiální náročnost provedení určité metody. Nejrozšířenější jsou v běžné laboratorní praxi spektrofotometrické metody využívající absorpci světla přímo vybraných proteinů nebo jejich barevných reakcí s určitými činidly (kolorimetrické metody), dále ve velmi malé míře také gravimetrie a refraktometrie.

Pro stanovení koncentrace čistého proteinu ve vzorku je možné přímé měření absorbance této bílkoviny bez nutnosti použití standartu. Je však nezbytné znát extinkční koeficient analyzované látky při dané vlnové délce. Absorbance se obvykle měří při 280 nm (aromatické aminokyseliny) nebo při 205 nm (peptidové vazby). V UV oblasti absorbují aromatické aminokyseliny (hlavně Trp a Tyr), proto je nutná jejich přítomnost. Pokud vzorek obsahuje příměsi absorbující na stejných vlnových délkách, budou tyto ovlivňovat získané výsledky. Uvedená metoda je nedestruktivní a vzorek může být použit pro další analýzu.

Nedestruktivní metodou je také fluorimetrické stanovení proteinů založené na reakci primárních aminoskupin v proteinu (Lys, N-koncová aminoskupina) s o-ftalaldehydem. Citlivost metody může být zvýšena hydrolyzou proteinů před měřením. Měření probíhá po přidavku hydroxidu sodného, excitační vlnová délka 340 nm, emise mezi 440 a 455 nm a může být rušeno pufrý s obsahem primárních aminoskupin.

Mezi kolorimetrické metody stanovení množství proteinů ve vzorku patří biuretová metoda, která je založena na reakci Cu^{2+} s bílkovinou nebo jejími štěpnými produkty v alkalickém prostředí za vzniku modrofialového zbarvení ($\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$). Činidlo obsahuje CuSO_4 , vlnan sodno-draselný a NaOH . Tato metoda je málo citlivá a může interferovat s přítomností NH_4^+ nebo Tris v analyzovaném vzorku. Citlivost biuretové metody může být zvýšena přidavkem Folin-Ciocalteuova fenolového činidla. Po této úpravě vznikla Lowryho metoda s vysokou citlivostí, která však mnohem více závisí na složení konkrétního vzorku proteinů. Folin-Ciocalteuovo činidlo obsahuje kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrosinovými zbytky proteinů. Intenzita vzniklého modrého zbarvení se měří při 650 nm. Nevýhodou této metody je časová náročnost a úzký interval pH reakční směsi, ve kterém je použitelná. S metodou Lowryho negativně interferují některé pufrý, lipidy, cukry, soli, nukleové kyseliny, ammoniové ionty, thiolové sloučeniny, apod. Tyto látky je nutno před měřením odstranit.

Bicinchoninová metoda využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA), která komplexuje měďné ionty Cu^{1+} tvořené reakcí peptidové vazby s Cu^{2+} . Činidlo se připravuje

smísením roztoků sodné soli BCA v alkalickém prostředí a CuSO_4 . Vzniklé zbarvení se měří se při 562 nm. Citlivost je srovnatelná s metodou Lowryho.

Velmi populární a rychlá na provedení je metoda Bradfordové. Činidlo Bradfordové obsahuje barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250, ethanol a H_3PO_4 . Barvivo se váže na bazické a aromatické aminokyselinové zbytky v proteinech (Arg, Phe, Try, Pro). Po reakci činidla s proteinem se původní hnědé zbarvení roztoku mění na intenzivně modré ($\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$). Tato metoda je nepoužitelná pro proteiny s velmi nízkým obsahem argininu a její nevýhodou je také negativní interference s množstvím látek, zejména detergentů (SDS, Triton). Metoda Bradfordové je obdobně citlivá jako BCA a zhruba pětikrát citlivější než metoda Lowryho.

Všechny uvedené kolorimetrické metody jsou destruktivní, kdy vzorek již není možné použít pro další analýzu. V případě kolorimetrických metod stanovení koncentrace proteinů je také nezbytné paralelní měření koncentrace proteinového standardu o známé koncentraci. Množství proteinů v analyzovaných vzorcích se pak určuje na základě sestavení kalibrační křivky ze známých koncentrací použitého standardu např. hovězího sérového albuminu, ovalbuminu, apod. Výhodou je možnost využití pro směsi proteinů neznámého složení.

Úloha 2: Stanovte množství proteinů v buněčném lyzátu dle metody Bradfordové

Pomůcky: mikrotitrační destička, mikrozkuhavky, mikropipety, špičky

Chemikálie: proteinové extrakty z předchozího cvičení; 0,1% roztok BSA (hovězí sérový albumin) standardu; činidlo Bradfordové: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% (w/v) ethanol; 8,5% (w/v) kyselina fosforečná, voda

Postup:

1. Rozvrhněte si umístění koncentrační řady BSA standardu a vzorků na 96 jamkové mikrotitrační destičce a podle toho jednotlivé jamky v desce popište.
2. Připravte koncentrační řadu BSA standardu: do jamek desky v dubletu pipetujte 0, 1, 2, 3, 4, 5 a 10 μL 0,1% zásobního roztoku BSA a každý vzorek doplňte vodou na objem 10 μL . Nezapomeňte připravit také BLANK = 10 μL dH_2O .
3. Do desky v tripletu pipetujte 2 μL proteinových extraktů a doplňte vzorky vodou na celkový objem 10 μL .
4. Zásobní roztok činidla Bradfordové 5x zředte potřebným množstvím vody, abyste získali pracovní roztok 1x.
5. K řadě BSA standardu a vzorkům extraktů z buněk přidejte po 200 μL činidla Bradfordové.

6. Intenzitu vzniklého zbarvení analyzujte na spektrofotometru při 595 nm nejlépe do 10 min od přidání činidla.
7. Zpracujte výsledky v programu MS Excel a na základě kalibrační křivky sestavené z řady známých koncentrací BSA stanovte koncentraci celkových proteinů v analyzovaných vzorcích (zprůměrovat patřičné hodnoty, odečíst od absorbancí standardu i našich vzorků blank, vynést koncentrační řadu BSA do spojnicového grafu – osa x koncentrace, y absorbance BSA, klik na křivku v grafu, přidat spojnici trendu, vytvořit rovnici grafu, podle rovnice vyjádřit x a spočítat koncentrace proteinů v našich vzorcích).