

Pražské analytické centrum inovací

Projekt CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 spolufinancovaný ESF a Státním rozpočtem ČR

Ugr ct ceg' r t qv gkp 'O CNF KVQH

Lk ¶J wf g gm
''''R H'WM'Rtcj c



SEPARACE PROTEINŮ

Preparativní x analytická /měřítko, účel/

Zvláštnosti dané

povahou materiálu

(variabilita, nestálost, komplexnost)

povahou proteinů

(„multiplicita“ chemická a fyz.-chem.)

SEPARACE PROTEINŮ

PREPARATIVNÍ

- selektivita
(jednotlivé proteiny)
- zachování funkčnosti
(charakteristik)

ANALYTICKÁ

- kompletnost
(všechny proteiny)
- identifikovatelnost

„TŘI FÁZE SEPARACE“

1. „Capture“ (stabilizace, odstranění hlavních non-P kontaminant)

2. „Intermediate“ (purifikace, odstranění hlavních proteinových kontaminant)

3. „Polishing“ (dosažení vysoké čistoty, odstranění zbytkových proteinových nečistot)

STRATEGIE (střídání, nebezpečné kontaminanty, rychlost, jednoduchost)

TECHNIKY SEPARACE

Charakteristiky:

rychlost, selektivita, kapacita, výtěžek

1. FÁZE rychle, vysoká kapacita, výtěžek
extrakce (solubilizace, vsolování)
srážení (vysolování, PEG, pI)
(chromatografie - „vsádkové provedení“)

CHROMATOGRRAFIE

1. Dělení na základě dostupnosti pórů (SEC)

2. „Adsorpce“

selektivita adsorpční – ionex – afinitní

„variace“ RP-HIC-HILIC

„skupinové afinitní“

(chelatační)

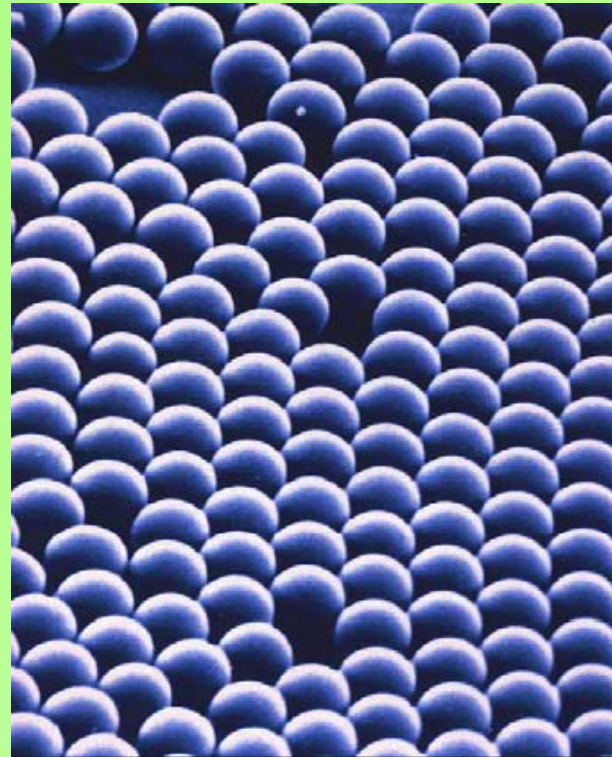
Molekulárně biologické separace - „tagy“

Použitelnost metod pro fáze 1-3

	Char.	1.	2.	3.	ST	FIN
IEC	K,S,R	1	1	1	-soli	jiné pH,
SEC		()	3	1	objem	zředění
Afin.	R.S.K.	(1)	1	1	vazba	
HIC	R,s, k	1	2	3	+soli	
RP	S		3	1	org.solvent	

Vývojové trendy

- Automatizace
- Miniaturizace
- Vývoj sorbentů (RP)
- Spojování technik
- 2-D a m-D chromatografie (proteomika)



Elektromigrační metody

Rozdělení:

stabilizace (kapilára, papír, gel)

provedení (elfo, IEF, izotachoforéza

„Kombinace“ s dělicím efektem matrice (gel, micely, elektrochromatografie)

Analytická dělení

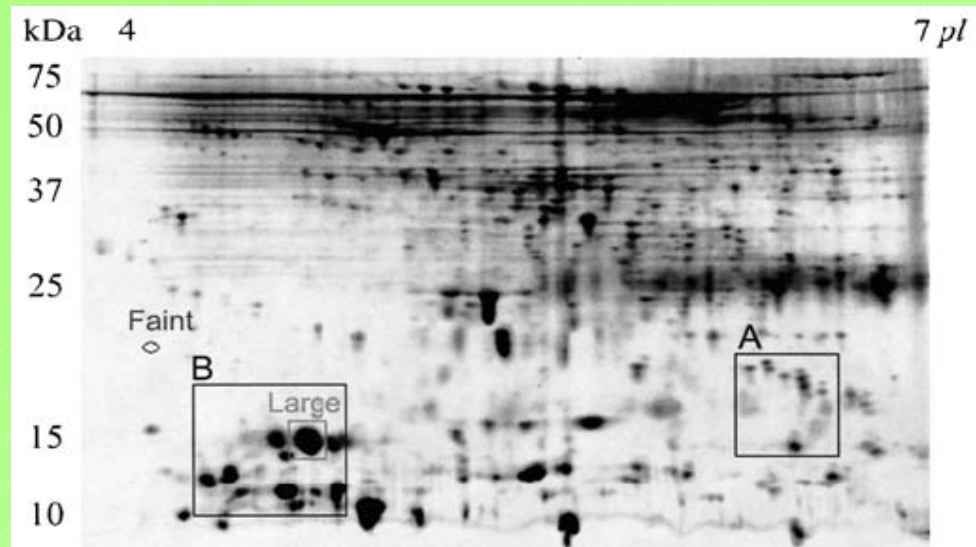
SDS/PAGE, „2D elfo“

„Dvourozměrná elektroforéza“

OBVYKLE

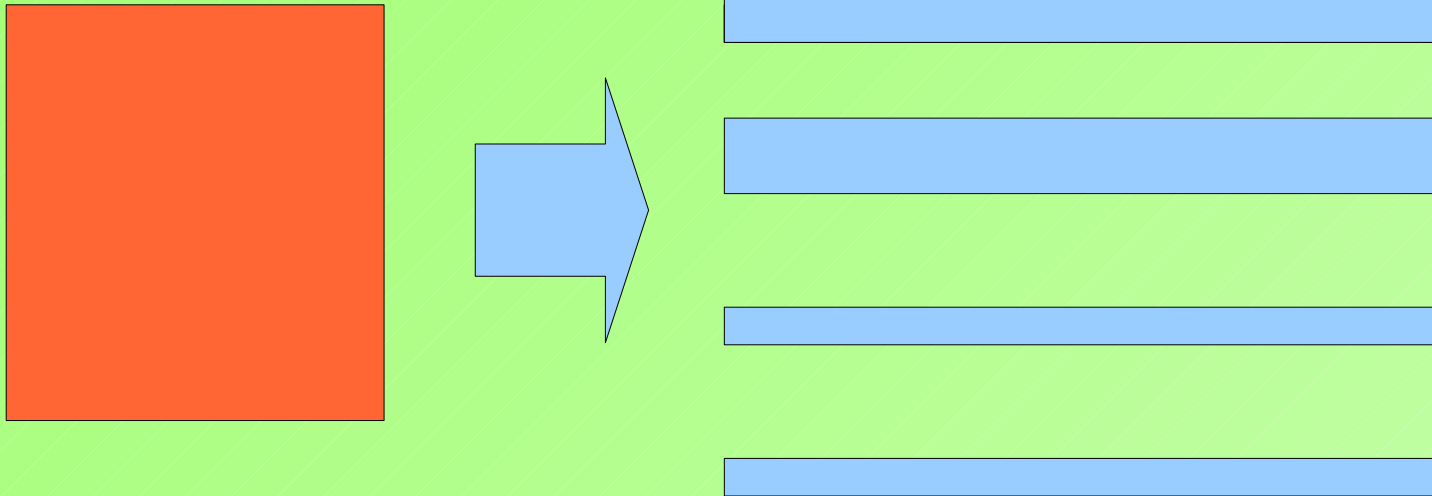
- kombinace izoelektrické fokusace (IPG)
- kolmo SDS/PAGE (PAGE)

Vysoké rozlišení (1000+ proteinů)



PROTEOMIKA

Genom ... mnoho proteomů



Postupy proteomiky

„Katalogizace“ proteinů

kombinace účinné separace s detekcí MS

2D-elfo +MALDI/TOF

Porovnávání proteomů

Studium interakcí

ALTERNATIVY

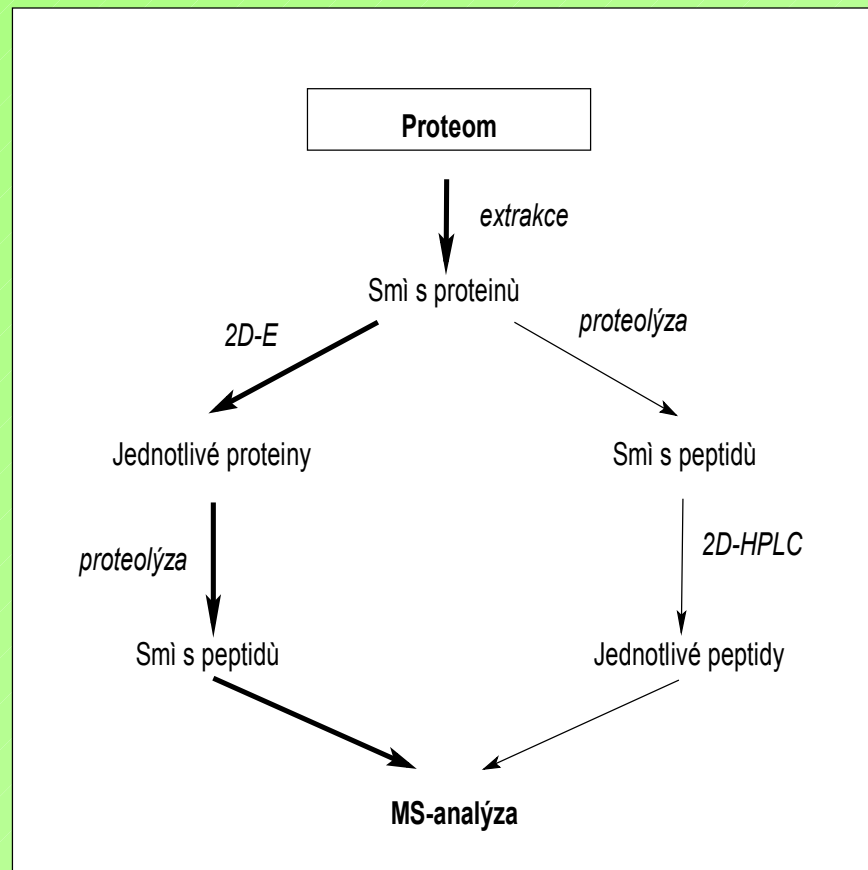
Varianty elektroforézy
denaturace (SDS)
redukce (DTT)

Varianty MS

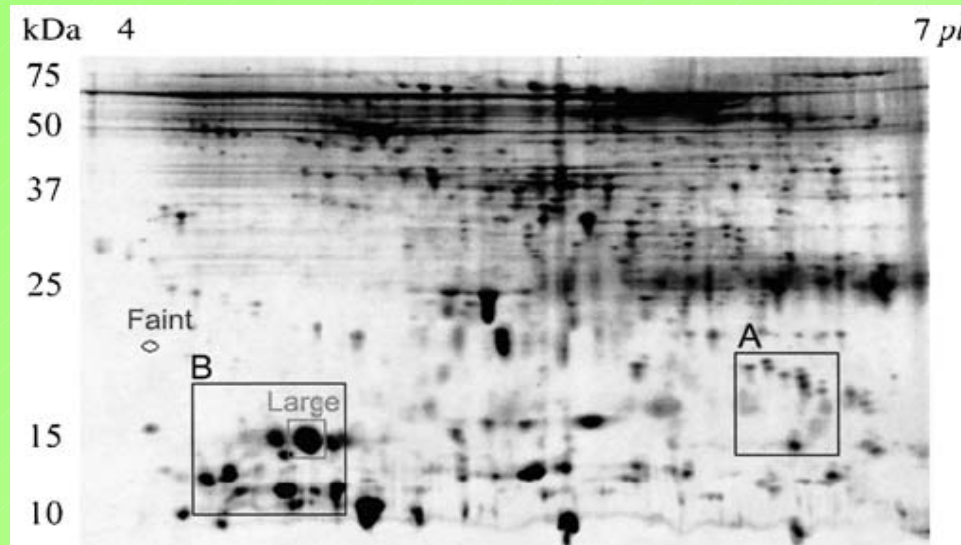
RETTOF

PSD

ESI



„Dvourozměrná elektroforéza“



1000+ proteinů je stále **málo** „redukce komplexity“

Problémy s limity dynamického rozsahu

Proteolytické štěpení

Specifické proteasy (omezený počet peptidů)

- Trypsin (/K, /R)

in-gel, po blotování – odstranění kontaminant

Varianta – štěpení před dělením (HPLC)

(úspěšnější pro málo zastoupené proteiny)

Hmotnostní spektrometrie

Dělení podle m/z v elektromagnetickém poli



Základem použití MS pro proteiny **šetrné ionizace**

FAB, MALDI, ESI

MALDI-TOF

Matrix Assited Laser Desorption Ionization

optická excitace ve vhodné matrici (směs s P)

krátkým pulsem laseru (ns)

přenos energie (proton) z matrice na P

matrice – organické kyseliny (deriváty benzoové, skořicové, nikotinové, acetofenonu aj.)

laser – UV (N_2), IR (Nd-YAG)

šetrná ionizace

MALDI-TOF

Time-Of-Flight analýza směsi iontů

urychlení elektrostatickým polem (extrakce)
průlet lineární driftovou zónou

$$z.e.U = mv^2/2$$

$$t = L/v$$

Nesplněný předpoklad – stejné ionty stejnou energií

Princip využití MALDI-TOF

Identifikace proteinů „peptide mass fingerprint“

porovnávání hodnot m (m/z) s databází

- jde o tryptické štěpy
- genom znám
- hmotnost známa dost přesně

Ale: viz výše (E_0 není nulová)

Delayed extraction (až chvíli po pulsu)

Reflektron

zvýšení přesnosti m/z

Alternativní strategie MS

Sekvenace peptidů (proteinů)

– v TOF PSD, ISD

„ladder sequencing“ (karboxypeptidasa)

– alternativní způsoby ionizace a analýzy

(ESI-MS-MS – „triple quad“)

(iontová past)

(FT-ICR)

LC-MS(-MS)

Alternativa k 2D-elfo -vícerozměrná HPLC

ionex (katex) se stupňovým gradientem
analýza vymývaných frakcí (RP)
„peak parking“

Analýza dat – speciální SW

Miniaturizace „analýza na čipu“