

Ověření účinnosti separace, čistoty a charakterizace izolovaných produktů

Imunochemie

Zuzana Bílková



Ověření účinnosti separace, čistoty a charakterizace produktů

Ověření čistoty proteinů, peptidů a polysacharidů a jejich charakterizace pomocí HPLC (iontová, SEC, afinitní chromatografie, hydrofobní)

Ověření čistoty proteinů, polypeptidů pomocí elektroforézy

Kontrola stupně purifikace

- ♦ prvotní
- ♦ průběžná (tzv. postupná eliminace)
- ♦ finální včetně strukturní charakterizace produktu
- ♦ celkové množství produktu, biologická aktivita, výtěžnost, stupeň obohacení (koncentrace)

♦ Požadavky na čistotu

podle účelu použití (technické, purifikované, vysoce purifikované)

Technické – frakcionovaná precipitace, kompromis mezi čistotou a cenou

Purifikované – vyšší nároky na čistotu, cena, separace více metod za sebou

Vysoce purifikované – vysoká cena, výzkum – strukturní studie, klinická diagnostika, kalibrátory, standardy, terapeutické účely (původ)

Hodnocení účinnosti purifikace a kritéria čistoty

- ♦ 2 parametry – výtěžnost (návrstnost - ztráty) a stupeň přečištění (kolik balastu se odstránilo)
- ♦ výhoda u biologicky aktivních látek (enzymy)
- ♦ vždy se hodnotí biologická aktivita, objem eluentu a obsah bílkovin
- ♦ kritéria čistoty – homogenita preparátu, krystalizace (1 pík u HPLC neznámá vždy homogenitu) – ověřit si různými metodami
- ♦ u biologicky aktivních látek kontaminující doprovodná biol. aktivita, přítomnost izoform (pl), pozor na proteázy
- ♦ hodnocení homogenity
 1. rozpustnost produktu (saturační křivka s ostrým přechodem v místě nasycení roztoku)
 2. analytická ultracentrifugace (60tis./ot./min, fotometricky)
 3. centrifugace v gradientu hustoty (1 frakce, - čas)
 4. SDS-PAGE a další elektroforetické metody
 5. Imunochemické metody

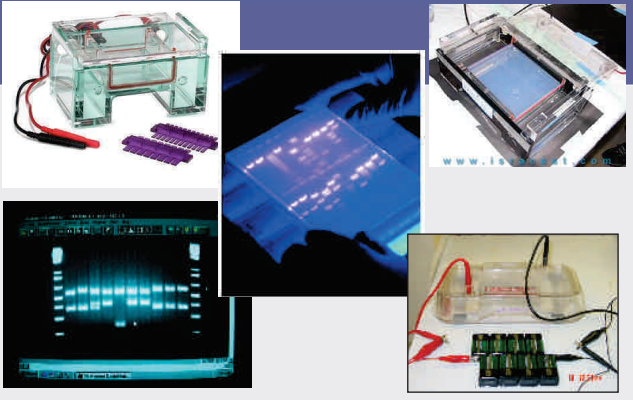
Zakoncentrování produktů a jejich konečná úprava

- ♦ zakoncentrování přečištěného produktu
- ♦ odpařování (x stabilita)
- ♦ mrazová sublimace (lyofilizace) – hygroskopický prášek (sole, Δ pH, organická rozpouštědla) – denaturace, fragmentace
- ♦ precipitace a resolubilizace
- ♦ ultrafiltrace (rychlost sedimentace, rovnováha)
- ♦ krystalizace (náročné, zdlouhavé)

Charakterizace produktů

- molekulová hmotnost celé molekuly, dílčích podjednotek (SDS-PAGE, SEC)
- tvar a M_r – ultracentrifugace
- izoelektrický bod pI - IEF
- spektrální vlastnosti (UV-VIS, cirkulární dichroismus, NMR spektroskopie)
- analýza primární struktury, sekvence monomerů
- peptidové mapování s MS analýzou
- rentgenostrukturní analýza

Elektromigrační metody



Princip elektroforézy

Separáční metoda využívající různé pohyblivosti různých iontů (složek směsi) ve stejnosměrném (homogenním) elektrickém poli.

Pohyblivost separovaných iontů závisí také na:

- ♦ použitím elektrolytu (kapalné fázi)
- ♦ chemické vlastnosti a porozita nosiče

Většinu biologicky zajímavých látek lze ve vodném prostředí převést na **elektricky nabitě částice**.

Metodika: disociace, změna pH, adsorpce iontů jiného druhu, chemickou vazbou - tvorbou tzv. ionogenních komplexů.

Princip

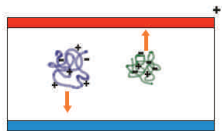
- metoda využívaná k separaci makromolekul na základě náboje, konformace nebo velikosti
- migrace nabitě částice v elektrickém poli je úměrná jejímu celkovému náboji, velikosti a tvaru

$$v = \frac{q \cdot E}{f}$$

v — rychlost
 q — celkový náboj
 E — intenzita el. pole
 f — frikční koeficient (popisuje tvar a velikost molekuly)

- $pI > pH$ — kladný náboj
- $pI < pH$ — záporný náboj

- malé částice s velkým nábojem – velká pohyblivost
- velké částice s malým nábojem – malá pohyblivost



Jevy doprovázející elektroforézu

Produkce Jouleova tepla

S rostoucím napětím (Ohmův zákon) roste elektrický proud: $I = U/R$. Pokud el. proud nekoná mechanickou nebo chemickou práci, energie se bez užítku přeměňuje na teplo: **Jouleovo teplo**

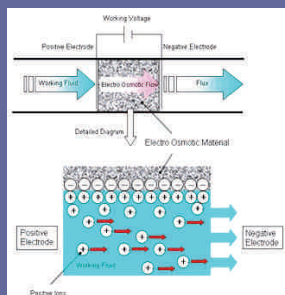
Chlazení gelů u vysokonapěťové elektroforézy – voda, termostat, led

Elektroendoosmóza

Uplatňuje u kapilární elektroforézy. Stěny kapilár jsou vyrobeny z křemičitého skla a vlivem disociace silanolových skupin mají **záporný náboj**. K záporným nábojům se váží pozitivně nabitě ionty ("counterions"), vytváří stacionární vrstvu (Sternova). V následující vrstvě jsou však tyto ionty již mobilní (Guy-Chapmanova vrstva).

Elektroendoosmóza

- na vnitřním povrchu kapiláry v místě styku s vodivým roztokem vzniká elektrická dvojevrstva
- pevná část (stěna kapiláry) je nabitá nepohyblivým plošným záporným elektrickým nábojem
- z kapalné části se kladné ionty připojí ke stěně kapiláry (dvojevrstva), ionty se pohybují k anodě
- pohyblivá vrstvička se žene kapilárou a strhne sebou celý průřez kapaliny v kapiláře
- roztok putuje kapilárou celý najednou (u elektroforézy putují jen ionty).



Typy elektroseparačních metod

- ♦ Volná elektroforéza
- ♦ Zónová elektroforéza
- ♦ Isoelektrická fokusace
- ♦ Kapilární elektroforéza
- ♦ Vertikální x Horizontální
- ♦ 1D nebo 2D rozměrná
- ♦ Nativní x Denaturační podmínky
- ♦ Analytická x Preparativní

Zónová elektroforéza - Elektroforéza na nosiči

provádí se na hydrofilních poréznych nosičích, nerozpustných ve vodě, s minimální adsorpční schopností, zabraňuje zpětnému mísení rozdělených složek

Nosiče

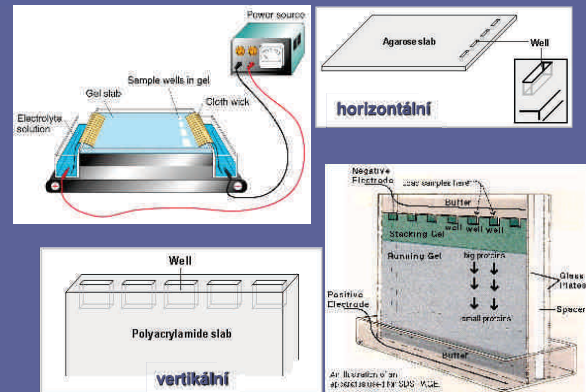
Papírová elektroforéza – nosičem elektrolytu je chromatografický papír – analýza bílkovin; dělení nízkomolekulárních látek, aminokyselin

Elektroforéza na tenké vrstvě – nosičem elektrolytu (H₂O + pufr) je vrstva silikagelu nebo škrobu na skleněné podložce.

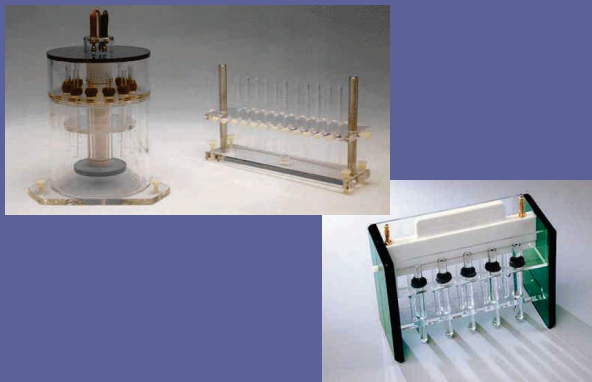
Gelová elektroforéza – agar, agaróza, PAAG, porozita gelu
gradient porozity
gradient pH

Provedení: plošné, v trubičkách, vertikální, horizontální

Gelová elektroforéza



Aparatury pro trubičkové gely



Kombinovaná elektroforéza

dělení je využito (kromě el.náboje) ještě dalších odlišností – např. velikosti a molární hmotnosti iontů. Nosičem elektrolytu je obvykle gel (porozita gelu) př. SDS-PAGE elektroforéza – dělení látek podle Mr (zvýšení účinnosti separace, citlivosti detekce)

2D elektroforéza – kombinace izoelektrické fokuzace s gelovou chromatografií

Elektrochromatografie – dvourozměrná – jeden směr chromatografie, druhý směr elektroforéza,

Elektrodialýza.

Elektroultrafiltrace.

Elektrodesorpce – eluce složek afinitní chromatografie elektrickým polem.

Blotting (Western blotting, Immunoblotting)

Použití

1. pro účely analytické i preparativní (méně)
2. k separaci velkých molekul (proteiny nebo NK)
3. k separaci menších molekul (cukry, peptidy nukleotidy)

Faktory ovlivňující pohyblivost látky

1. Celkový povrchový náboj separované látky
2. Velikost a tvar molekuly
3. Porozita gelu
4. pH a složení elektrolytu

Dva hlavní typy PAAG elektroforézy

Nativní gelová (nedenaturační) elektroforéza

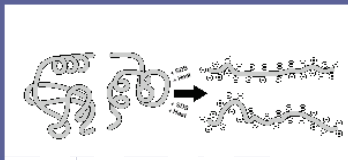
- Probíhá bez denaturačních činidel.
- Proteiny migrují gelem podle svého celkového náboje velikosti a tvaru a podle velikosti pórů v gelu.

SDS gelová elektroforéza

- Proteiny jsou denaturovány dodecylsíránem sodným (SDS) a β -merkaptanolem (zruší disulfidické vazby).
- Pohyblivost závisí na molekulové hmotnosti polypeptidových řetězců (Mr)
 - Vhodná pro analýzu makromolekulárních komplexů.
 - Akrylamidový gel: pevná a inertní matrix ideální pro separaci proteinů
 - Menší velikost pórů než u agarosy

Proteiny jsou tepelně denaturovány ve vzorkovém pufru obsahujícím dodecyl sulfát sodný (SDS)- zachována je tak pouze jejich primární struktura (var 2 – 3 min.)

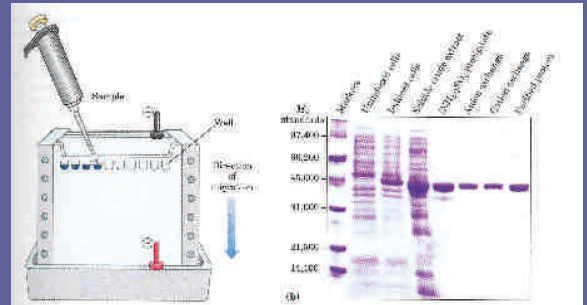
Denaturované proteiny mají vláknitý tvar a stejný záporný náboj daný vazbou SDS – migrace tedy závisí pouze na jejich molekulové hmotnosti



Aniontový detergent, solubilizuje a denaturuje proteiny
Většina proteinů váže SDS ve stejném poměru, asi 1,4 g SDS/g proteinu

PAA gelová elektroforéza - PAGE

Gel z polymerovaného akrylamidu
Polymer vytváří síť (podle koncentrace akrylamidu určitá velikost ok sítě)
Molekuly se dělí podle své velikosti (malé rychleji, velké pomaleji).



Laemmliho diskontinuální systém

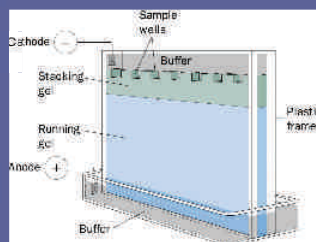
Používá se dvou gelů tzv. zaostřovacího („stacking“) gelu nahoře a separačního („running“) gelu dole. Liší se hodnoty pH 6, 8 a 8, 3 elektrodotový pufr se pak liší od obou gelových pufrů.

Mobilita separovaných proteinů mezi

a) mobilitou iontu ve stacking gelu
Cl⁻, tzv. **leading ion** = vedoucí

b) mobilitou iontu v katodovém pufru (glycin, pK 9,6, tzv. **trailing ion** = zakončující).

Ionty i proteiny migrují do zaostřovacího gelu (5%) koncentrují se do velmi úzké zóny



Co obsahuje vzorkový pufr pro SDS-PAGE?

Tris pufr utváří vhodné pH

SDS (dodecyl sulfát sodný) detergent poskytující proteinům negativní náboj

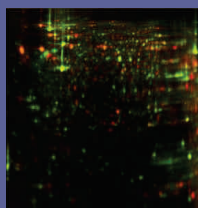
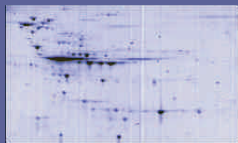
Glycerol vzhledem ke své vyšší specifické hmotnosti zajišťuje klesnutí vzorku ke dnu jamky v gelu po nanesení

Bromophenol Blue[®] barvivo umiňující sledovat průběh elektroforézy (pohyb čela v gelu)

2-ME (DTT)

Barvení proteinových gelů

- stříbrem
- Coomassie blue
- Fluorescenční barviva
- RI
- Specifické barvení pro fosfo-, glyko-



Molekulová hmotnost proteinů

velikost měřena v daltonech (Da) či kilodaltonech (kDa)

Dalton = jednotka atomové hmotnosti

= přibližně se rovná hmotnosti atomu H

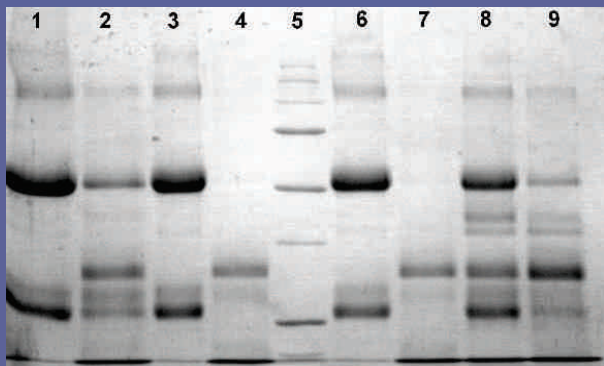
($1,66 \times 10^{-24}$ g)

= definován také jako 1/16 hmotnosti atomu O

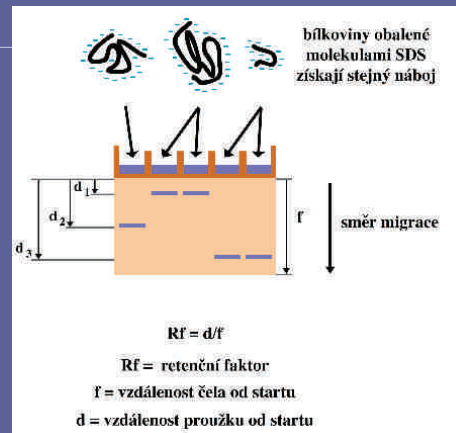
Průměrná aminokyselina = 110 Da

Průměrný nukleotidový pár = 649 Da

Gel – 10%, Mr marker pozice 5



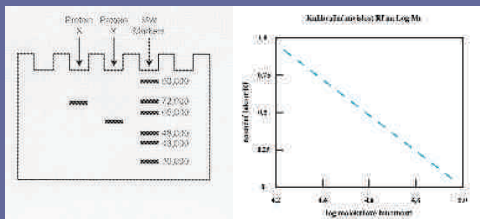
Separace látek podle jejich Mr



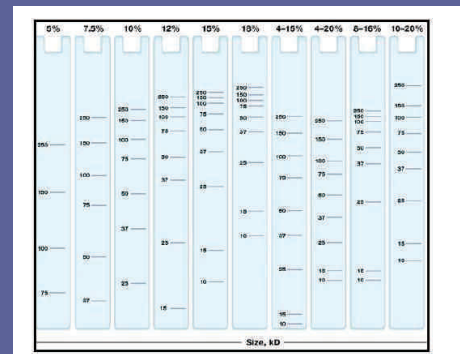
Nanesení vzorku



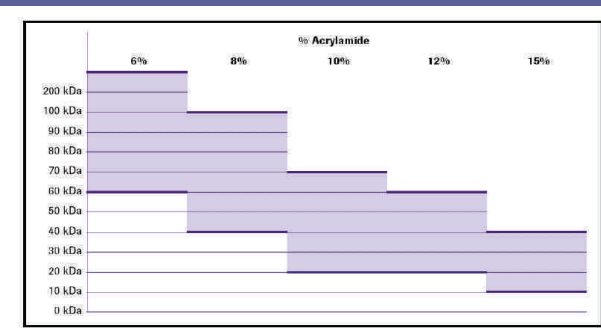
Určování molekulové hmotnosti proteinů



Účinnost separace směsi v gelech o různé porozitě



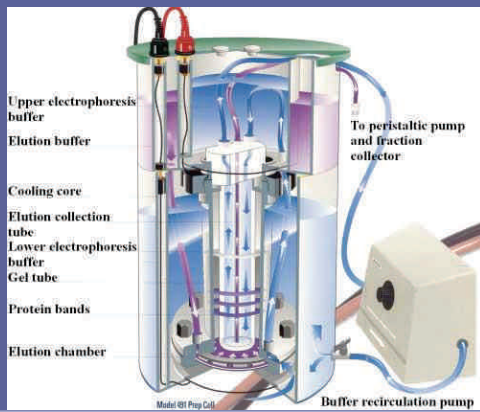
Porozita gelu a Mr separovaných látek



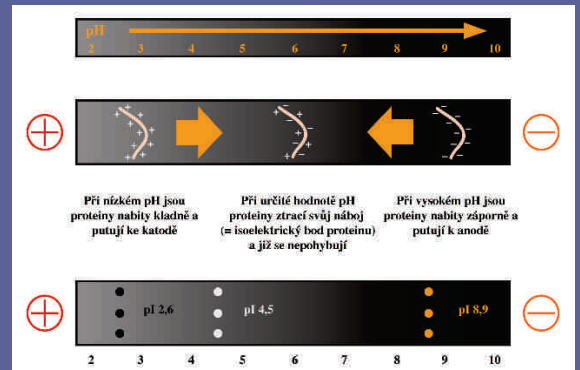
PAGE elektroforézy - modifikace

- 1) Nativní (různé pH, pufrý – Tris, MES, MOPS, HEPES)
- 2) SDS-PAGE – tris/tricine– pro proteiny menší než 14 kDa (urea)
- 3) SDS-PAGE – tris/borát/EDTA – elektroforéza pro gp, SDS se neváže na cukerné složky
- 4) Afinoforéza – polymer modifikovaný látkou vykazující afinitu k jedné ze separovaných složek (např. lektinová, chelatační)
- 5) Imunoelektroforéza, Imunofixace

PAGE elektroforéza – preparativní verze



Izoelektrická fokuzace



Izoelektrická fokuzace

Izoelektrická fokuzace se provádí buď v trubičkách nebo v plochých gelech, stripech. Hotové IEF gely s amfolity nebo immobiliny se dodávají komerčně spolu s přístroji pro automatizovanou IEF.

Vzorky se obvykle nanášejí na katodové straně.

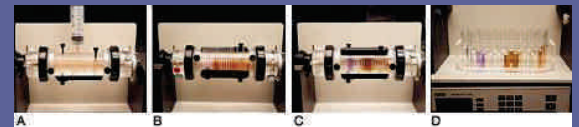
Denaturující podmínky při IEF - 9 M močovina nebo neionogenní detergenty (Triton X-100).

Využití: stanovení pI, kontrola homogenity, isoenzymy

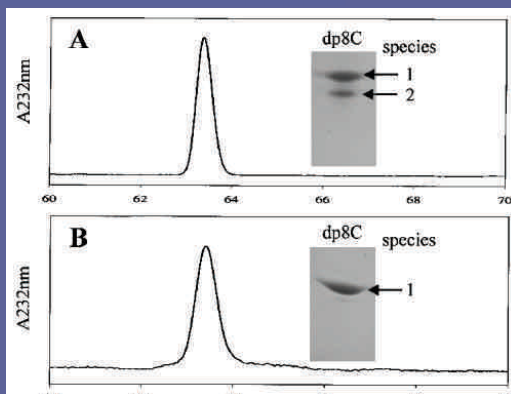
Preparativní IEF

Provádí se v chlazených vertikálních skleněných kolonách, které jsou naplněny roztokem amfolytů - stabilizováno gradientem sacharosy (viz centrifugace), Ficoll, Perkol. Na konci separace se kolona vypustí do zkumavek ve sběrači frakcí.

Zařízení Rotofor (Bio-Rad) membranový systém zón brání smísení separovaných vzorků



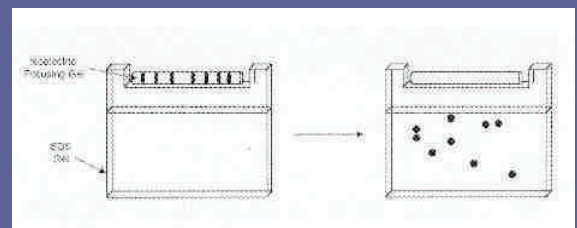
Separace izoenzymů (ΔpI)



Dvojrozměrná (2D) elektroforéza proteinů

Kombinuje použití IEF a SDS-PAGE pro účely studia proteomu, vypracováno O'Farrellem v 70. letech. Umožňuje rozlišení až 10 000 proteinů.

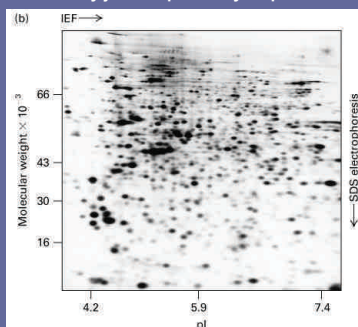
Proteiny se nejprve rozdělí podle jejich pI v gradientu pH. Po separaci v prvním rozměru je provedena elektroforéza v gelu. Proteiny migrují ve druhém rozměru v závislosti na své velikosti.



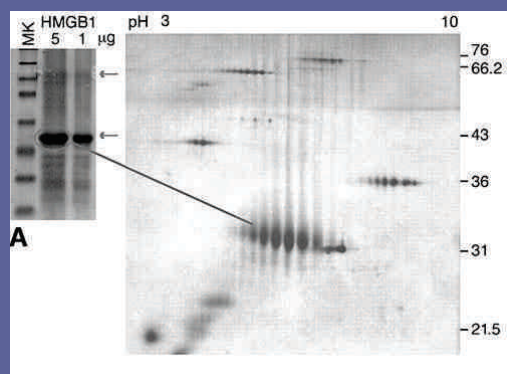
2D gelová elektroforéza

Rozdělí současně stovky i tisíce proteinů

Proteiny jsou rozprostřeny na ploše



Separace izoforem (ΔpI)



Blotting proteinů a nukleových kyselin

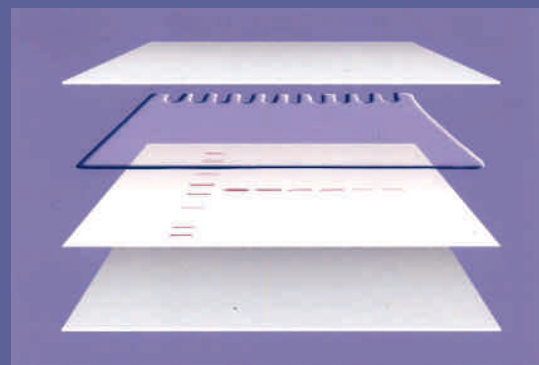
blotting (angl. blot = skvrna, kaňka, česky přenos)

pásky separované látky (např. SDS-PAGE) se přenáší elektroforézou na membránu (NC, PVDF), kde jsou uchyceny adsorpcí nebo kovalentní vazbou.

DNA analýza (Southern blotting, Southern 1975)
RNA analýza (Northern blotting, Alwine et al., 1977)
PROT analýza (Western blotting, Towbin et al., 1979)

1. fáze: klasická SDS-PAGE (separace podle Mr)
2. fáze: blotování působením elektrického proudu dojde k *přeblotování* proteinů z gelu do membrány
3. fáze: vyvíjení vizualizace přenesených proteinů, nespecifické nebo specifické barvení Ponceau S, Fast Green nebo Amidočerní 10 B.

Sestava při blotování



Rozdělení metod blottingu podle provedení

Difúzní blotting - prostá difúze v tanku s přenosovým pufrém, dlouhá doba 36-48 hodin, velkou nevýhodou difúze do stran - zhoršení rozlišení vlastní elektroforetické separace.

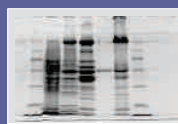
Kapilární blotting - celá jednotka je zatížena, suchý papír nasává kapilárními silami pufr, vzorek je tak tažen z gelu na membránu. Trvá zhruba 12 hodin.

Vakuový blotting - místo kapilárních sil vzorek tažen vakuem. Podstatně rychlejší (30 min). Výhodou též ostřejší pásy (potlačení difúze).

Elektroblotting - nejrychlejší a neúčinnější metoda. Hnací silou je v tomto případě síla elektrického pole. Podle provedení se rozlišuje tzv. „tankový (tank, wet)“ blotting a „polosuchý (semi-dry)“ blotting. Jediný pro vysokomolekulární biopolymery.

Detekce konkrétního proteinu Western blot s imunochemickou detekcí

Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)

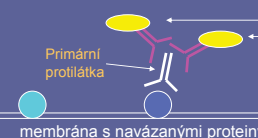


transfer proteinů z gelu na membránu
= Western blot

detekce proteinu protilátkou
(komplexu primární a sekundární protilátky)

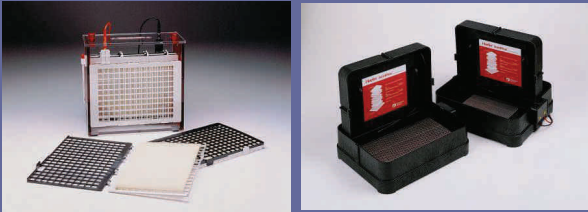
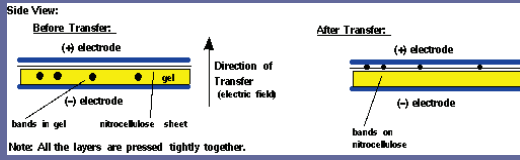
vizualizace pomocí barevné reakce nebo chemiluminiscence

W. blot



Sekundární protilátka konjugovaná s enzymem, fluor. značkou, ale i koloidním zlatem, radioaktivně, luminiscenčně. Detekce glykoproteinů Schiffovou reakcí, alcianovou modří, vazbou lektinů.

Elektroblotting



SDS-PAGE – široké uplatnění

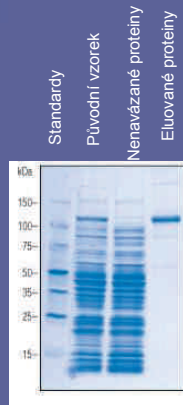
- ♦ čistota produktu – průběžné, konečné monitorování
- ♦ citlivost metody – μg až ng! podle typu vizualizace
- ♦ vizualizace všech, i kontaminujících složek x imunoblott (identifikace)
- ♦ široké rozmezí M_r látek - zvolit vhodnou porozitu gelu, nejlépe gradientové gely
- ♦ detekce kontaminace NML problematická
- ♦ průkaz produktu ve směsi (M_r , standard)
- ♦ průkaz rozpadových fragmentů (M_r , Imunoblott)
- ♦ kvantifikace (denzitometricky) omezená
- ♦ možnost následné MS analýzy „bandů“

Sledování čistoty proteinů

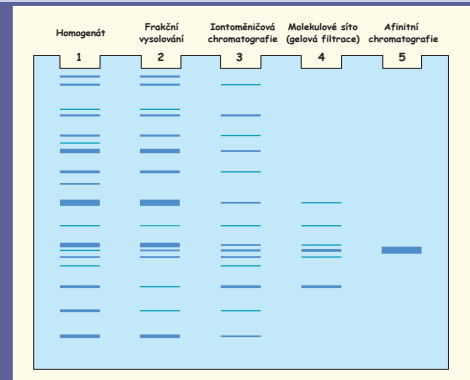
- ♦ Elektroforéza dokumentuje průběh purifikačního procesu
- ♦ Při použití standardů o známé molekulové hmotnosti je možno zhruba stanovit molekulovou hmotnost izolovaného proteinu (SDS elektroforézou)

Prokázání identity

- ♦ reakcí se specifickou Ab - imunoblott
- ♦ uvolnit elektroelucí a následně MS analýzu

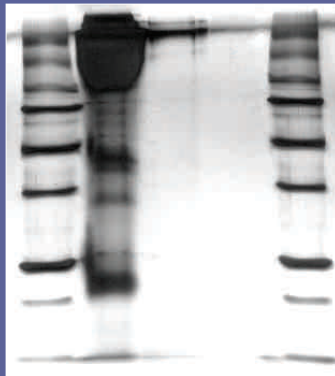


Idealizovaná PAGE purifikace fiktivního proteinu



Izolace IgG1 - hyperimunní sérum

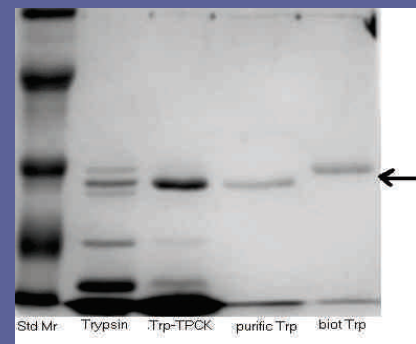
Afinitní chromatografie
MPC-protein A



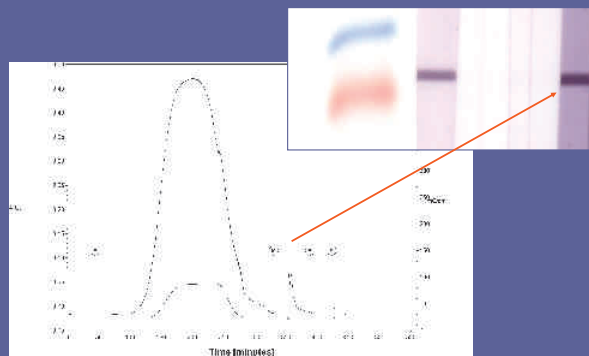
10% gel SDS-PAGE
barveno Coomassie Blue

Mr serum E1 E2 Mr

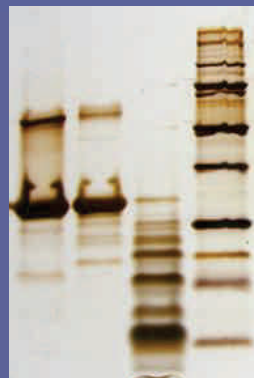
Purifikace trypsinu na koloně s p-aminobenzamidinem



Identifikace anti-CA I protilátek izolovaných afinitní chromatografií



Hodnocení čistoty výchozího materiálu před enzymovou fragmentací

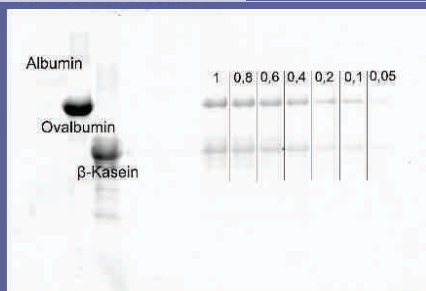


Tris-Tricine-SDS-PAGE:
gel—16,5% T, 3% C (MW 1–70 kDa),
detection with silver staining,

positions:

- (1) non-digested native CA I,
- (2) non-digested unfolded CA I,
- (3) unfolded CA I digested 3 h by immobilized trypsin,
- (4) molecular marker (10–250 kDa)

Vizualizace fosforylovaných proteinů - specifické barvení ProQ Diamond II

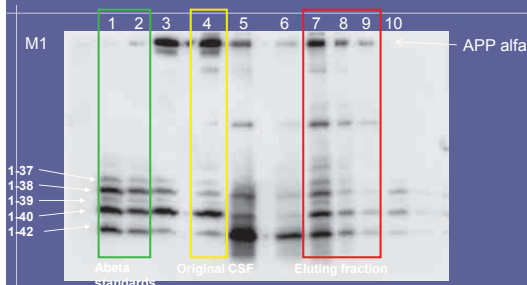


Čísla udávají množství proteinu v mg/band

Detailní snímek gelu barveného 180 minut a odbarvovaného přes noc

Detekce na přístroji Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories): Ex/Em: 532nm/602nm

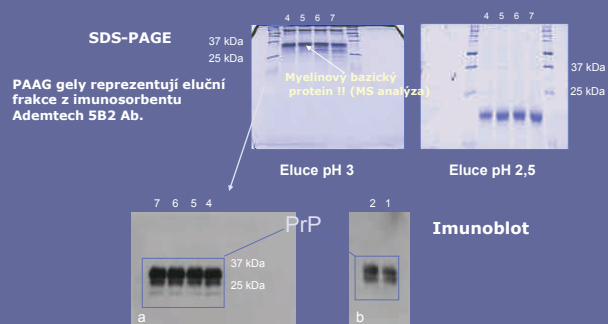
Tris-Tricine-SDS-PAGE-urea pro Abeta peptidy + blotting



Lane 1, 2 and 10: synthetic Abeta Standard mix +37, 1:38, 1:39, 1:40, 1:42
Lane 3: CSF (#3131) which was sent to Pardubice
Lane 4: Original sample (CSF UPCE)
Lane 5: Eluting fraction IP 1
Lane 6: Eluting fraction IP 1 (1:4 diluted)
Lane 7: Eluting fraction IP 2
Lane 8: Eluting fraction IP 2 (1:4 diluted)
Lane 9: Eluting fraction IP 2 (1:8 diluted)

Western blot, University of Duisburg (Hermann)

Analýzy elučních frakcí pomocí SDS-PAGE a IMUNOBLOTU



Gely reprezentují eluční frakce získané z imunosorbentů Ademtech 5B2 Ab (a) a perlové celulózy 9H7 Ab (b). Průkaz PrP specificky pomocí anti-PrP-HRP 3F4 (imunoblot).

HPLC – analytické uspořádání

Preparativní

- ♦ Částice 5 – 10 μm
- ♦ Kolona 30,0 – 21,2 mm x 250 mm
- ♦ (semiprep. 7,8 mm)
- ♦ Průtoky 10tky ml/min
- ♦ Objem vzorku ml
- ♦ Kapacita kolony – mg
- ♦ Recyklace vzorku
- ♦ Sériové řazení kolon
- ♦ Předkolona

Analytické

- Částice 1,8 – 3,5 μm
- Kolona 2,5 – 4,6 mm x 150 – 250 mm
- Průtoky 10ky $\mu\text{l}/\text{min}$
- Objem vzorku μl
- Kapacita kolony - μg
- Předkolona
- Monolitické kolony
- Kapilární kolony
- Nano-HPLC

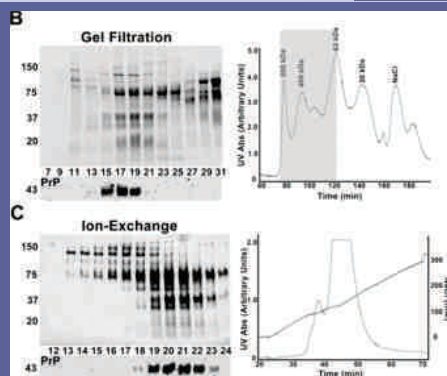
Gelová permeační chromatografie v HPLC módu

- ♦ Rigidní nosič silikagel (povahou aniont, hydrofóbní)
- ♦ Semirigidní nosič PS
- ♦ Modifikované povrchy – biokompatibilita (Silikagel modif. hydrofilním polymerem)
- ♦ Částice 5 – 10 μm , sférické
- ♦ Částice s uniformní porozitou
- ♦ Průtoky do 0,5 ml
- ♦ Teplota 4°C – 37°C

Iontově výměnná chromatografie v HPLC módu

- ♦ První typ v HP módu (HPIEC)
- ♦ Silikagelové ionexové pryskyřice
- ♦ Nové materiály - PS-DVB, alumina, PES-PA
- ♦ Pelikulární hydrofilní polymery
- ♦ Odolnost vůči tlaku
- ♦ Preparativní uspoř. - částice až 25 μm (40% hydratace)
- ♦ Anal. uspoř. – částice 5 – 10 μm , menší stupeň hydratace (10 – 20%)
- ♦ Separace x eluce – pH a iontová síla mob. fáze

Kombinace SEC (IEC) + ELFA



RP-HPLC

- ♦ Nejvhodnější pro separaci proteinů, peptidů
- ♦ podmínky, kdy nedochází k denaturaci
- ♦ Závislost retence peptidů na malé změně obsahu organického modifikátoru
- ♦ Silikagel modifikovaný různě dlouhými alkylovými řetězci – endcapping, omezená chemická stabilita!
- ♦ Polymerní kolony PS-DVB – pH 2 – 12
- ♦ Zirkoniové – výborná chemická a tepelná stabilita
- ♦ Monolitické materiály
- ♦ Částice 5 – 8 μm (lze až 40 μm)
- ♦ Velikost pórů 90 Å 300 Å 4000 Å

RP-HPLC

- ♦ Detekce UV-VIS (205 nm, 215 nm, 252 nm, 280 nm)
- ♦ Průtoky do 1 ml/min
- ♦ Teplota
- ♦ Stacionární fáze – pro silně hydrofobní – C4, C5 pro hydrofilní peptidy – C8, C18
- ♦ Organický modifikátor – acetonitril, metanol, isopropanol (gradient)
- ♦ Alternativní stacionární fáze – monolitické kolony, kapilární kolony – 150 x 0,32 mm; průměr 3,5 μm , průtok 3 $\mu\text{l}/\text{min}$