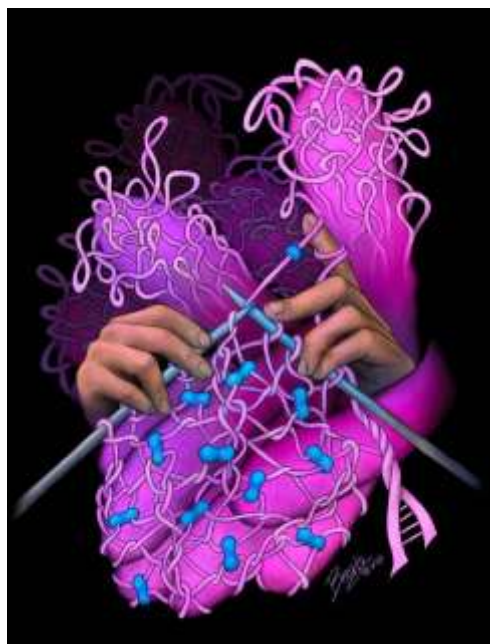




Методи виявлення та вивчення білків



2020-04-24,
Артем ПІДДУБНИЙ

Protein separation technique

Physical or chemical property

native gel electrophoresis

molecular weight, charge

SDS-PAGE

molecular weight

Isoelectric focusing

charge

chromatofocusing

charge

ion exchange chromatography

charge

gel filtration chromatography

molecular weight, size

ammonium sulfate precipitation

hydrophobicity

hydrophobic interaction

hydrophobicity

chromatography

reverse phase chromatography

hydrophobicity

affinity chromatography

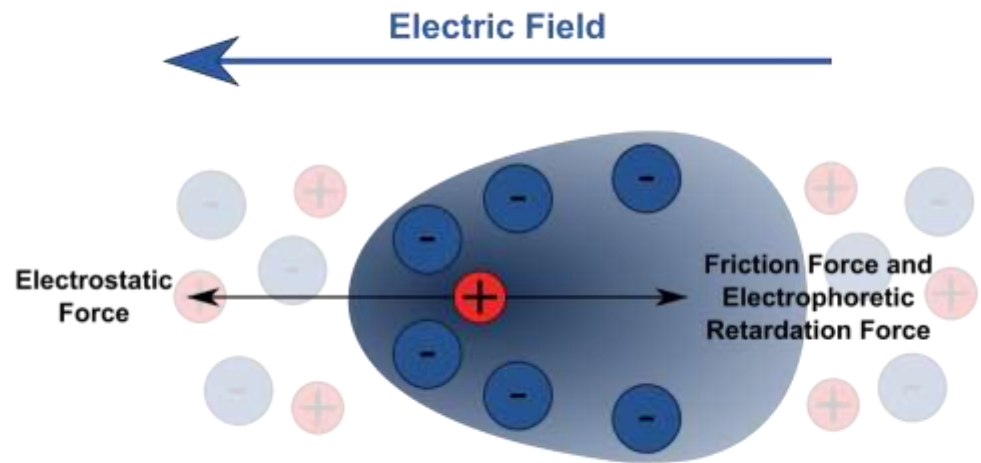
biological affinity

ultracentrifugation

compartmentalization

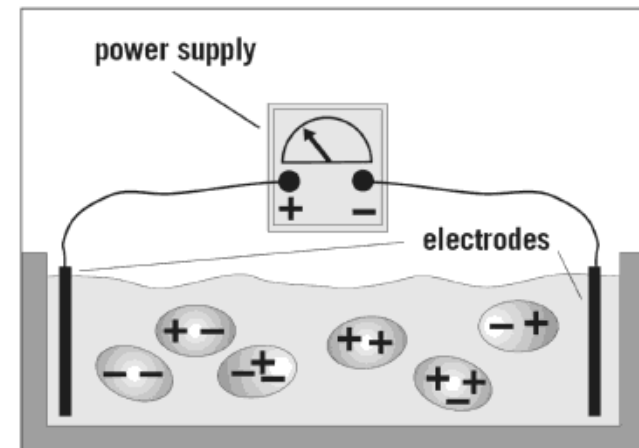
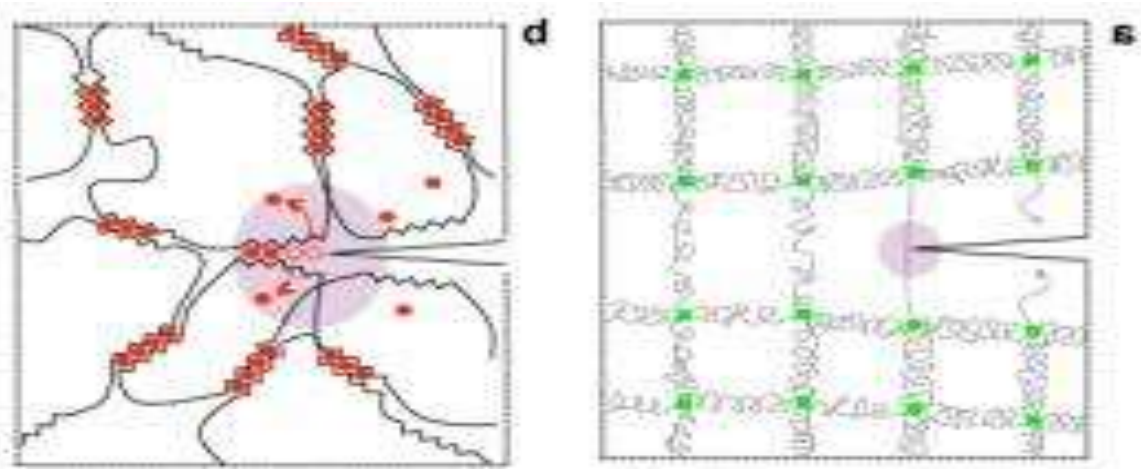


- SDS-PAGE - **sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis** (натрій-доцецилсульфат-опосередкований еклектрофорез у поліакриламідному гелі)
- Ulrich K. Laemmli, **1970**, Geneva
- Початок впровадження на кафедрі патологічної анатомії – **2015 рік**.

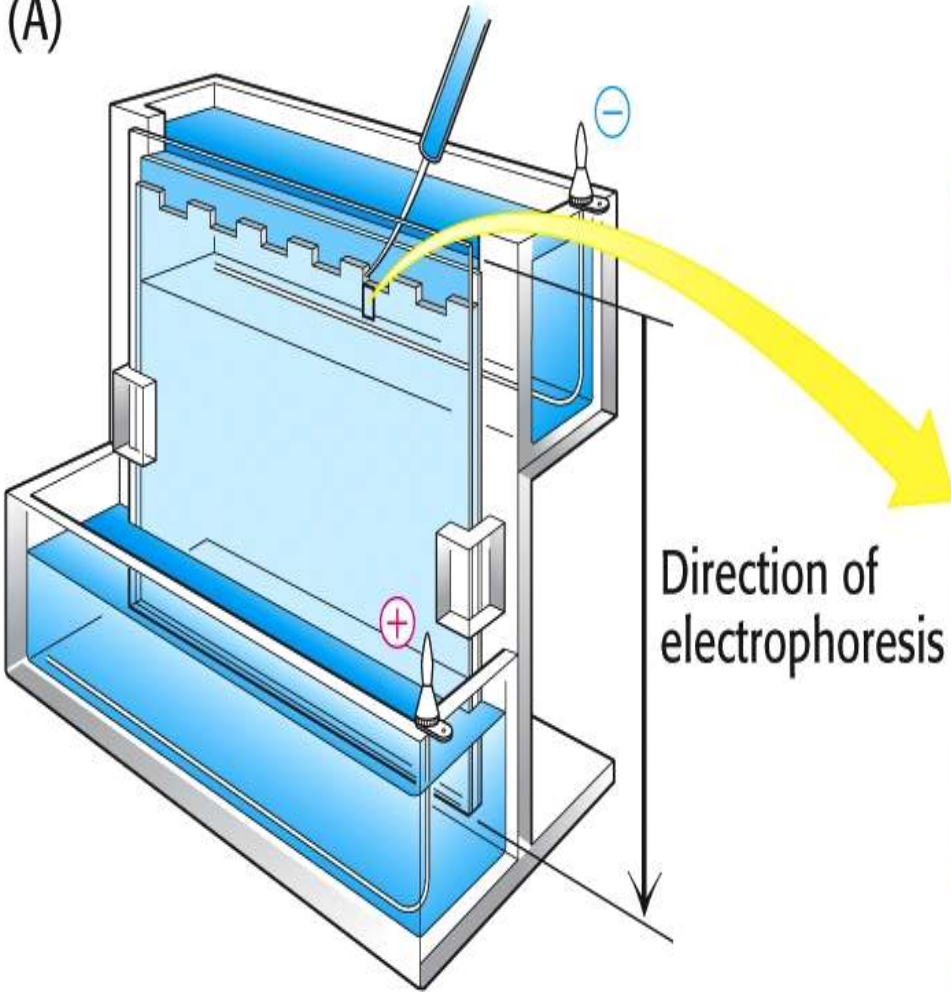


Види електрофорезу в МБ

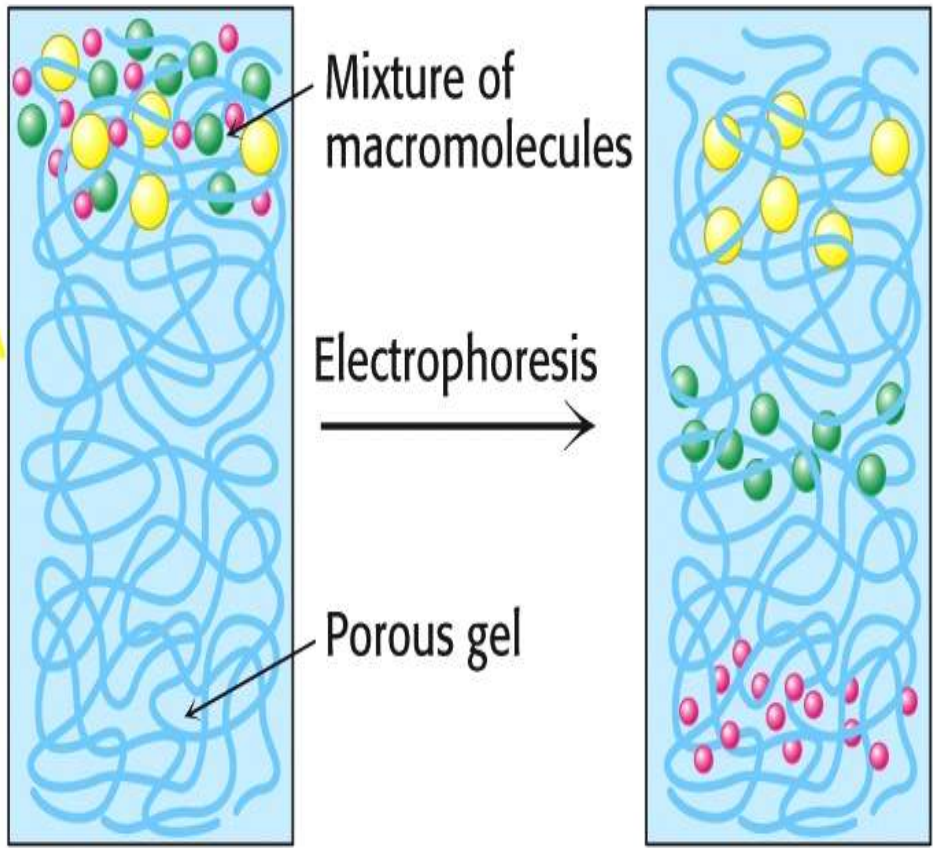
- Горизонтальний агарозний гель
 - Розділення дрібних молекул (ДНК)
- **Вертикальний поліакриламідний гель**
 - - Різна молекулярна маса
 - - Різний електричний заряд (позитивний чи негативний)
 - - Різна просторова структура (фібрилярна, глобулярна, альфа-структура)



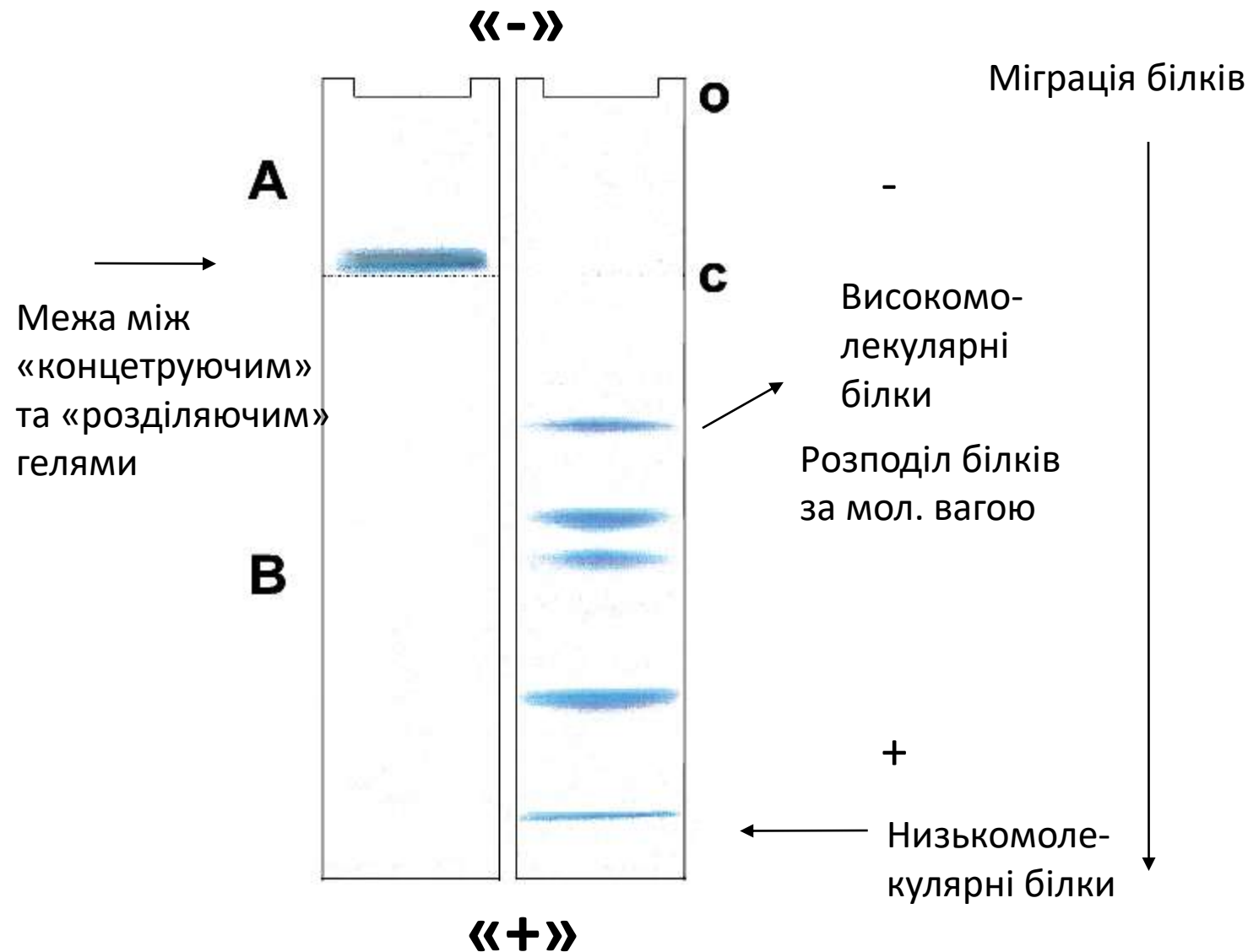
(A)



(B)



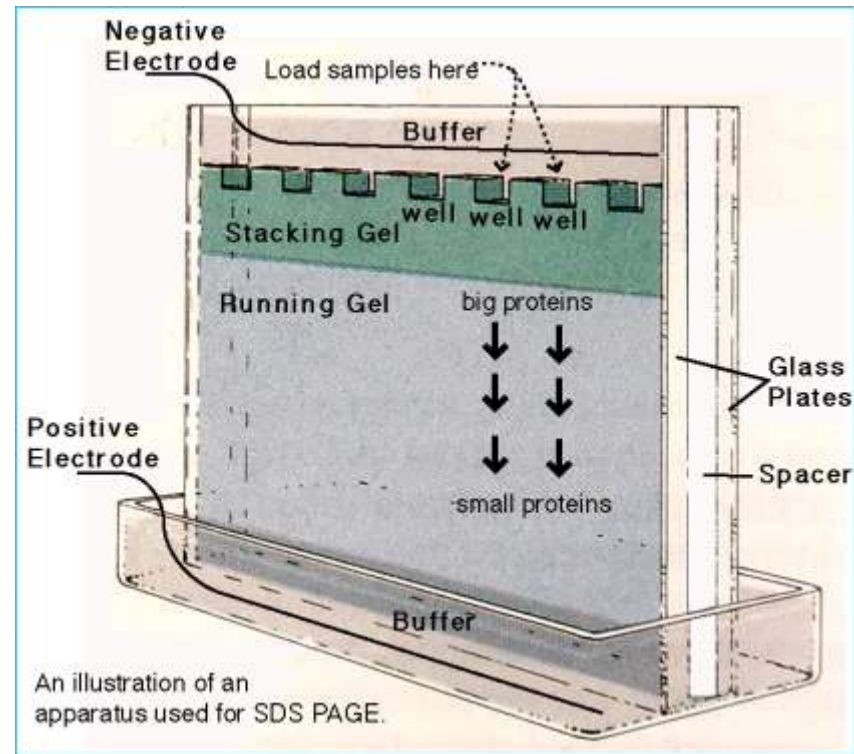
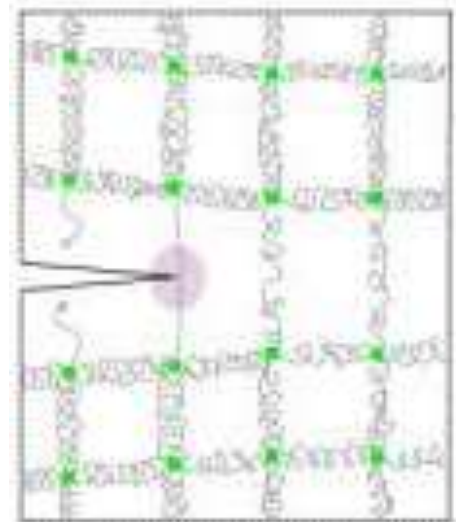
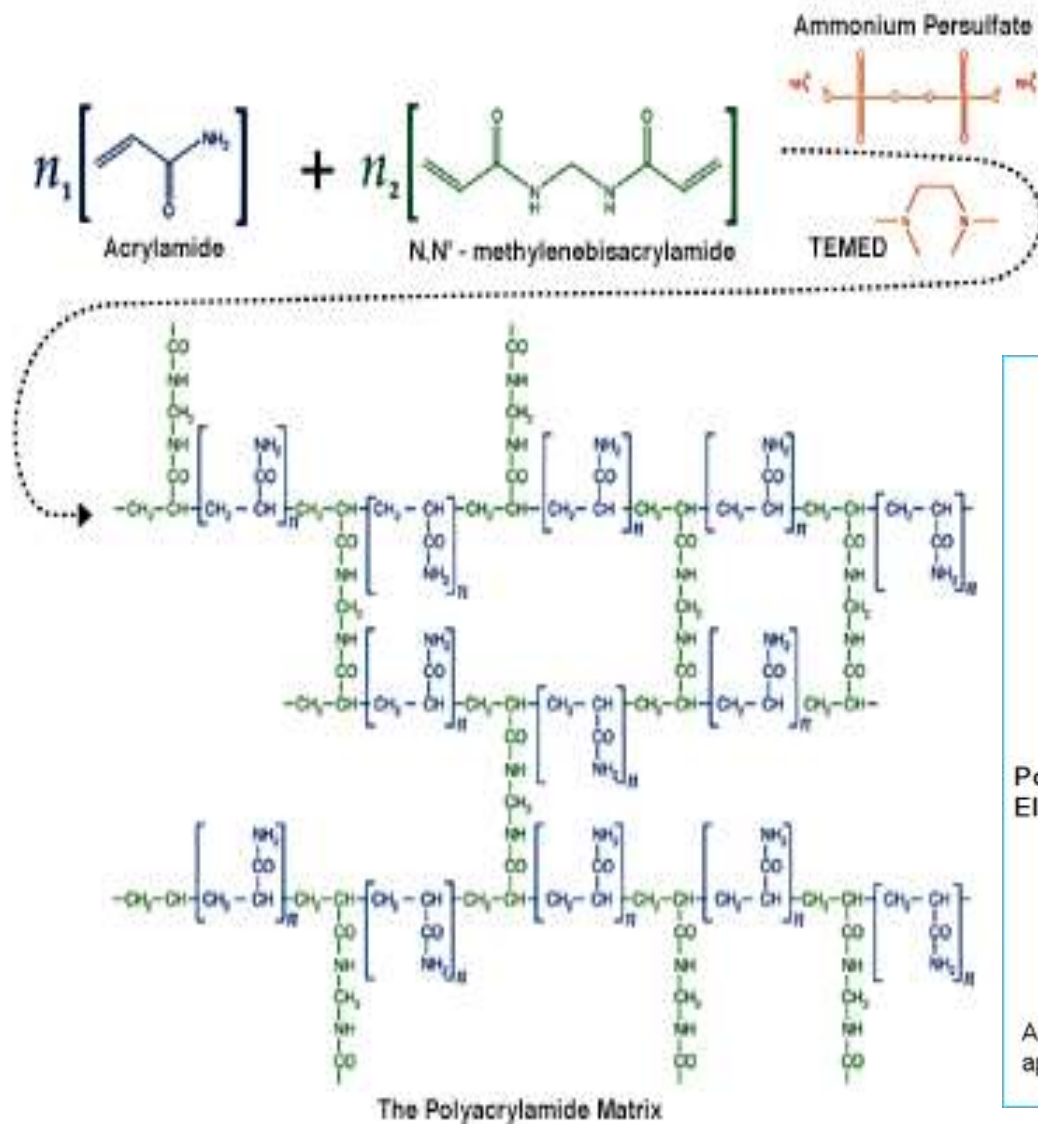
Сепарація білків



Як це все працює?

1. Заливка та полімеризація гелю (концетруючий та розділяючий) – необхідні АПС, ТЕМЕД, ТРІС, СДС, гліцерол, Акриламід, МБА.
2. Пробопідготовка:
 - А. Виділення білку
 - В. Визначення концетрації (спектрофотометрія)
 - С. Інкубування з семпл-буфером, кріопрезервація
3. Форез гелю (тріс-гліциновий буфер)
4. Візуалізація (кумасі блакитний, срібління, хемілюмінісценція і т.д.)

Приготування гелю

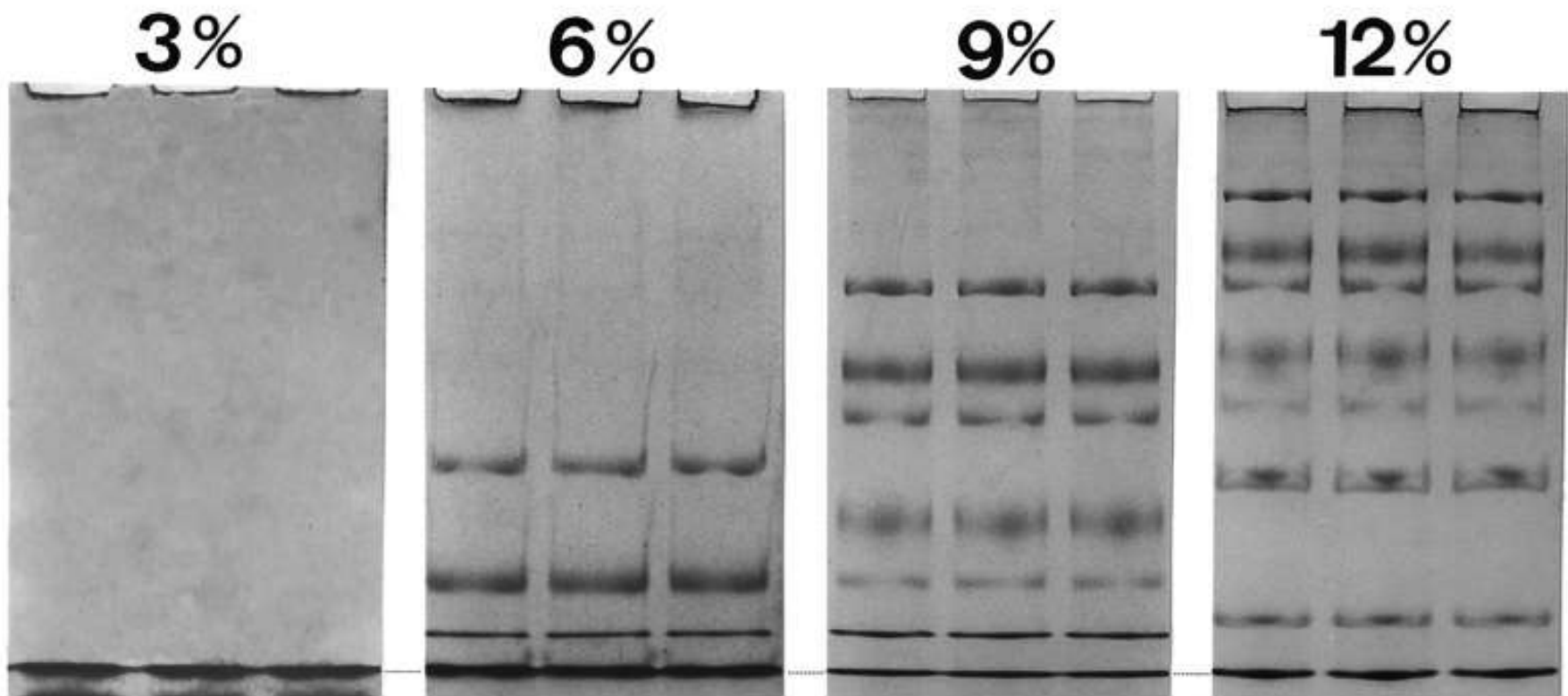


Критичні моменти приготування гелю

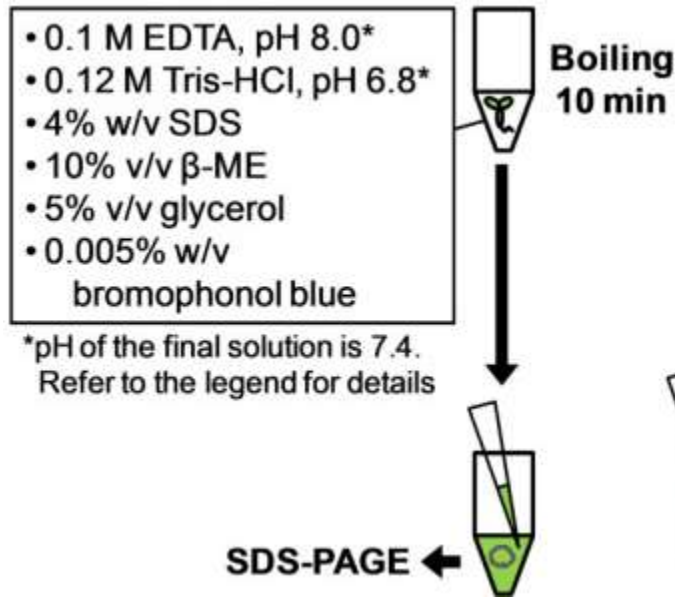
1. Якість реактивів

2. Якість очистки поверхонь камери
3. Велика варіація прописів (рецептур)
4. Температура
5. Анаеробні умови полімеризації
6. Концентрація реактивів у розчині
7. рН ТБС
8. Механічний вплив на розчин мономерів та гель
9. Негерметична полімеризаційна камера
10. Підвищений тиск на поверхню гель-касети

Залежність якості сепарації від концентрації ПА



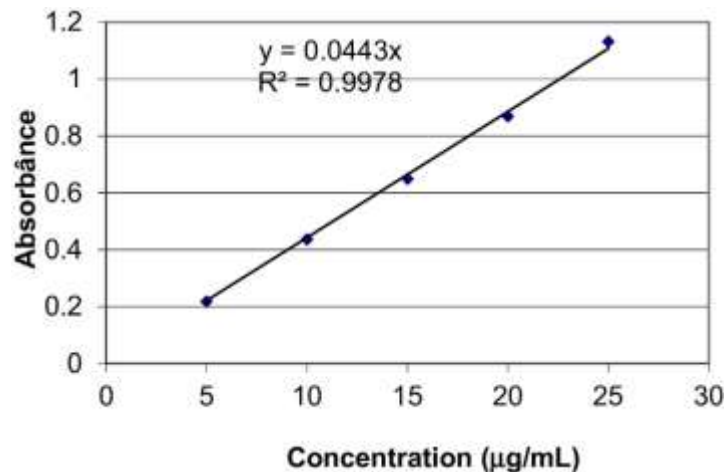
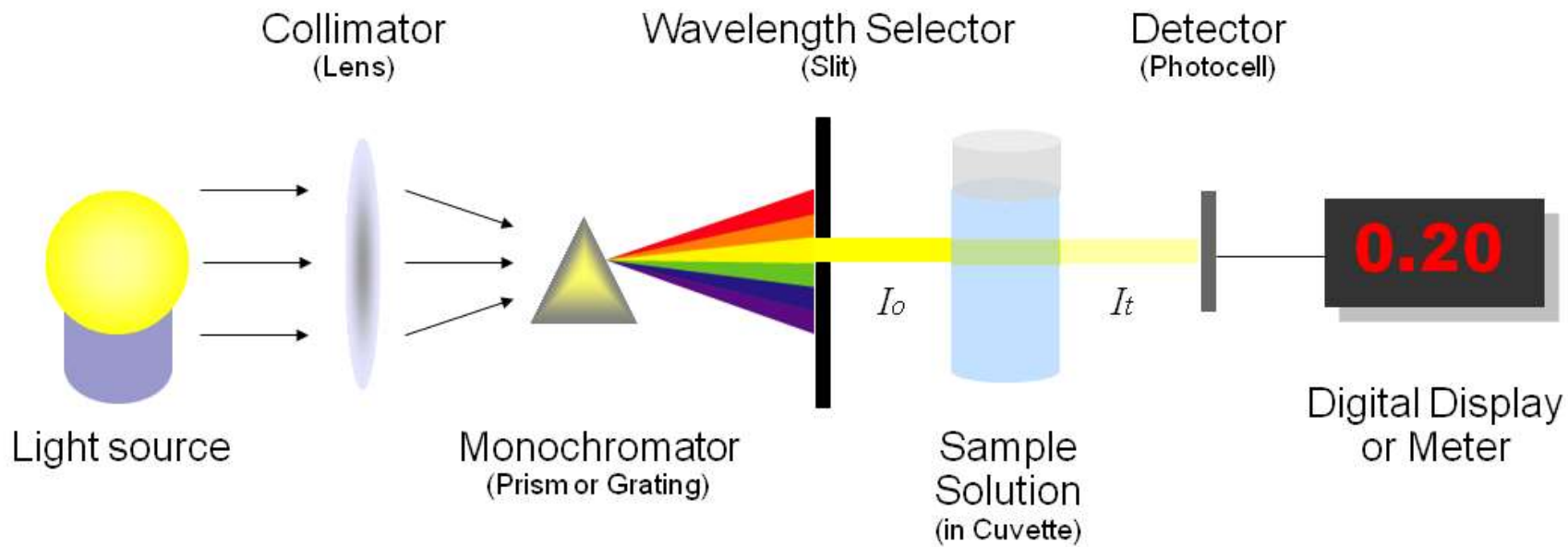
Пробопідготовка



1. Лізис тканини у лізис-буфері/РІПА-буфері з інгібіторами протеаз/фосфатаз за +4°C (ПМСФ, Ванадат т.д.) (TRIS, ЕДТА, Трітон x100).
2. Вимірювання концентрації (280 нм, інтерполяція логарифмічним алгоритмом)
3. Інкубація з буфером Лемлі (2x, 5x, 10x) та денатуруючими агентами (2-ME, ДТТ)
4. Термічна обробка +95°C – 5-10 хв
5. Кріопрезервація зразків за -30°C

Detergent lysis	The membranes are solubilized, lysing cells and liberating their contents
Ultrasonication	The sound waves generate a region of low pressure, causing disruption of the membranes of cells
Freeze/thaw lysis	Cells are disrupted by the repeated formation of ice crystals and the method is usually combined with enzymatic lysis
Enzymatic digestion	The enzymes dissolve cell walls, coats, capsules, capsids, or other structures

Принцип спектрофотометрії



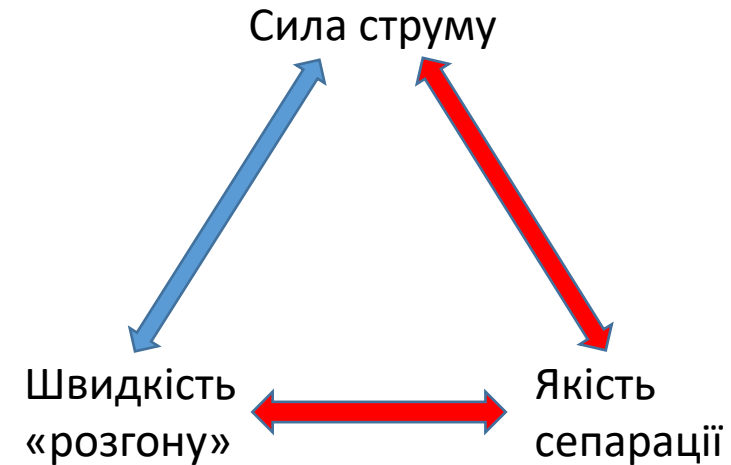
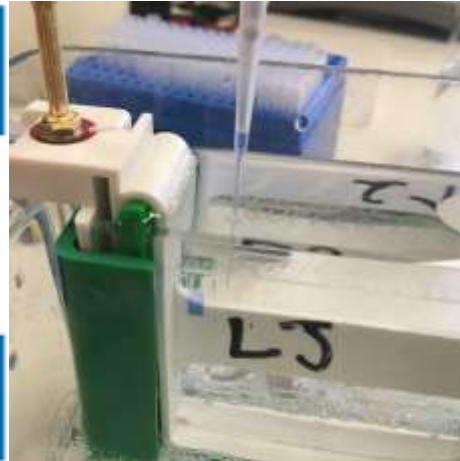
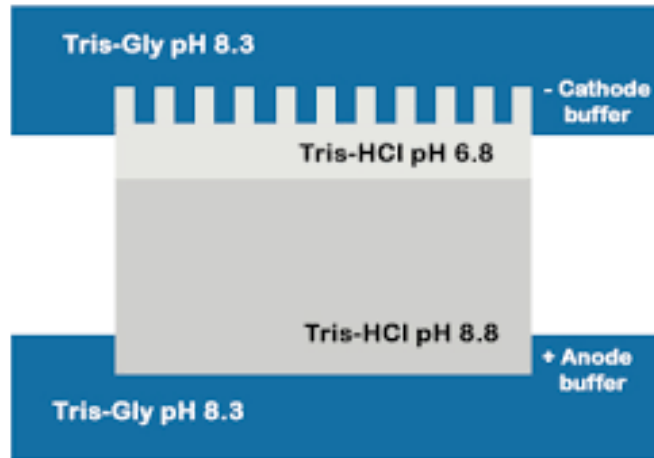
Критичні моменти пробопідготовки

1. Якість реактивів

2. рН розчину
3. Відсутність білку у зразку
4. Температурна та протеолітична деградація білку
5. Точність вимірювання концентрації
6. Точність вимірювальних приладів (рН, об'єм т.д.)
7. Деградація денатуруючого агенту (2-ME) – краще ДТТ

Результат: деградація білку/протеоліз, коагуляція, перенасиченість розчину, зміна рН – зміна забарвлення буферу Лемлі, «засмічення» проби

Завантаження гелю та форез



$$\text{Швидкість} = -\text{Log}(\text{мол. маса})$$

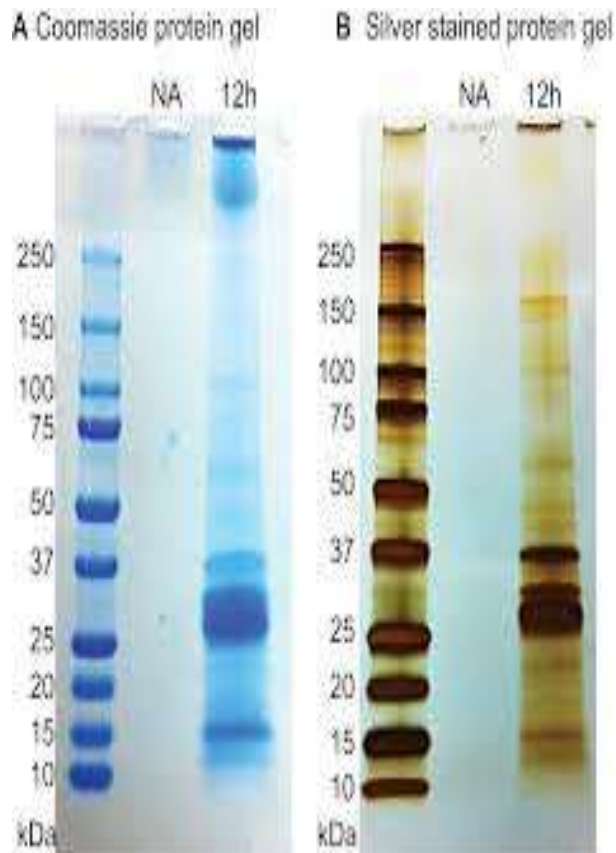


Критичні моменти фореzu

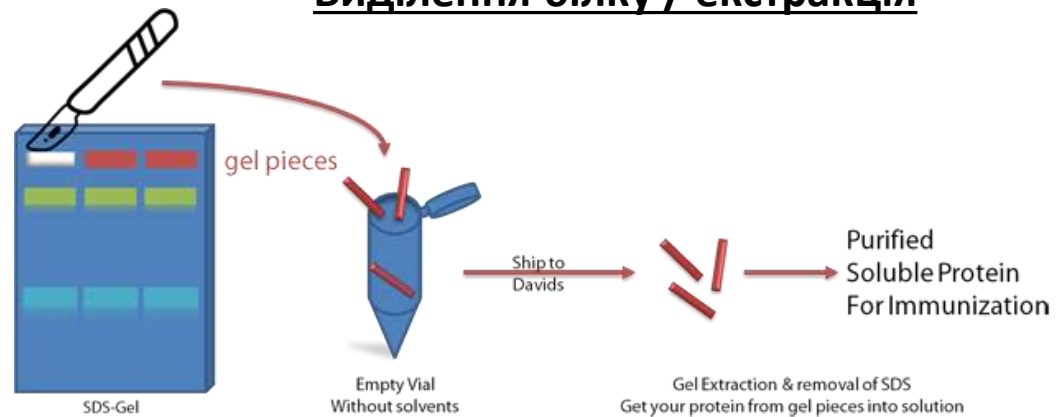
1. Точність «завантаження» гелю
2. Надійність джерела живлення/стабільність постійного струму
3. Якість фореzного (TRIS-гліцинового) буферу, його ізоелектрична сила
4. Сила струму/напруга
5. Протікання внутрішньої фореzної камери
6. Температура фореzного буферу/його теплова ємність

Подальша доля гелю

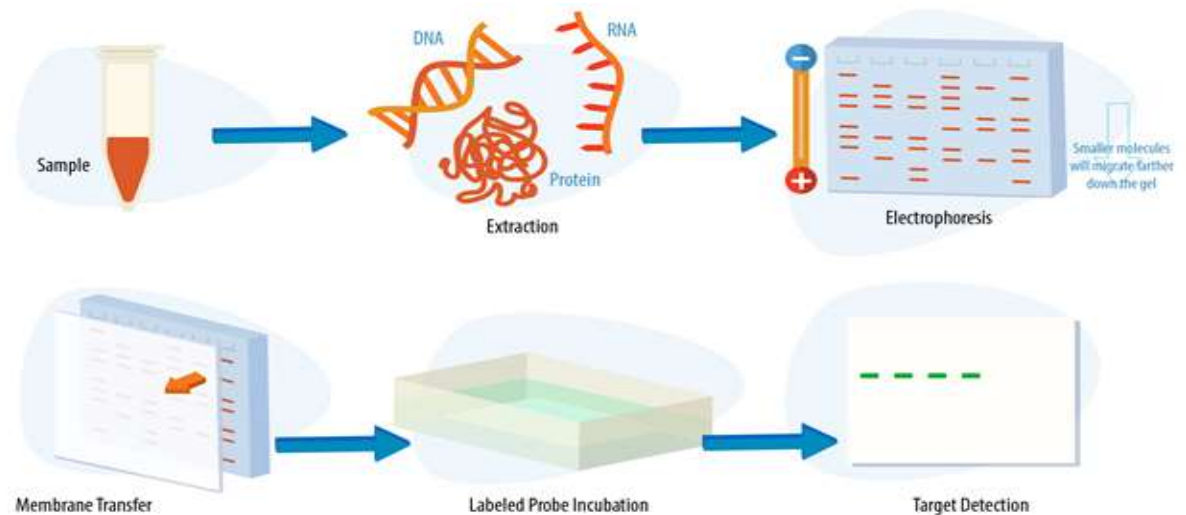
Забарвлення



Виділення білку / екстракція



Блоттинг



Результат

- Сепарація протеїнів/екстрактів/лізатів:
 - По розміру
 - та/або ізоелектричній точці/pH (2Д/3Д фореуз)
- Визначення:
 - Маса білку
 - Розрахунок кількості білку у пробі
 - Контроль якості пурифікації протеїнів
 - Порівняльний аналіз білкового складу розчинів
 - Виділення білку із гелю
 - Підготовка для Вестерн-блоту

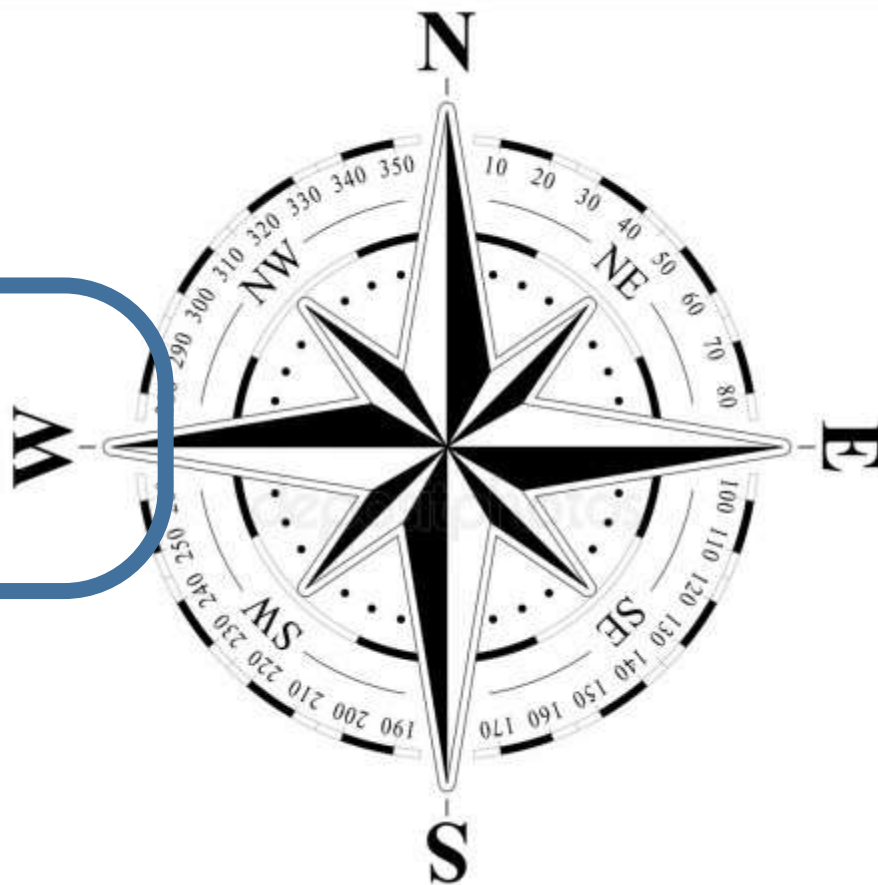


Вестерн-блот – імуногістохімія на мембрані: довгий шлях до пізнання



МРНК

БІЛКИ

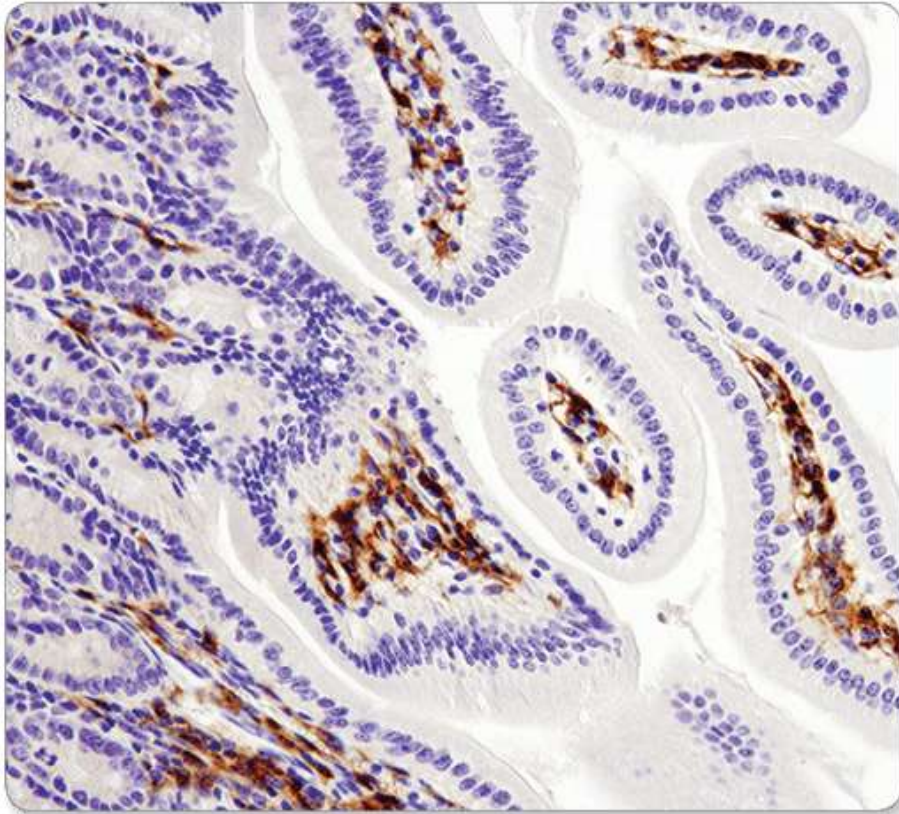


ТРНК

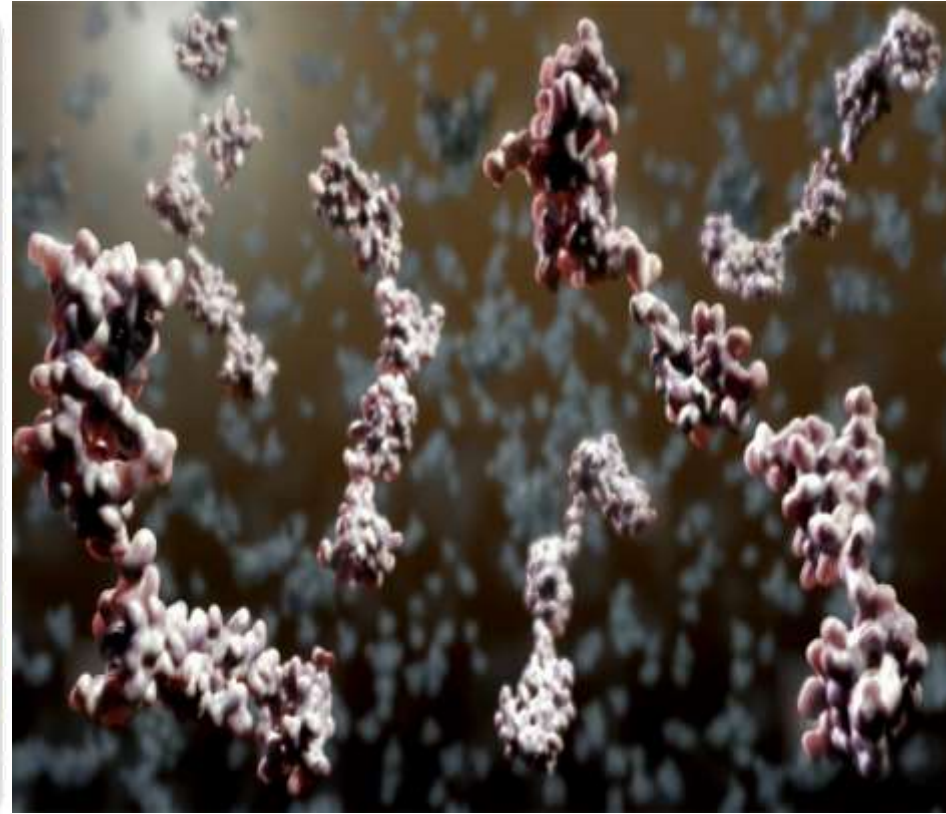
ДНК

Навіщо це нам?

ІГХ: фіксований субстрат

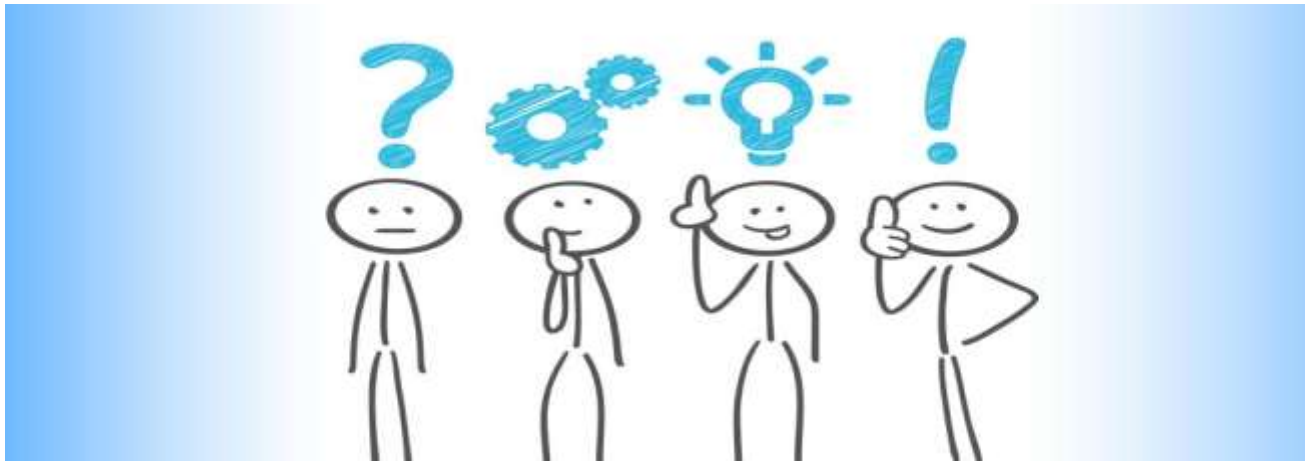


Розчин білку. What to do?



Бути чи не бути?

1. Чи є у розчині/субстраті цей білок?
2. Чи впливає обробка тканини/клітини певною речовиною на концентрацію конкретного білка?
3. Чи відрізняється концентрація білка у часі та різних рідинах?
4. Чи інфікований досліджуваний зразок біологічної рідини?



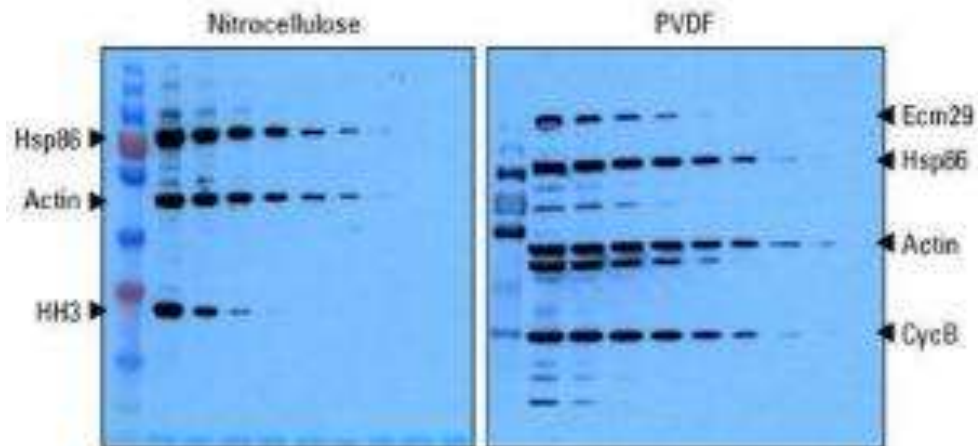
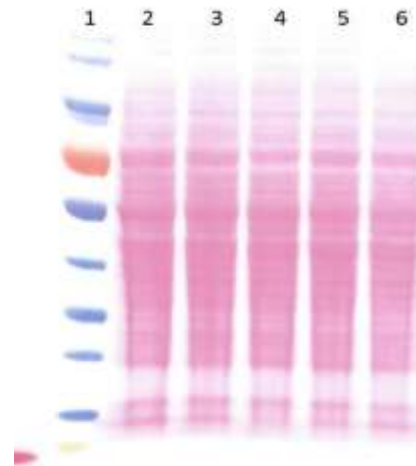
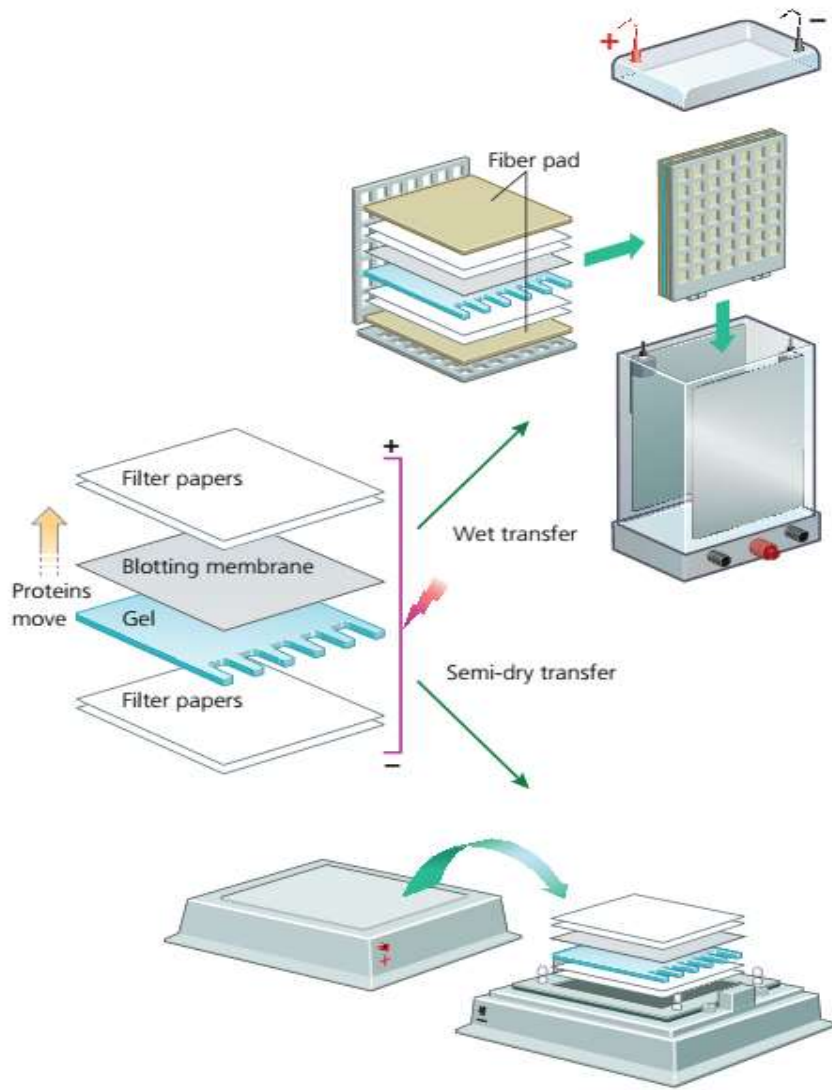
Основні етапи ВБ-дослідження

1. Трансфер білків на мембрану
2. Промивання у ТБС-Т буфері
3. Блокування неспецифічного зв'язування (2% БСА чи 5% сухе молоко у ТБС-Т)
4. Інкубування з I антитілами
5. Промивання у ТБС-Т буфері
6. Інкубування з II антитілами
7. Промивання у ТБС-Т буфері
8. Хемілюмінісцентна/колориметрична/радіаційна детекція
9. Змивання антитіл, повторення процедури з кроку №2

Переваги вестерн-блоту та застосування

- Надзвичайно висока специфічність та чутливість методу (до 5 нг/мл)
- Швидкий метод ідентифікації невідомого білку у розчині
- «Подвійна» ідентифікація білку (специфічно та за масою)
- Можливість дослідження рідин/ екстрактів/ тканин/ клітинних культур/ бактерій та ін.
- Зниження витрат первинних антитіл (значні розведення до 1:25000, можливість повторного використання) та вторинних антитіл
- Можливість повторного використання мембрани для визначення декількох білків
- Можливість визначення гетеро-димерних композитів білків та їх асиміляцій

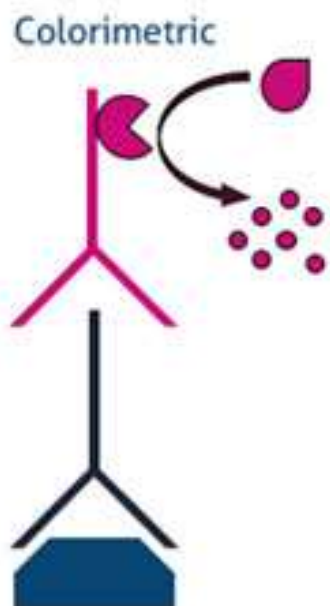
«Муки вибору» у вестерн-блоті



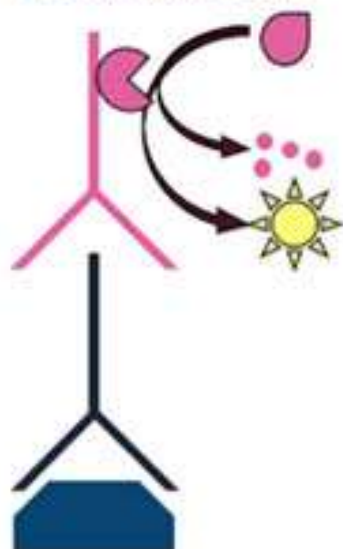
Radioactive detection



Enzymatic detection



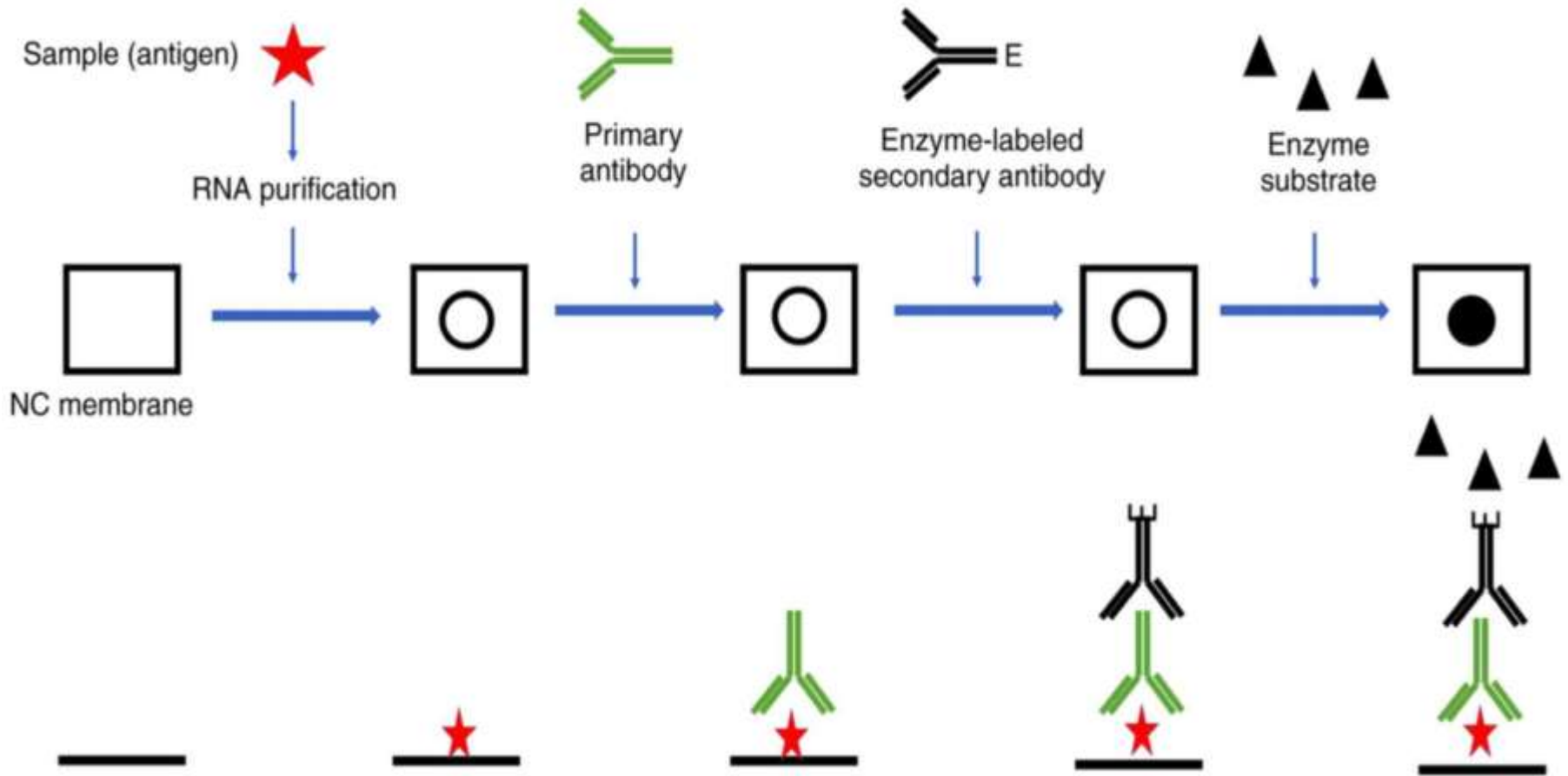
Chemiluminescent



Fluorescent detection



Вестерн-блот-анализ: дот-блот



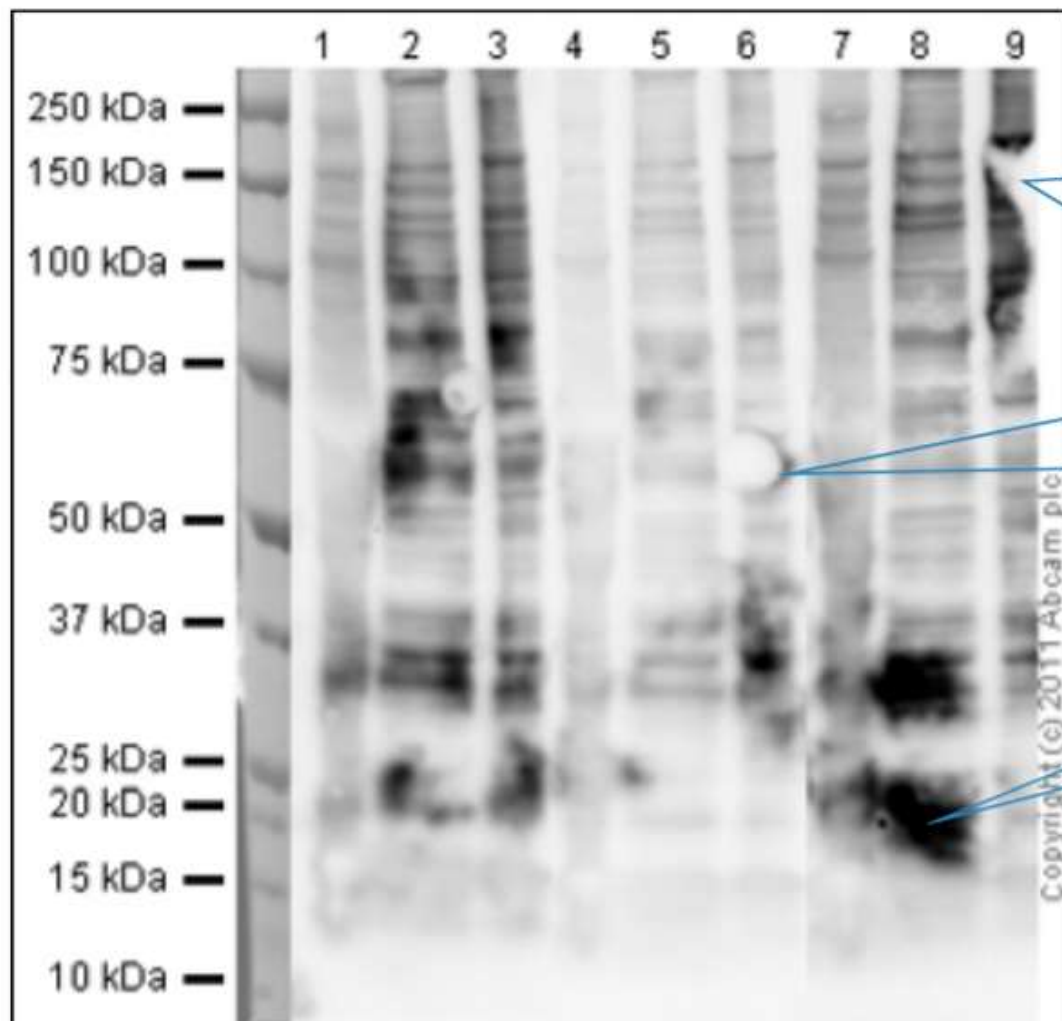
Тотальный контроль

Loading control	Sample type	Molecular weight (kDa)	Caution
Beta Actin	Whole Cell / cytoplasmic	43	Not suitable for skeletal muscle samples. Changes in cell-growth conditions and interactions with extracellular matrix components may alter actin protein synthesis (Farmer et al, 1983)
GAPDH	Whole Cell / cytoplasmic	30-40	Some physiological factors, such as hypoxia and diabetes, increase GAPDH expression in certain cell types
Tubulin	Whole Cell / cytoplasmic	55	Tubulin expression may vary according to resistance to antimicrobial and antimitotic drugs (Sangrajrang S. et al, 1998, Prasad V et al, 2000)
VDCA1/Porin	Mitochondrial	31	
COXIV	Mitochondrial	16	Many proteins run at the same 16 kDa size as COXIV
Lamin B1	Nuclear	66	Not suitable for samples where the nuclear envelope is removed
TATA binding protein TBP	Nuclear	38	Not suitable for samples where DNA is removed

Типові проблеми:

1. Велика кількість маніпуляцій – велика вірогідність помилок
2. Необхідність у значній «бібліотеці» первинних антитіл та їх клонів
3. Значні варіації у прописах процедури та методиці
4. Потреба у значній кількості ЯКІСНИХ реактивів та антитіл, підвищені вимоги до чистоти посуду та робочого простору
5. Висока токсичність та канцерогенність/нейротоксичність задіяних реактивів – **потреба у засобах захисту**
6. Необхідний значний об'єм зразків (5-50 ug)
7. Труднощі у розрахунках/інтерпретації результатів – лише напівкількісним методом
8. Великі затрати часу (від 1 до 3 робочих днів)
9. 20% падіння інтенсивності сигналу після «змивання» антитіл
10. Надзвичайний вплив часу обробки мембрани на результат – переекспонування, перевідмивання, «вигорання» білку
11. Висока ймовірність «хибно-негативного» результату (відсутність білку в мембрані – проблеми з переносом)

Трабл-шутінг

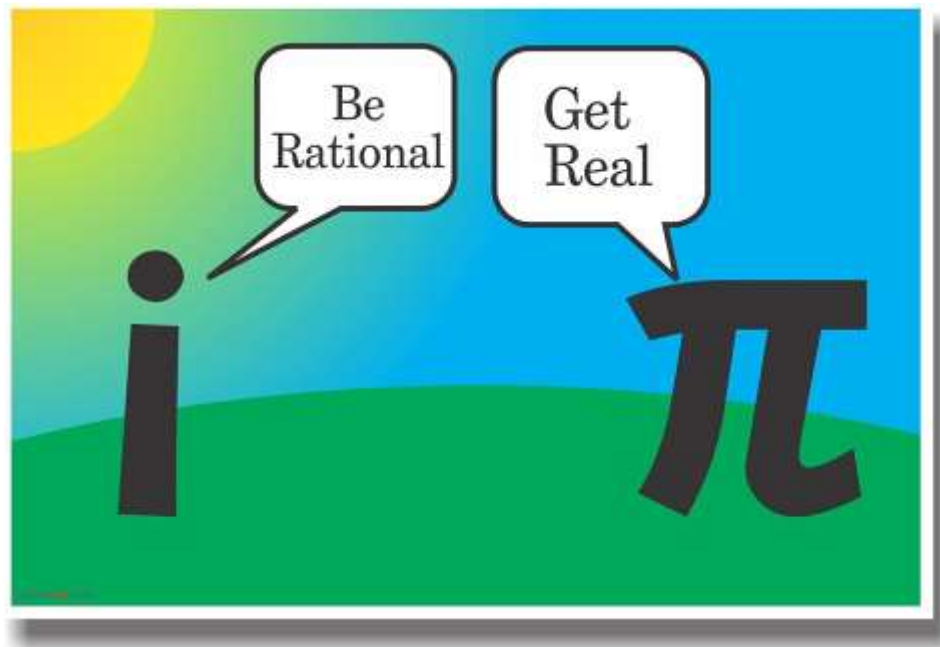


Incomplete contact
between gel and
membrane during
transfer

Air bubbles between
gel and membrane
during transfer

Poor washing

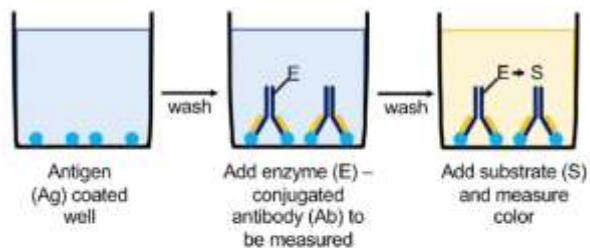
Цифри вирішують все: ELISA



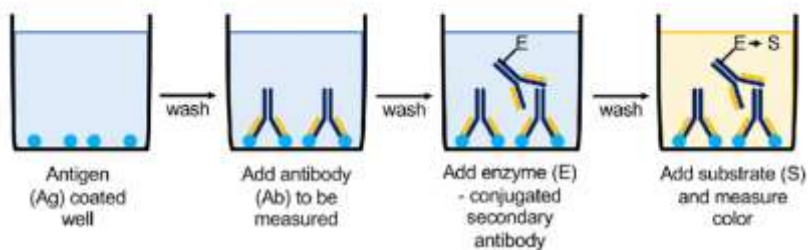
Визначення

- Enzyme
- Linked
- Immuno
- Sorbent
- Assay
- Імуно
- Ферментний
- Аналіз

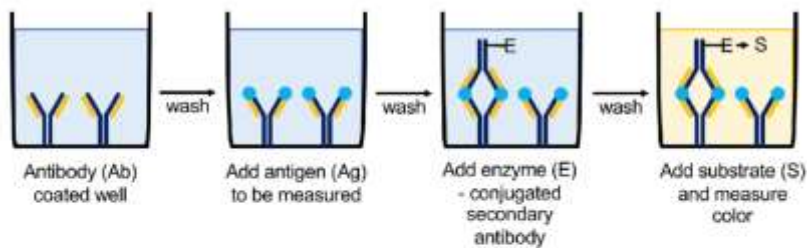
(a) Direct ELISA



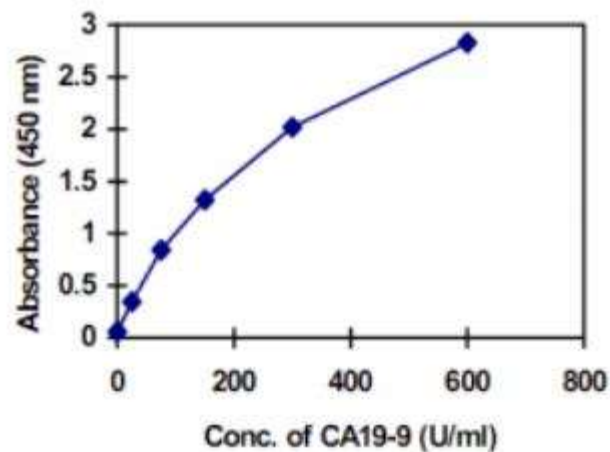
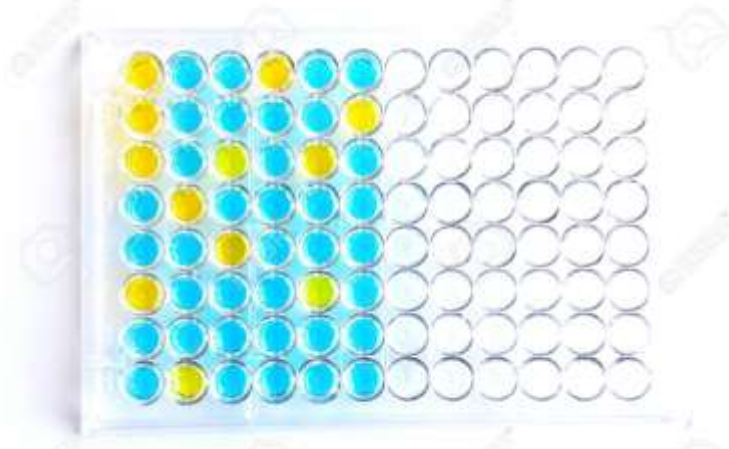
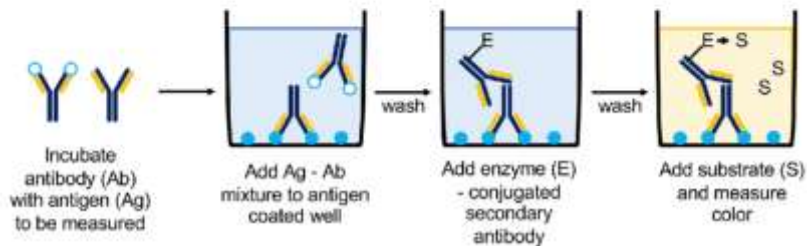
(b) Indirect ELISA



(c) Sandwich ELISA



(d) Competitive ELISA





KNOW FOR SURE



BEFORE YOU POUR

