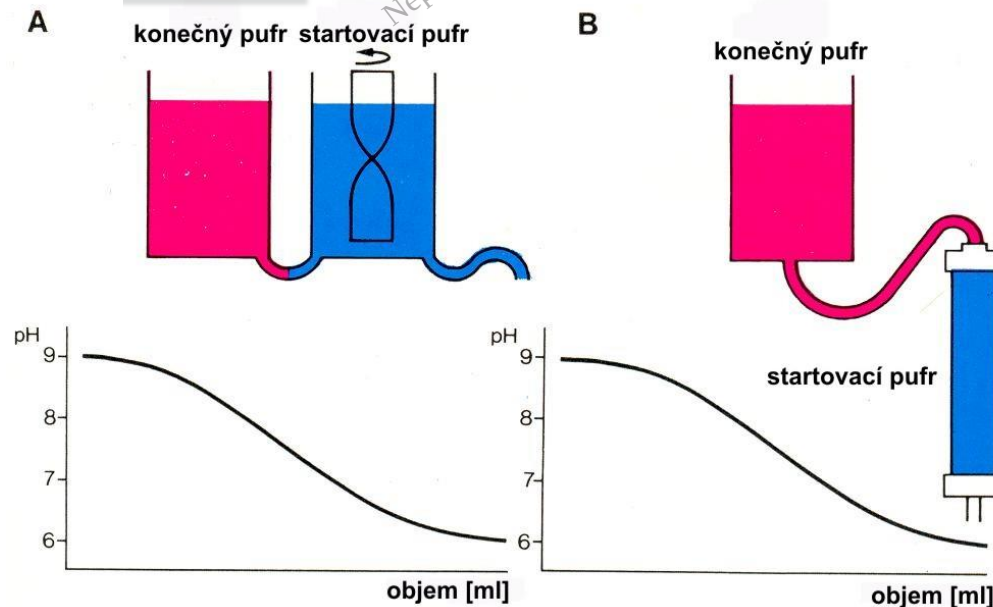


Chromatofokusace

- separace proteinů na základě jejich pI
- vysoké rozlišení
- není potřeba připravovat pH gradient
- zaostřovací efekt
- jednoduchost

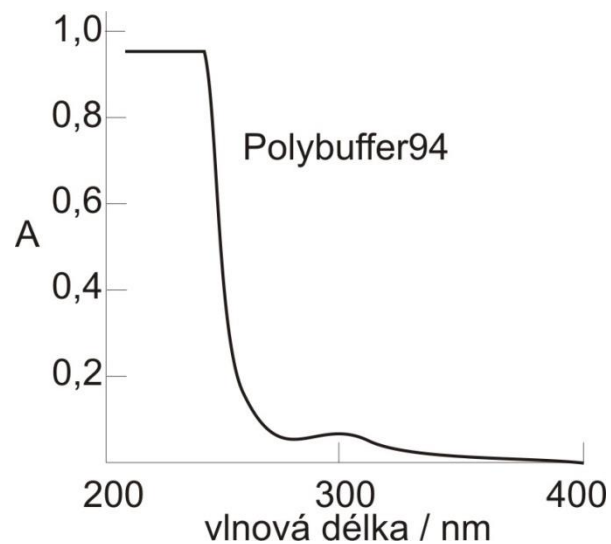
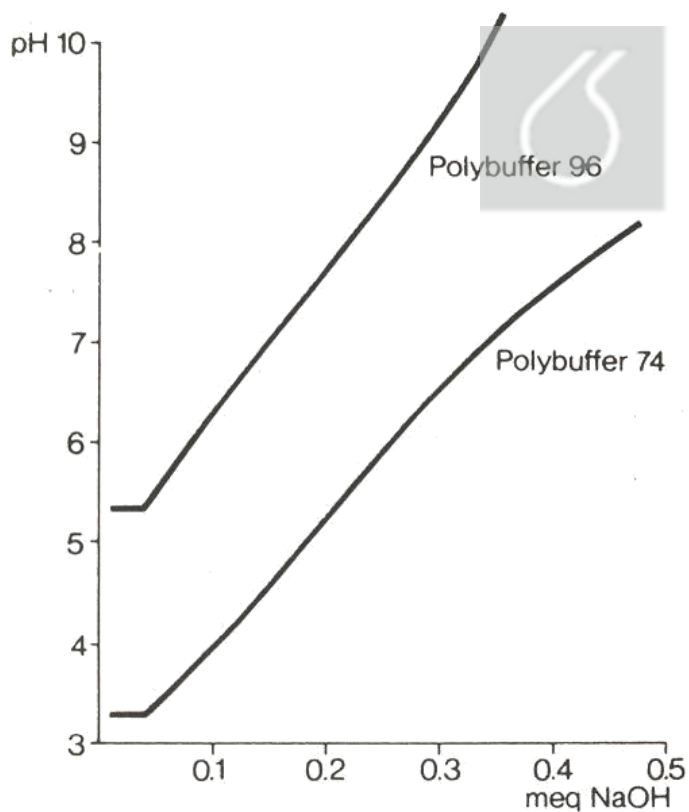


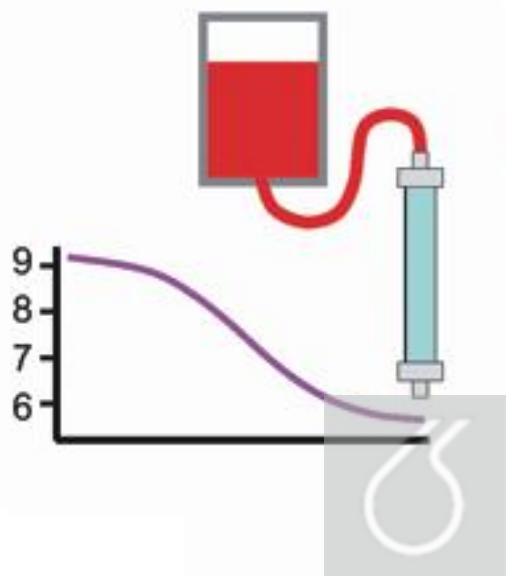
Polypufry - amfolyty

Stacionární fáze

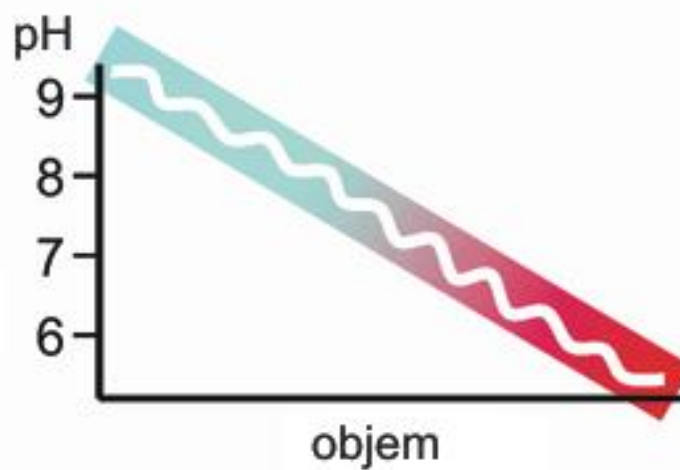
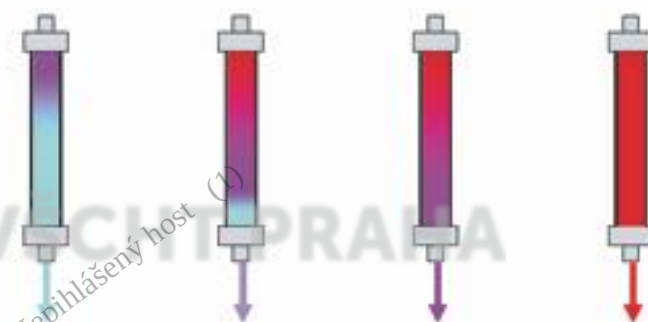
Polybuffer 96 - pH 9-6
Polybuffer 74 - pH 7-4 → PBE94

Pharmalyte - pH 8-10,5 → PBE118

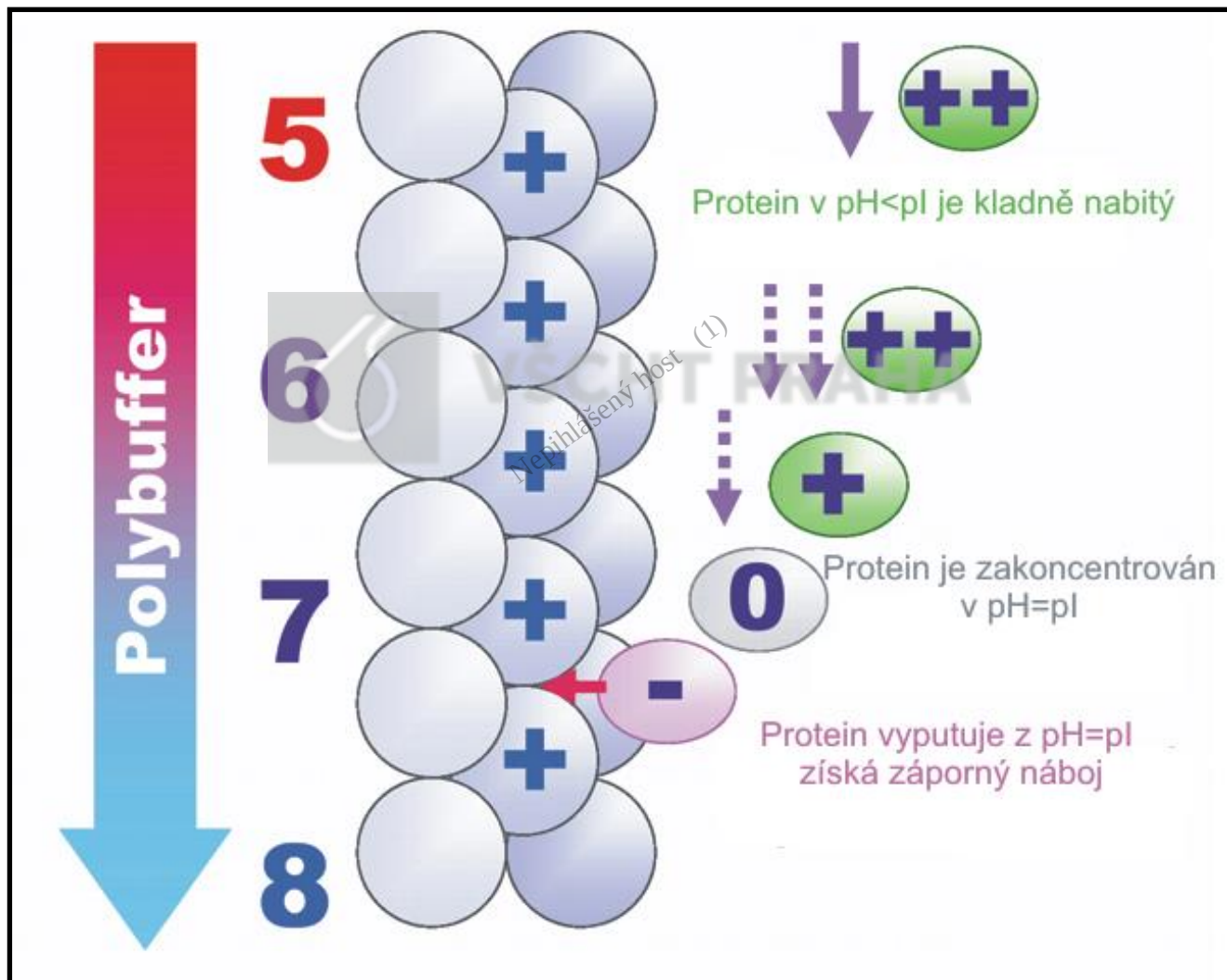




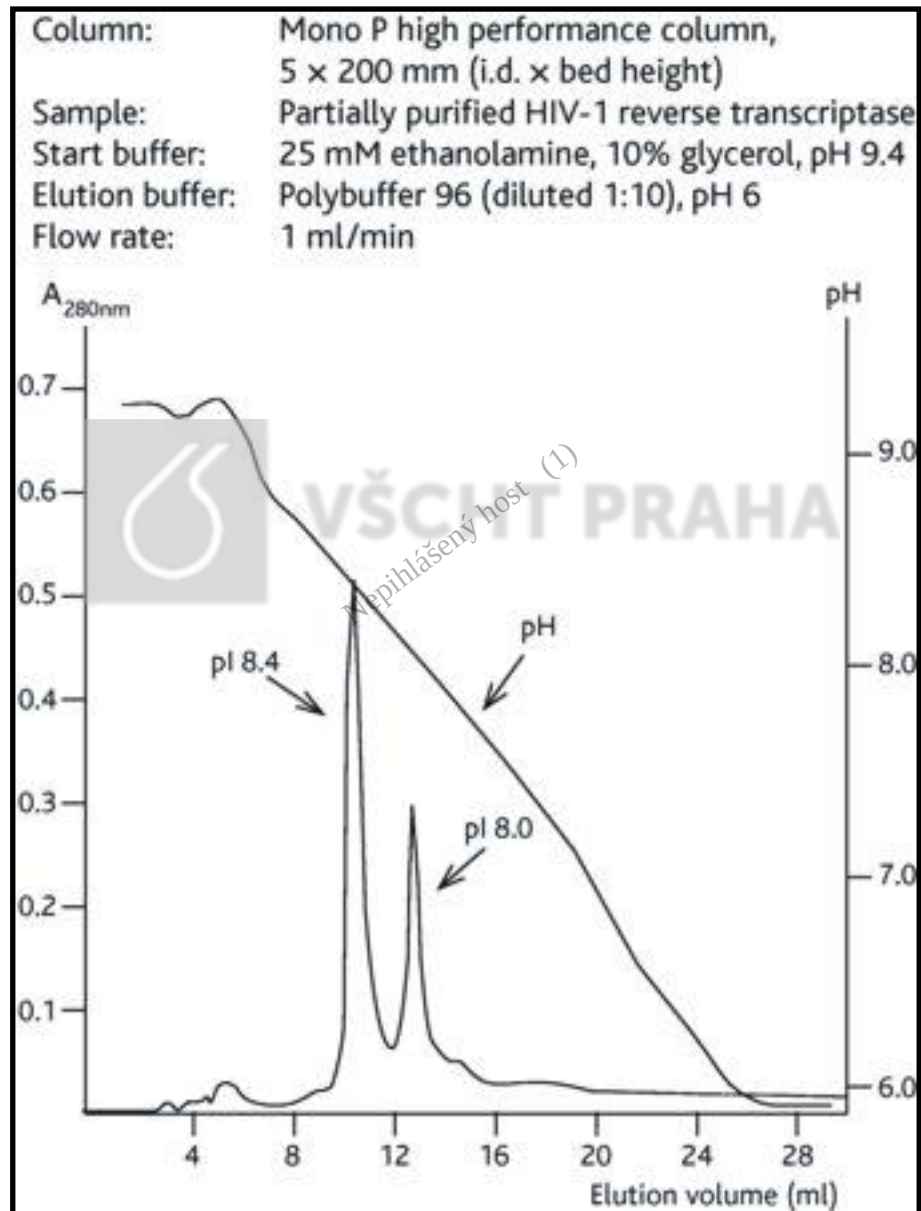
- Polybuffer (pulypufr) obsahuje ampholyty - směs látek majících různé pKa



Princip fokusace



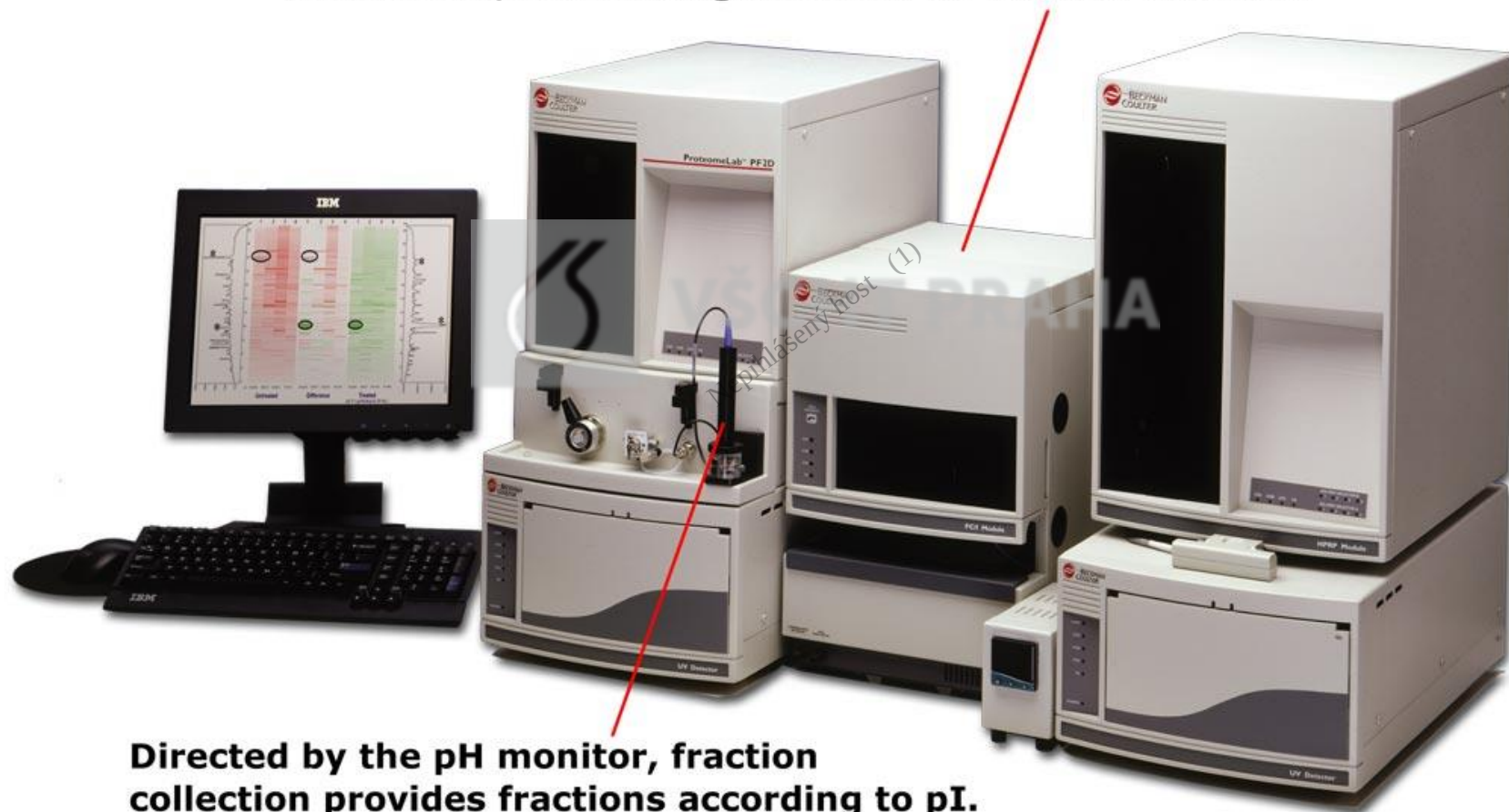
MonoP Beads – směs kvartérních a terciálních aminů



Dvoudimensionální chromatografie

Beckman Coulter – PF 2D

Fractions from the first dimension are automatically injected into the second, eliminating the need for manual transfer.

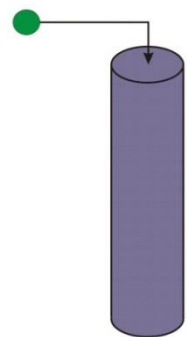


Directed by the pH monitor, fraction collection provides fractions according to pI.

Dvoudimenzionální chromatografie

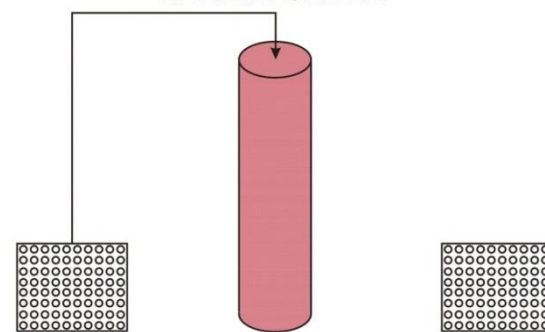


1. ROZMĚR
CHROMATOFOKUSACE

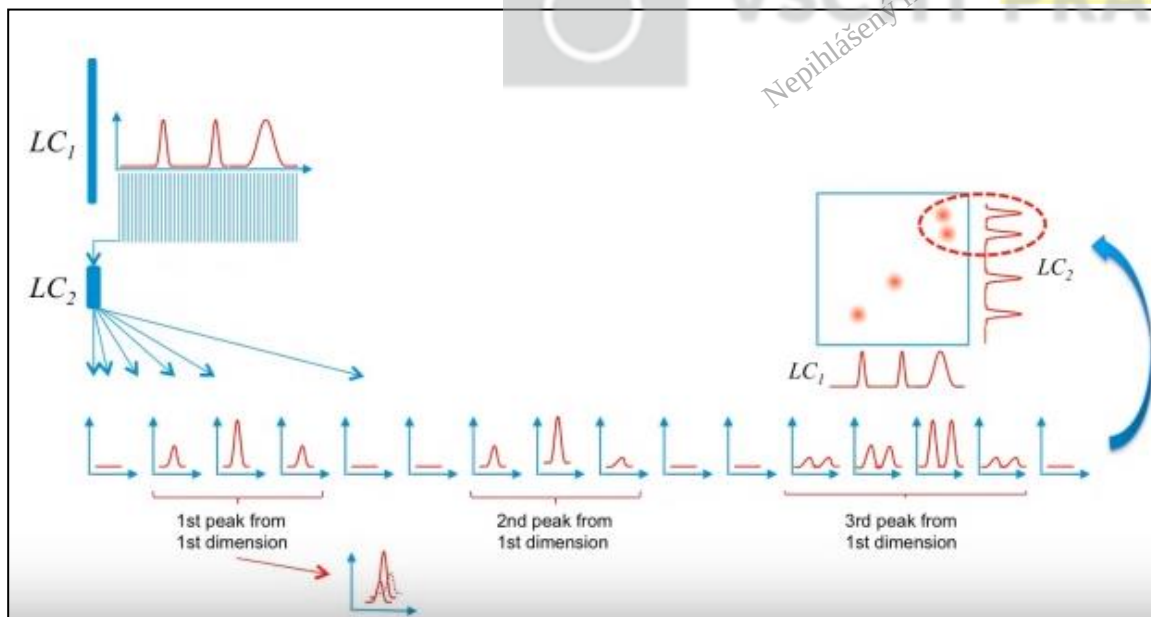


detekce
pH + UV

2. ROZMĚR
CHROMATOCHRAFIE
NA REVERSNÍ FÁZI

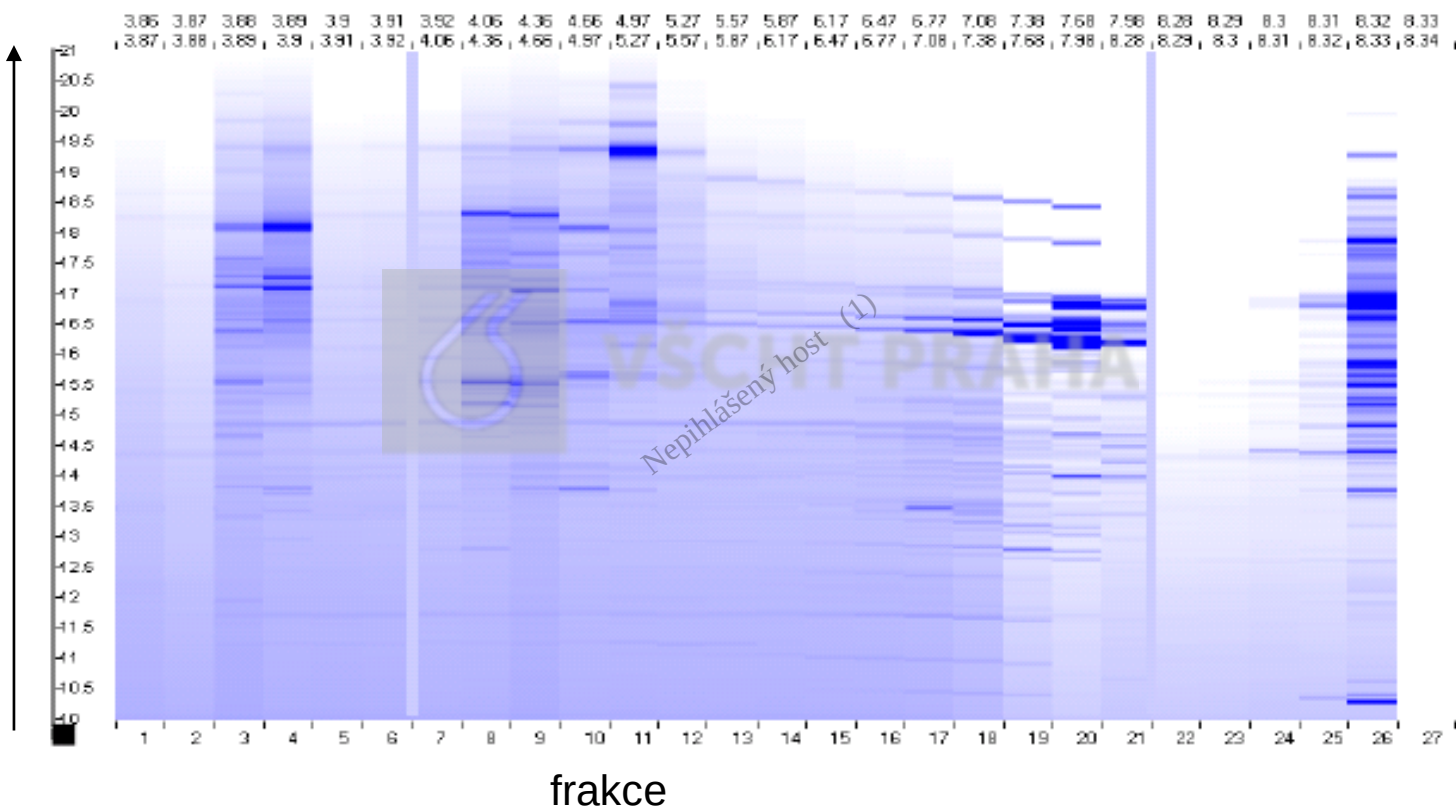


detekce
pH + UV

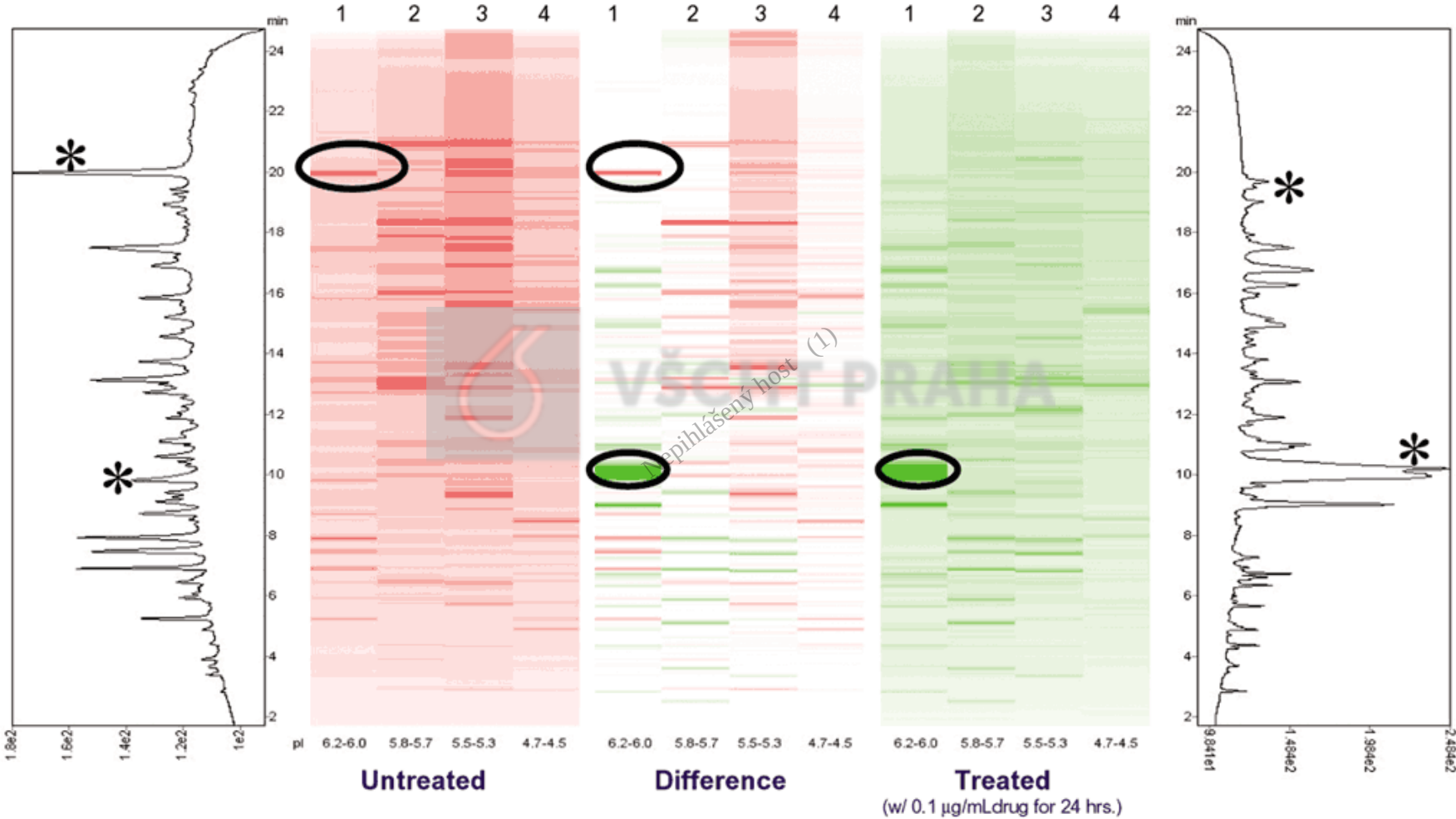


pH

hydrofobicita



Partial pI/UV map of colon cancer cell line before and after treatment



Hydrofobní chromatografie



VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host (1)

Hydrofobicita proteinu insulin

malwmrllpl lallalwgpdpaaafvnqhl cgshlvealy lvcgergffy tpktrreaed
lqvgqvelgg gpgagslqpl alegslqkrg iveqcctsic slyqlenycn

MALWMRLLPLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSI CSLYQLENYCN

- Green: hydrophobic uncharged residues, like F I L M V W A and P
- Red: acidic residues, like D E and C-terminal -COOH
- Blue: basic residues, like R K H and N-terminal -NH₂
- Black: other residues, like G S T C N Q and P
- ?: Unrecognized codes are replaced of '?'.

Acidic

Choosing suitable solvent:

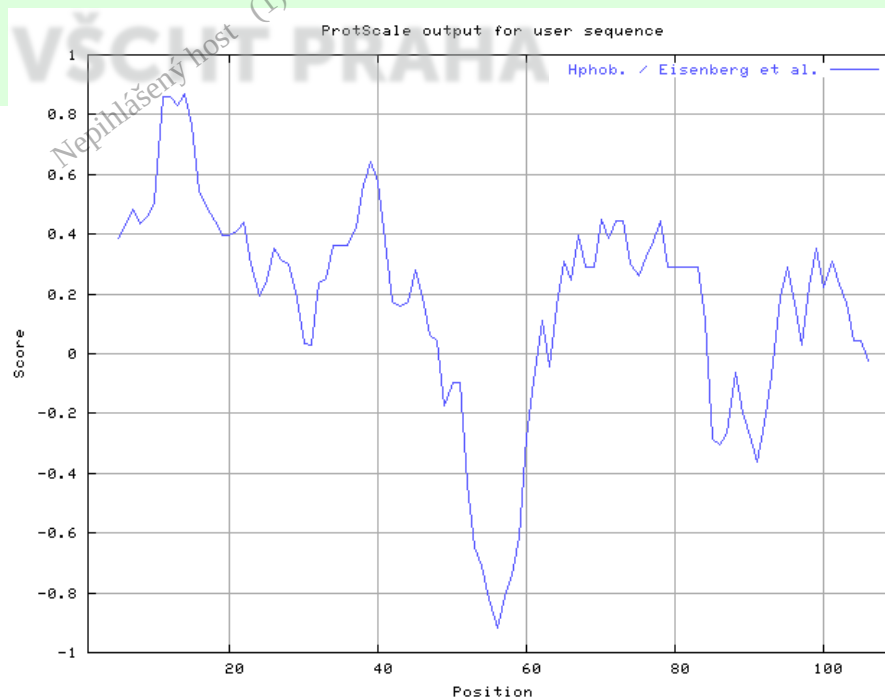
For acidic peptide, initially try to dissolve the peptide in water; if the peptide does not dissolve, add NH₄OH(<50ul) and dilute to 1ml with deionized water.

Hydrophobic: 46.36%

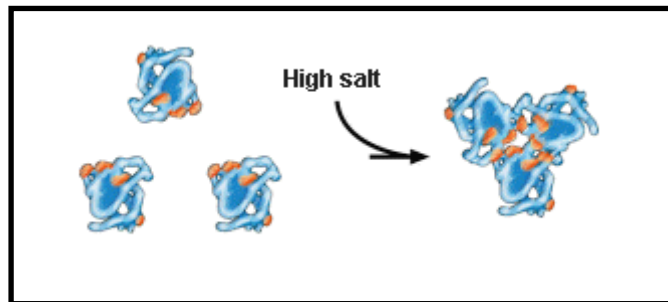
Acidic: 9.09%

Basic: 8.18%

Neutral: 36.36%

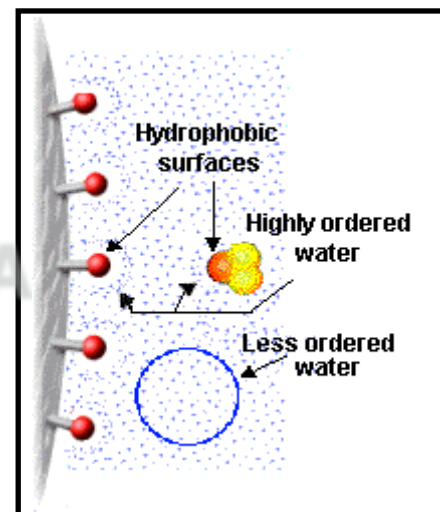


vliv soli na protein



Stacionární fáze

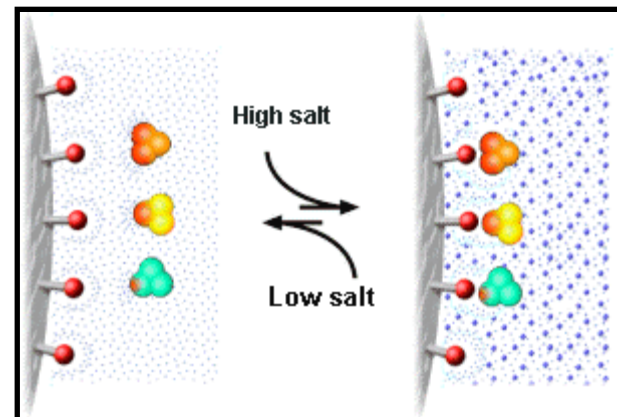
vazba hydrofobních oblastí na povrchu proteinu
v H_2O slabé interakce $\Rightarrow$ přidavek soli
méně hydrofobní než RPC



Mobilní fáze

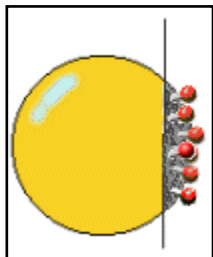
H_2O /sůl (~ 1 M) nejčastěji $(NH_4)_2SO_4$

← Increasing precipitation ("salting-out") effect
Anions: PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , $CH_3 \cdot COO^-$, Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^-
Cations: NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}
Increasing chaotropic ("salting-in") effect →

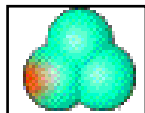


Eluce

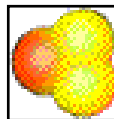
klesajícím gradientem soli (1 M – 0 M)



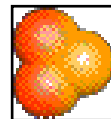
stacionární
fáze



nejméně
hydrofobní
látka



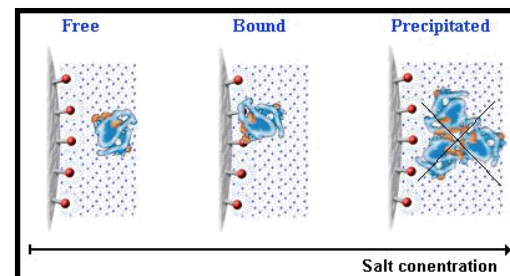
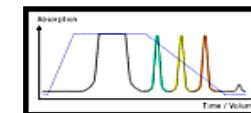
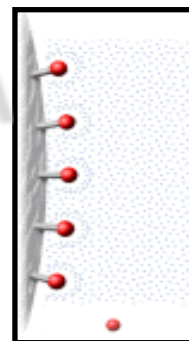
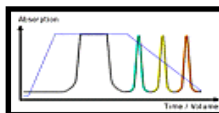
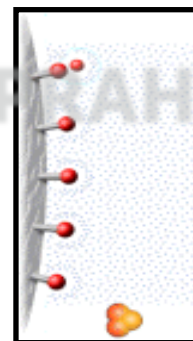
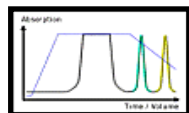
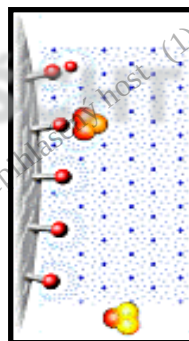
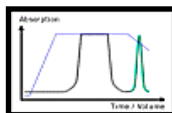
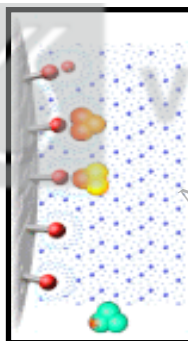
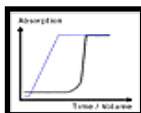
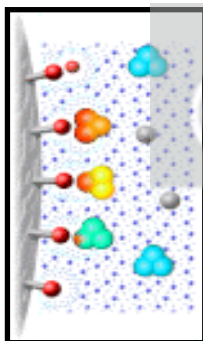
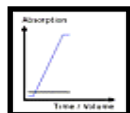
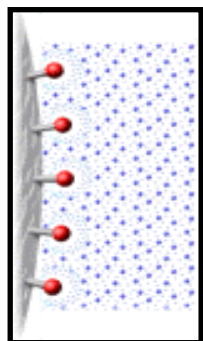
středně
hydrofobní
látka



velmi
hydrofobní
látka

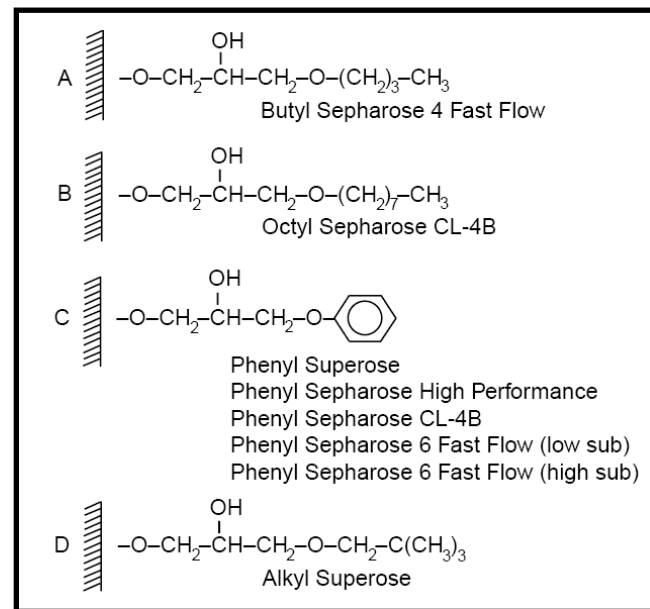


velmi
hydrofobní
kontaminace

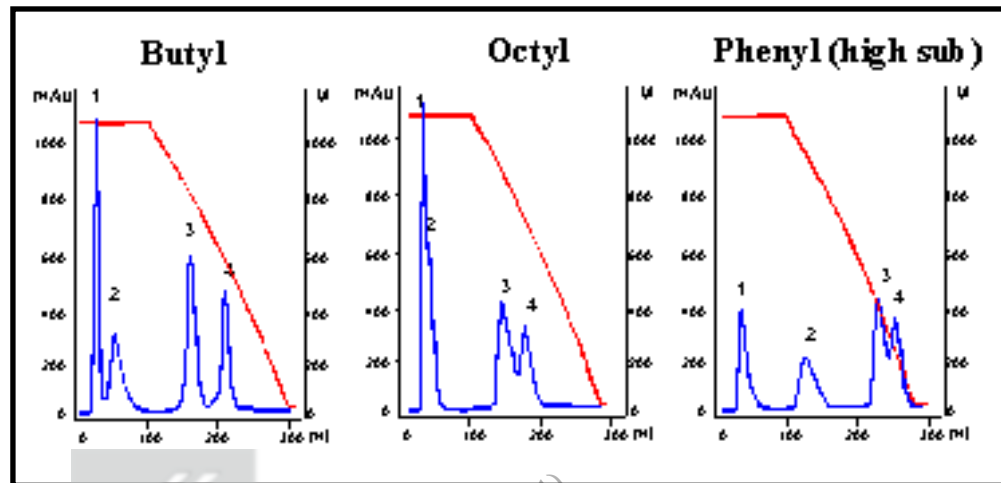


Přehled typů stacionární fáze

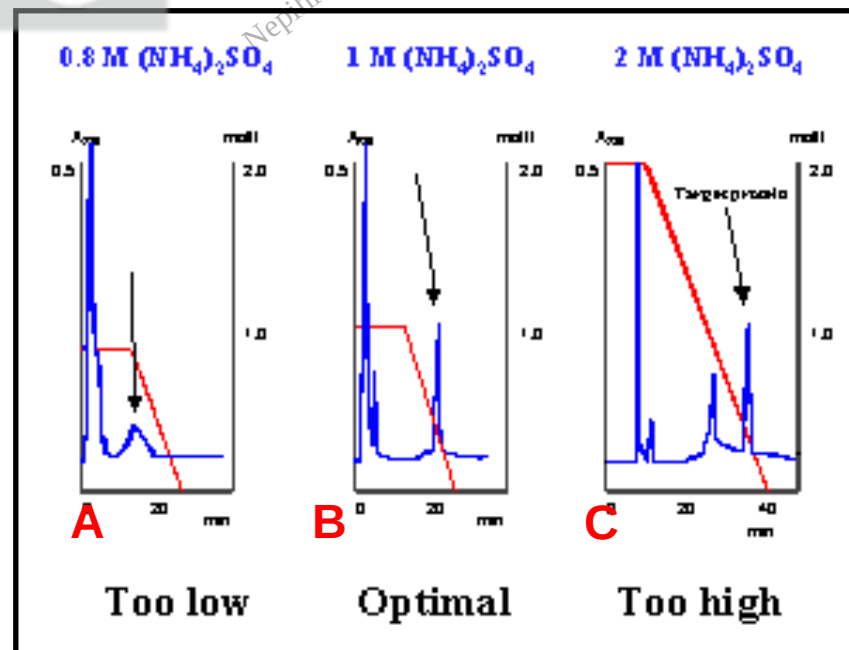
- Phenyl, Butyl nebo Octyl Sepharose Fast Flow (FF), FPLC kolony Phenyl Superose fy **GE Healthcare** na polysacharidové (agarosové) bázi
- Macro-Prep t-Butyl HIC Support fy **Bio-Rad** na methakrylátové bázi
- Spheron 100 (300, 1000) fy **Lachema** založené na bázi kopolymeru hydroxyethylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu
- Separon HEMA-S 1000, Separon HEMA-Bio 1000 Phenyl fy **TESSEK** jsou vyráběny na bázi hydroxyethylmethakrylátu



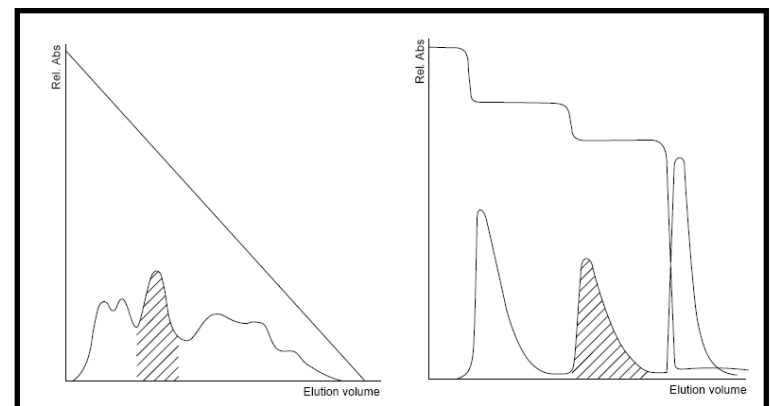
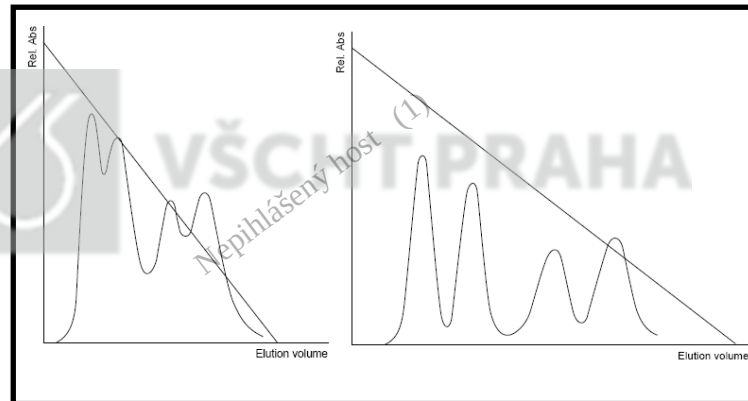
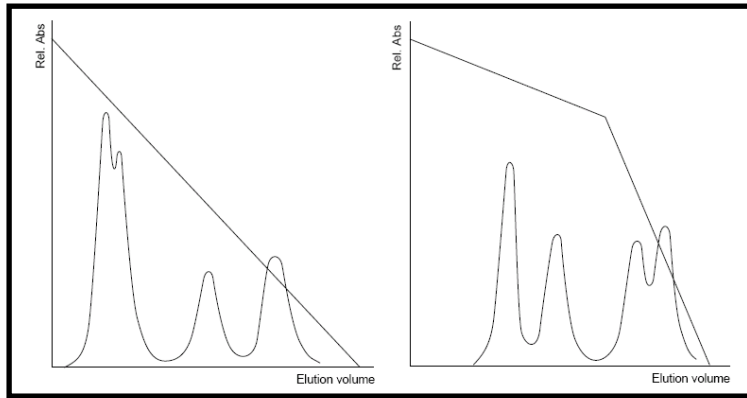
efekt ligandu na purifikaci



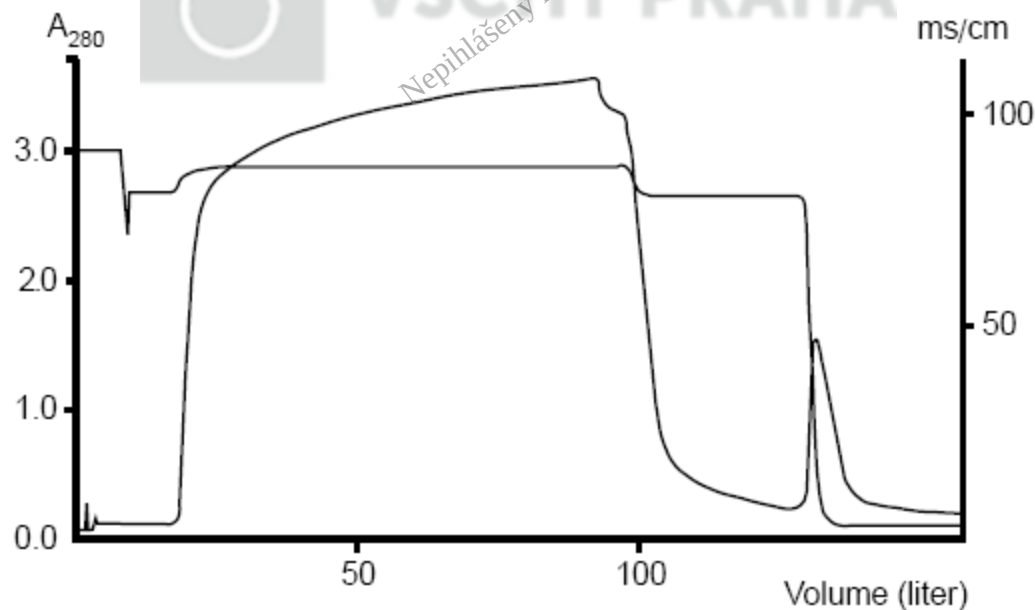
efekt mobilní fáze



typy gradientů



Column: BPG 300/500
Gel: Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub), 10 cm bed height
Sample: Yeast supernatant. Ammonium sulphate added to 0.5 M
Sample volume: 80 l
Sample load: 0.36 mg h-EGF/ml media
Flow rate: 300 cm/h; 212 l/h (loading)
60 cm/h; 42 l/h (elution)
Buffer A: 20 mM sodium phosphate pH 7.0 + 0.5 M ammonium sulphate
Buffer B: 20 mM sodium phosphate pH 7.0
Purification time: 1.5 h



vysoké rozlišení (gradientová eluce)	
stacionární fáze	velikost částic 10-30 μm
kolona	délka 1 - 10 cm (krátká kolona nevhodná pro pozvolný gradient)
mobilní fáze	20 – 50 mM pufrů v rozmezí pH 4-8 (pH má malý vliv na selektivitu) gradient soli (nejčastěji $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
objem vzorku	na objemu nezáleží
množství vzorku	5-10 % celkové vazebné kapacity (bez ztráty rozlišení)

použití hydrofobní chromatografie	
vysoké rozlišení (gradientová eluce)	skupinová separace (kroková eluce)
separace proteinů na základě jejich hydrofobicity	koncentrace naředěného vzorku
vhodná jako první nebo střední purifikační krok	vhodná jako purifikační krok po precipitaci síranem amonným

Target percentage saturation	Target percentage saturation															
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	613
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	580
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547
20		27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512
25			27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478
30				28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	443
35					28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410

[illegible]

Chromatografie na reversní fázi

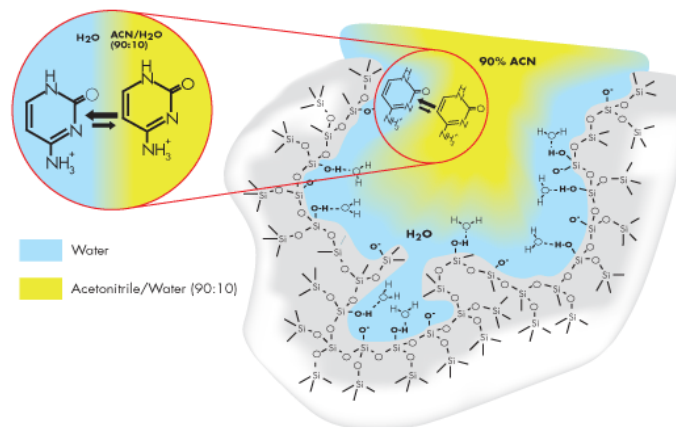
stacionární fáze - hydrofobní (nepolární)

mobilní fáze - polárnější než stacionární fáze

Chromatografie na „normální“ fázi - HILIC

stacionární fáze - hydrofilní (polární)

mobilní fáze - méně polární než stacionární fáze



Chromatografie na reversní fázi

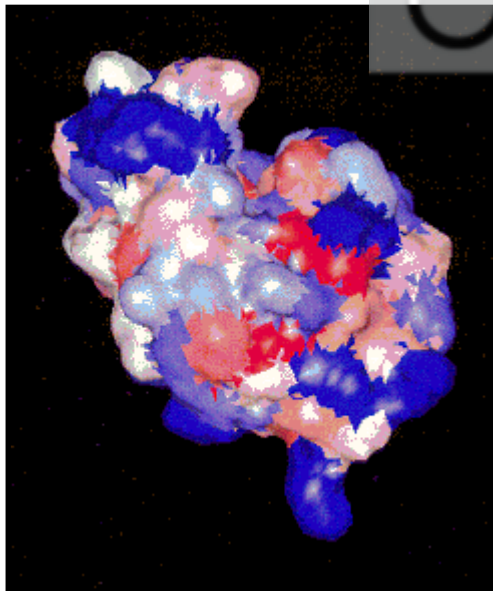
•separace látek na základě jejich hydrofobicity

hydrofobní chromatografie x chromatografie na reversní fázi

- hydrofobní interakce musí být podpořena solí
- eluce snižující se koncentrací soli

- stacionární fáze je vysoce substituovaná CH řetězci ➡ vysoká hydrofobicita
- proteiny, peptidy a oligonukleotidy se adsorbují i v čisté H_2O
- desorbce organická rozpouštědla (např. acetonitril v H_2O)

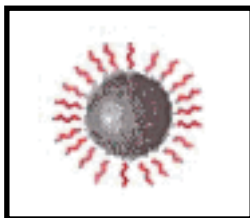
lysozym



- vysoká hydrofobicita
- nižší hydrofobicita
- vysoce hydrofilní
- méně hydrofilní

Stacionární fáze

nosiče



Silikagel

- poresní silika gel – zvýšení efektivního povrchu
- inertní materiál
- stabilní v pH 2-7,5



Polymerní nosič

- poresní polymer – zvýšení efektivního povrchu
- nepolární
- stabilní v pH 2-11

Stacionární fáze - funkční skupiny

Stationary phase

C₁₈

C₈

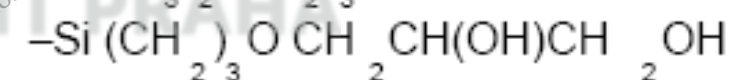
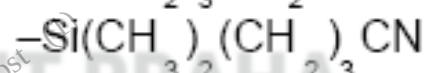
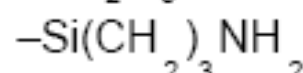
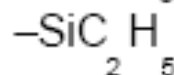
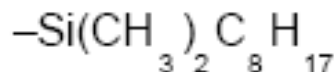
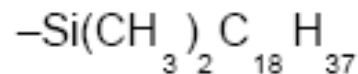
tC₂

Aminopropyl

Cyanopropyl

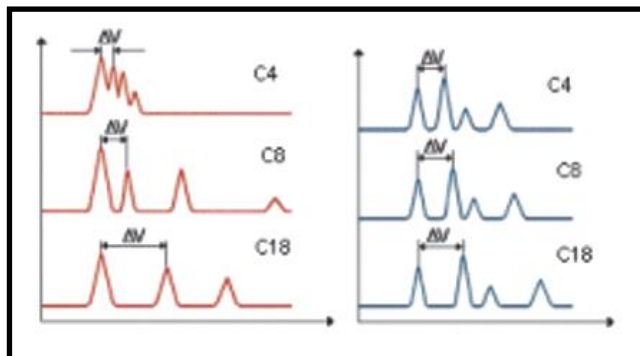
Diol

Functionality



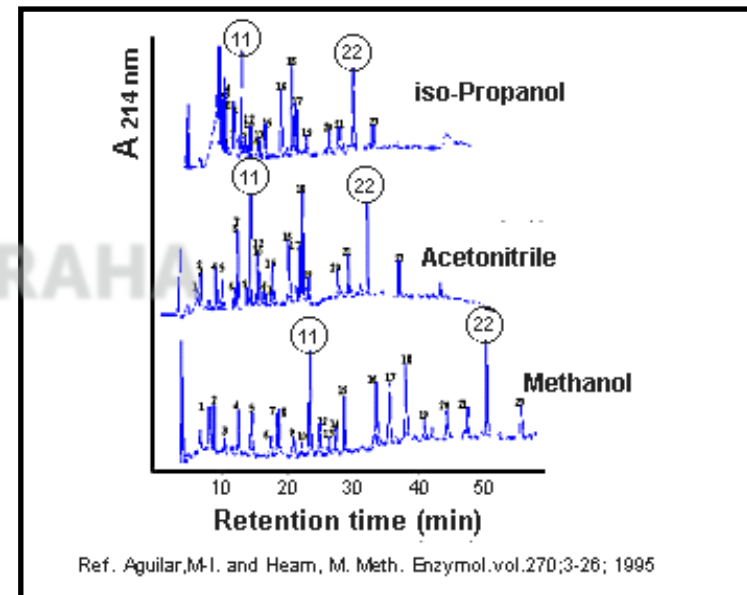
Retention time

Chain length CN Phenyl NH₂ C₄ C₈ C₁₈



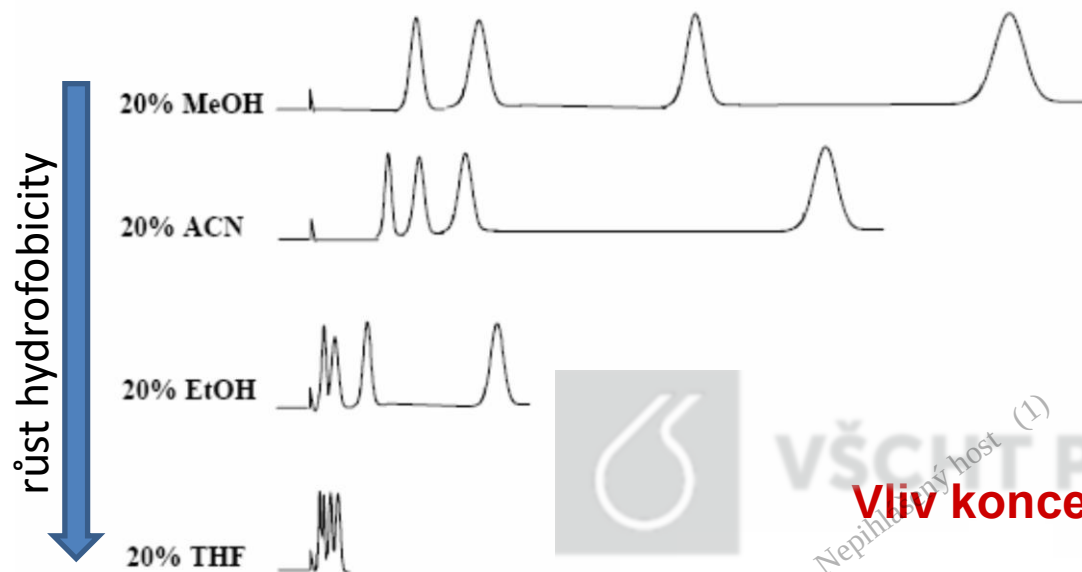
Mobilní fáze

Organické rozpouštědlo	Vhodné pro:	Viskosita	Poznámka
Methanol	•Org. molekuly	Střední-nízká	možná destabilizace struktury
Ethanol	•Org. molekuly	Střední-nízká	možná destabilizace struktury
Isopropanol	•Proteiny •Peptidy	Vysoká	nejmenší efekt na strukturu
Acetonitril (ACN)	•Org. molekuly •Proteiny •Peptidy	Nízká	nízký efekt na strukturu

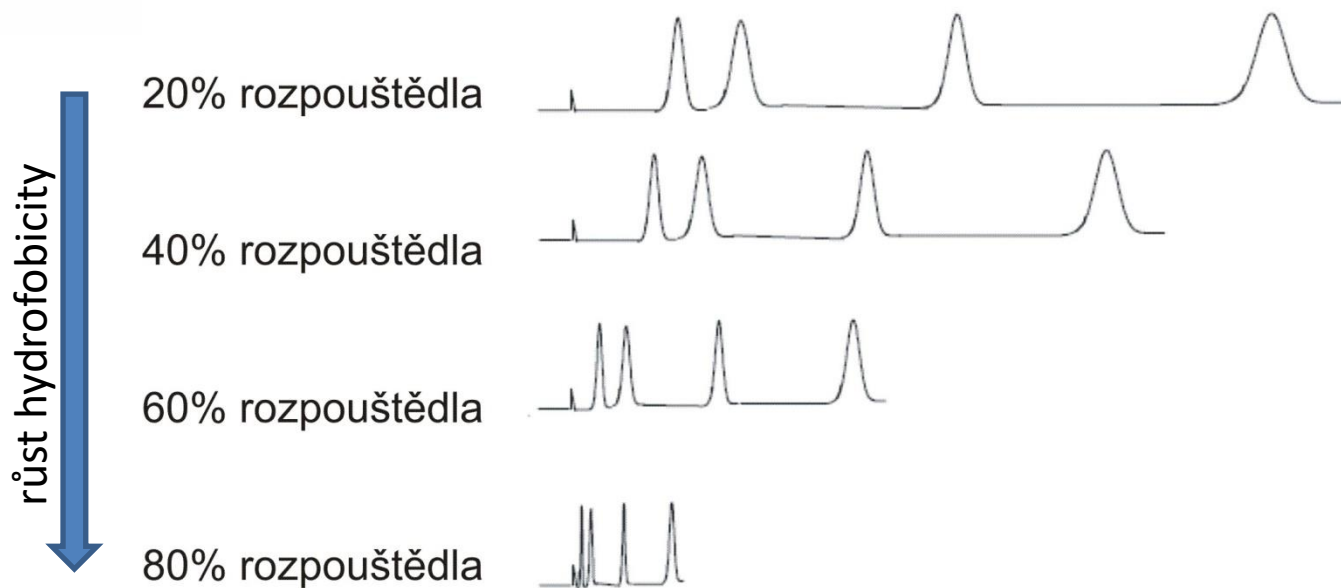


Mobilní fáze

Vliv typu mobilní fáze



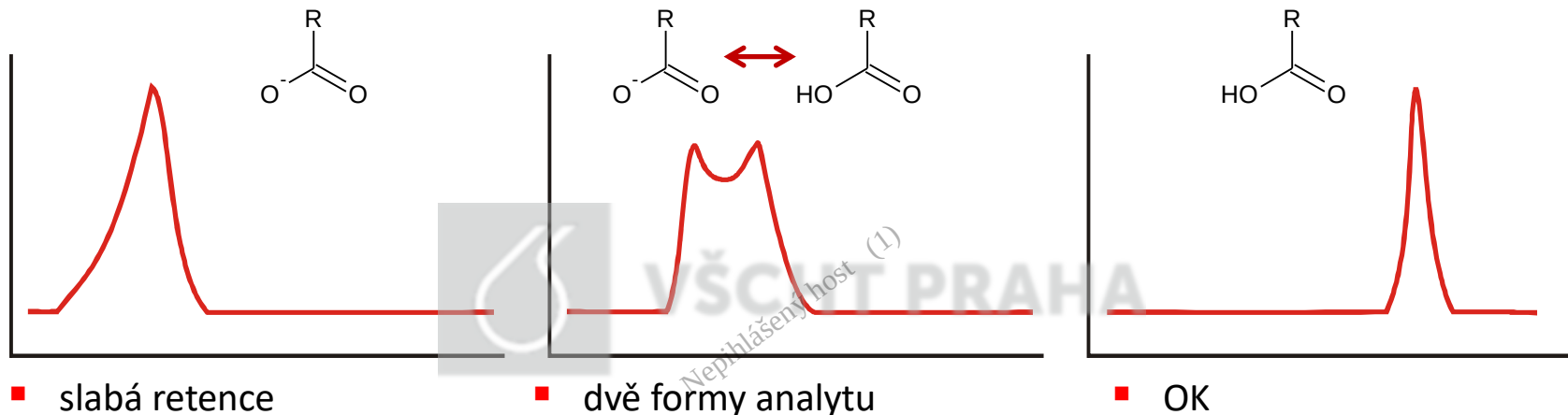
Vliv koncentrace rozpouštědla



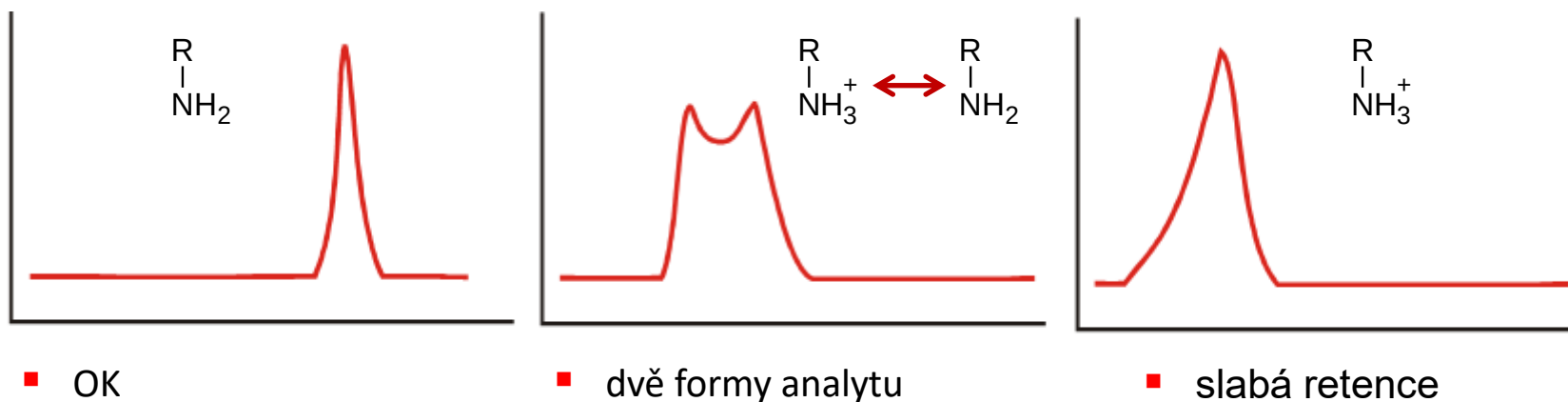
Retenční čas x pH mobilní fáze

klesající pH

kyselina

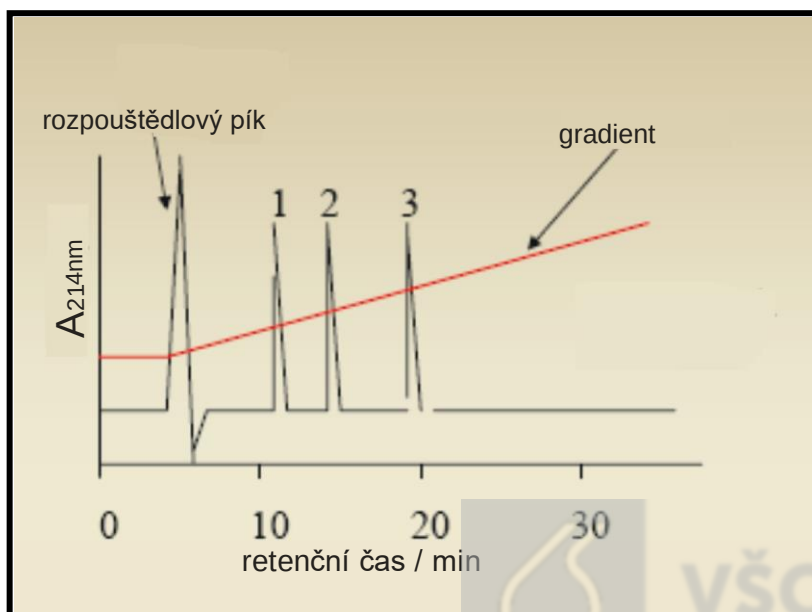


báze



Spektrofotometrické vlastnosti rozpouštědel

Solvent	A=1.0	A=0.01	Solvent	A=1.0	A=0.01
acetone	330	350	n-hexane	195	250
acetonitrile	190	225	iso-octane	215	~240
n-butyl acetate	254	300	iso-butyl alcohol	220	~310
n-butyl alcohol	215	275	iso-propyl alcohol	205	~260
n-butyl chloride	220	250	methanol	205	~260
chlorobenzene	287	~375	2-methoxyethanol	210	~280
chloroform	245	~270	methyl t butyl ether	210	~290
cyclohexane	200	~275	methyl ethyl ketone	329	375
cyclopentane	198	~290	methyl iso amyl ketone	330	375
decahydronapthalene	200	~290	methyl iso butyl ketone	334	~390
g-dichlorobenzene	295	~390	n-propylalcohol	210	~290
dichloromethane	233	250	propylene carbonate	220	~425
dime thyloretamide	268	~340	tetrahydrofuran	212	~320
N ₁ N ₁ dimethylformamide	268	~340	toluene	284	~340
dime thylsulfoxide	268	~360	1, 2, 4, trichlorobenzene	308	375
p-dioxane	215	~310	1, 1, 2 trichloro trifluoro ether	231	~290
ethylacetate	256	~320	trifluoroacetic acid	210	250
ethanol	210	270	water	<190	190
ethylether	215	275	o-xylene	288	350
ethylene dichloride	228	~290	methyl n-propyl ketone	331	~360
glyme	220	350	n-methylpyrrolidone	285	400
n-heptane	200	250	pentane	190	250
hexadecane	190	~260			



Pufr A: 0,1 % TFA + H₂O

Pufr B: 0,1 % TFA + acetonitril

Čas	% A	% B
0	100	0
3	100	0
30	70	30

Sekvence

R_T

2 RGGGG**V****L**GK

15,0

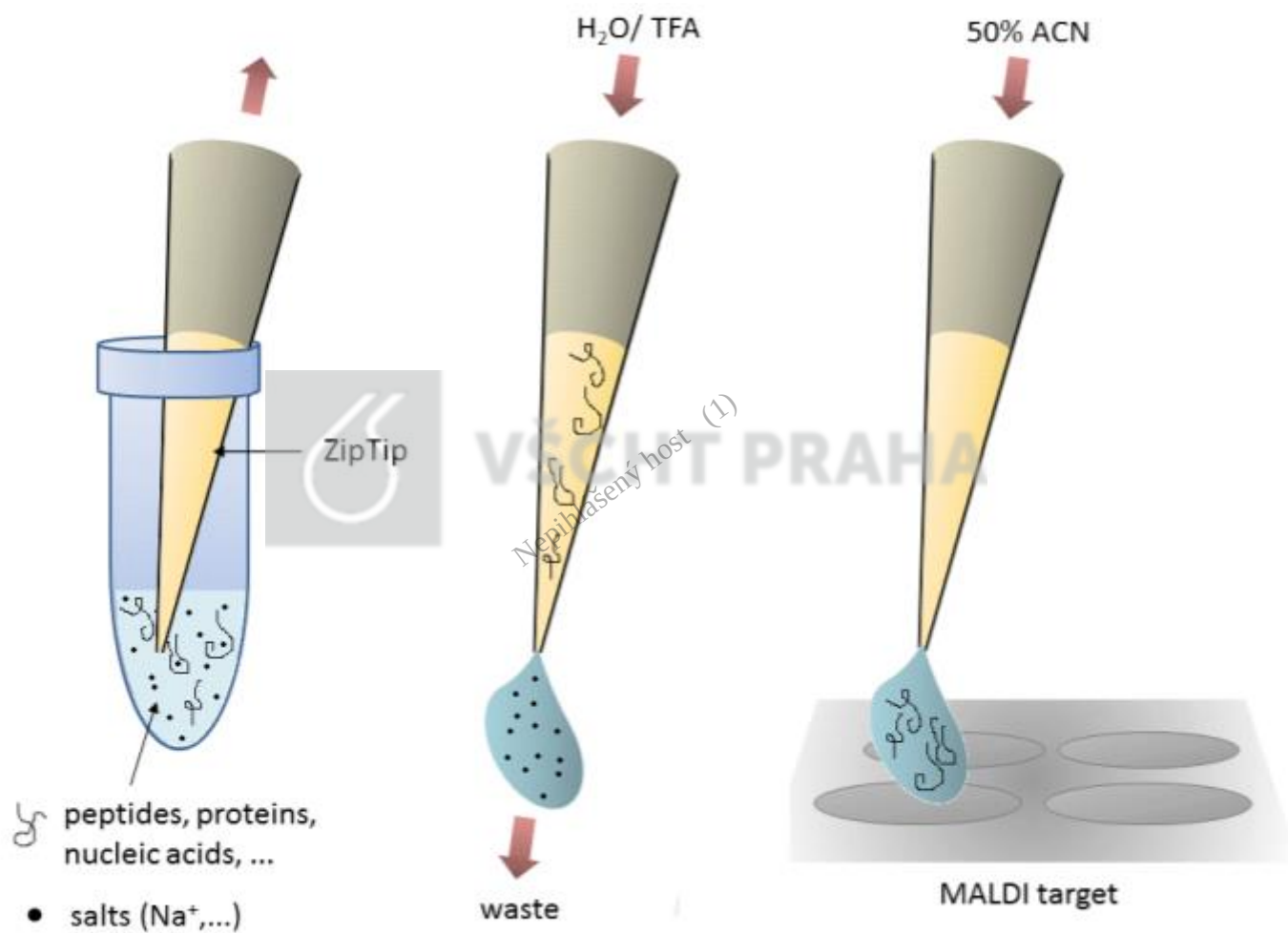
1 RGGGG**V****V**GK

10,5

3 RGGGG**L****L**GK

20,5

ZipTip



Experiment		
	vysoké rozlišení (gradientová eluce)	skupinová separace (kroková eluce)
stacionární fáze	velikost částic 10 - 30 μm - pro purifikace 5 - 12 μm - pro analytiku polymerní –lepší pro separaci proteinů (lze čistit pomocí NaOH)	velikost částic 30 μm nebo větší – vyšší průtok
kolona	délka 1 - 10 cm	nezáleží, krátká, silná lepší pro vyšší průtok
mobilní fáze	hydrofilnější	nemá významný vliv (50 %ACN)
objem vzorku	0,5 - 5% objemu kolony při isokratické eluci bez omezení při gradientové eluci	na objemu nezáleží
množství vzorku	5 - 10 % celkové kapacity kolony (dobré rozlišení)	40 % celkové kapacity kolony

použití RPC	
vysoké rozlišení (gradientová eluce)	skupinová separace (kroková eluce)
separece peptidů, proteinů a oligonukleotidů podle jejich hydrofobicity	Zakoncentrování oligonukleotidů a peptidů
Vhodná jako střední purifikační krok nebo závěrečný purifikační krok	Vhodná pro odsolování peptidů a oligonukleotidů
Purifikace syntetických peptidů	
Technika pro analýzu peptidů a peptidové mapování	

Tipy pro přípravu pufru

- Upravte pH před přidáním organického rozpouštědla
- Upravte pH pufru při teplotě experimentu
- Ověřte stabilitu proteinu
- Pro analytické experimenty použijte „HPLC grade“ chemikálie

Afinitní chromatografie

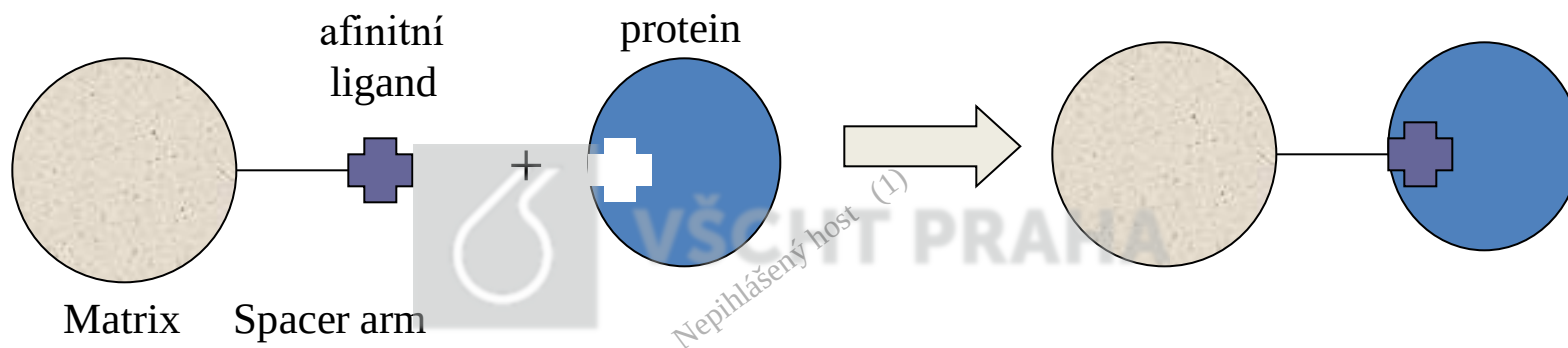


VŠCHT PRAHA

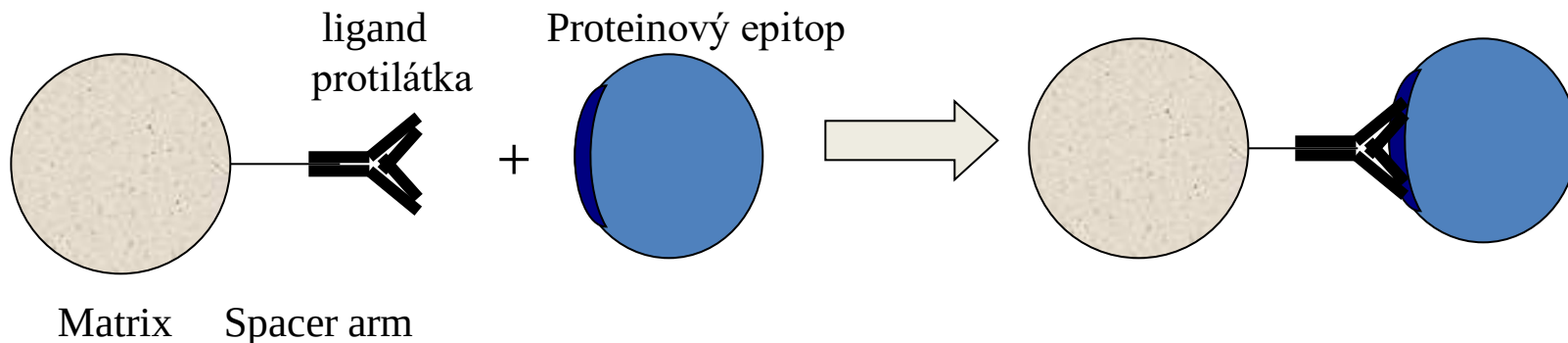
Nepřihlášený host (1)

Princip afinitní chromatografie

1. afinitní chromatografie

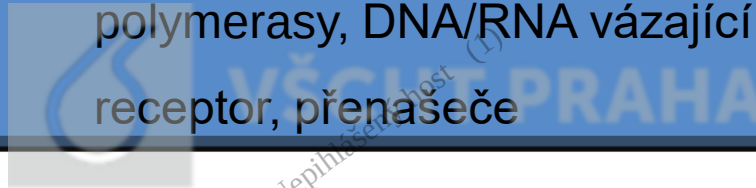
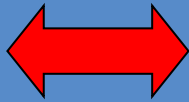


2. Imunoafinitní chromatografie



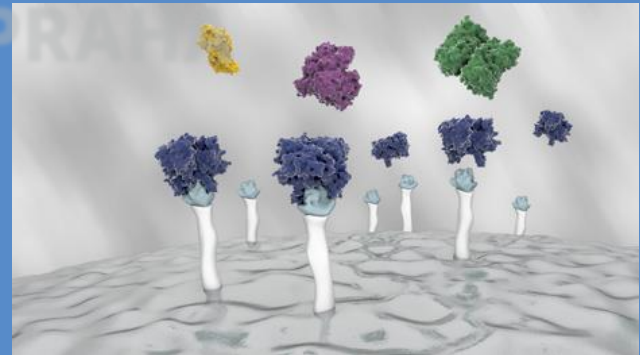
Příklady afinitních interakcí

enzym	analog substrátu, inhibitor, kofaktor
protilátka	antigen, virus, buňka
lektin	polysacharid, glykoprotein, buněčný povrch, receptor
nukleová kys.	komplementární sekvence, histony, DNA/RNA polymerasy, DNA/RNA vázající proteiny
hormon, vitamin	receptor, přenašeče



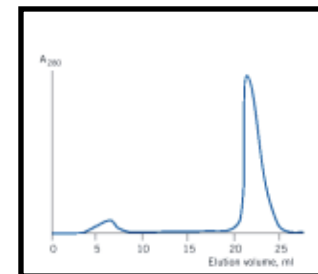
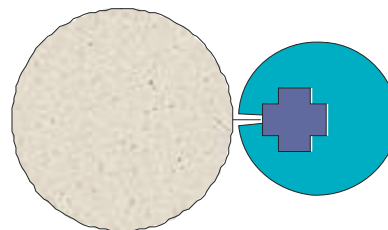
Stacionární fáze

- nejčastěji agarosa (Sepharosa)
- ligand kovalentně navázaný přes $-OH$ skupinu cukerné jednotky nosiče
- velké póry umožňující průnik velkých molekul
- co nejnižší nespecifické adsorbce
- ligandy:
 - specifické
 - reversibilní vazba
 - schopnost navázat na nosič bez ovlivnění vazby
 - vazba na protein nesmí být ani slabá ani silná

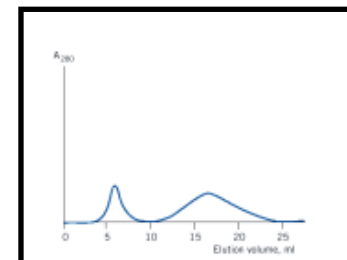
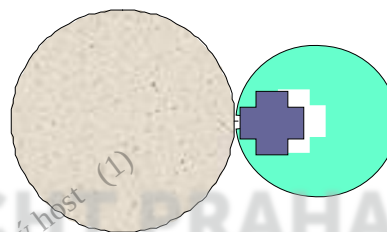


Ligand x raménko

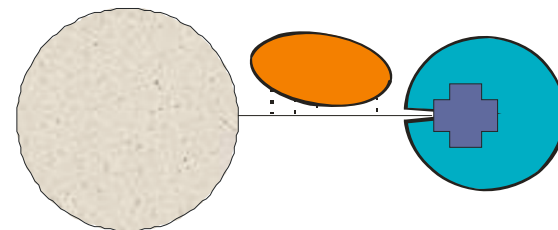
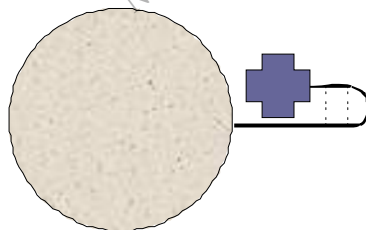
- ligand $M_r < 1000$ – raménko



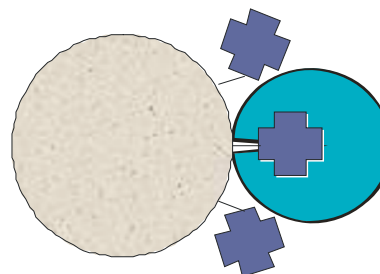
- krátké raménko – látka se na ligand špatně váže



- dlouhé raménko – možná nespecifická vazba – snížení selektivity

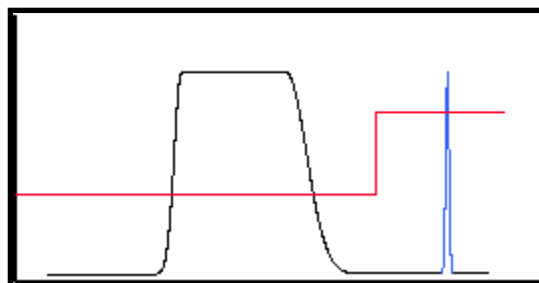


- velká hustota ligandů - sterická nepřístupnost přebytečných ligandů



Vhodné vazebné a eluční podmínky

ideální podmínky

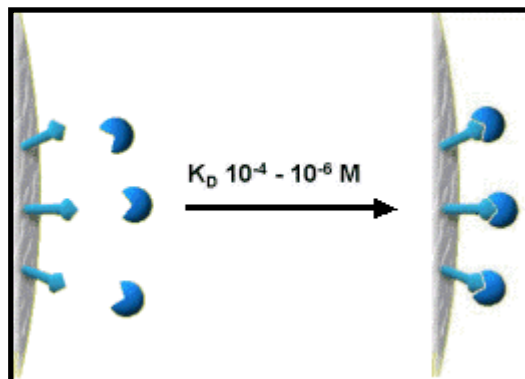


vazba mezi ligandem a purifikovanou molekulou

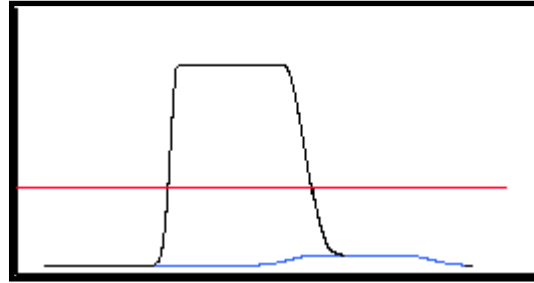
$$K_D = \frac{[L] \cdot [P]}{[LP]}$$

vazba K_D $10^{-6} - 10^{-4}$ M

eluze K_D $10^{-1} - 10^{-2}$ M

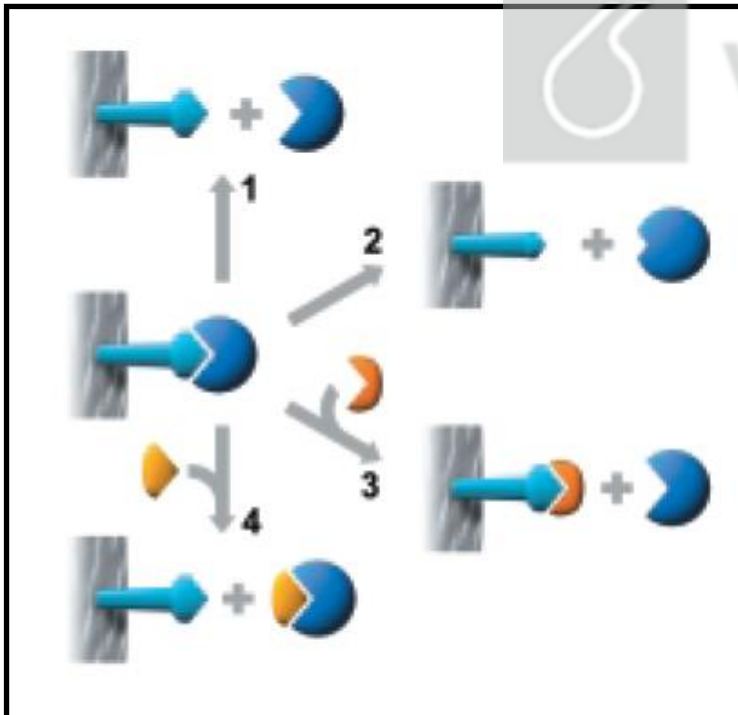


$K_D > 10^{-4} \sim$ slabá interakce



$K_D < 10^{-6} \sim$ silná interakce ➡ obtížná eluce

Možnosti eluce



Metoda 1

změna pH nebo iontové síly

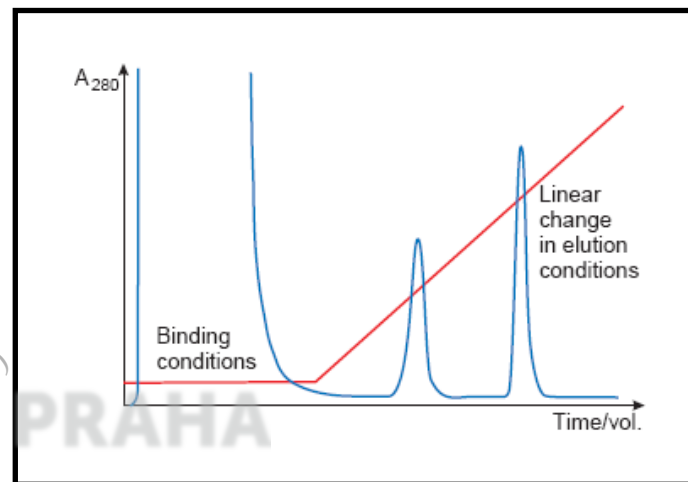
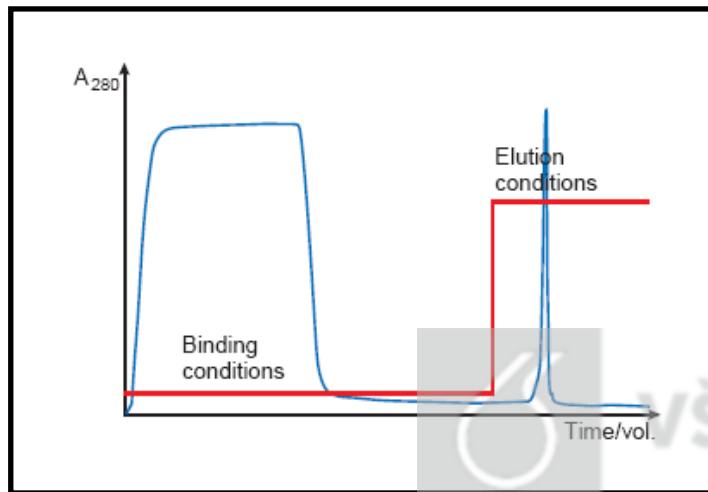
Metoda 2

Extremní pH nebo vysoká koncentrace
močoviny nebo guanidin hydrochloridu

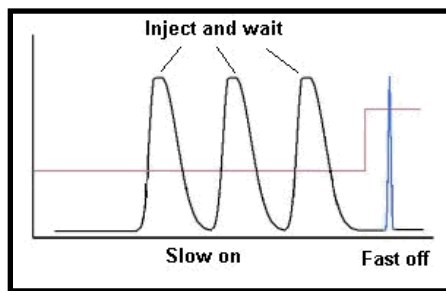
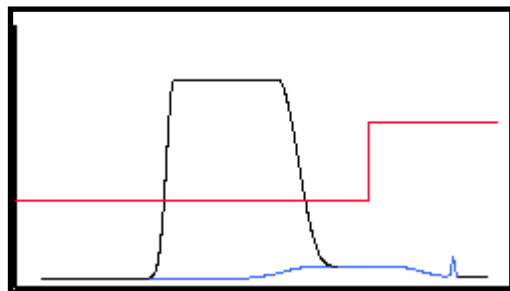
Metoda 3 a 4

přídavek kompetičního činidla

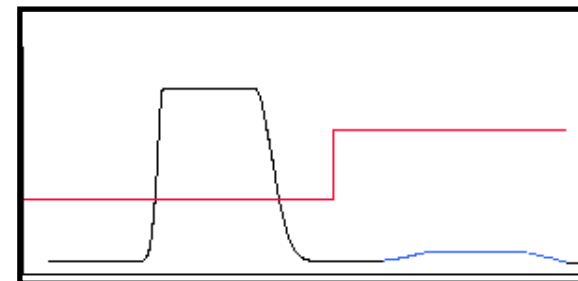
Gradientová x skoková eluce



pomalá vazba

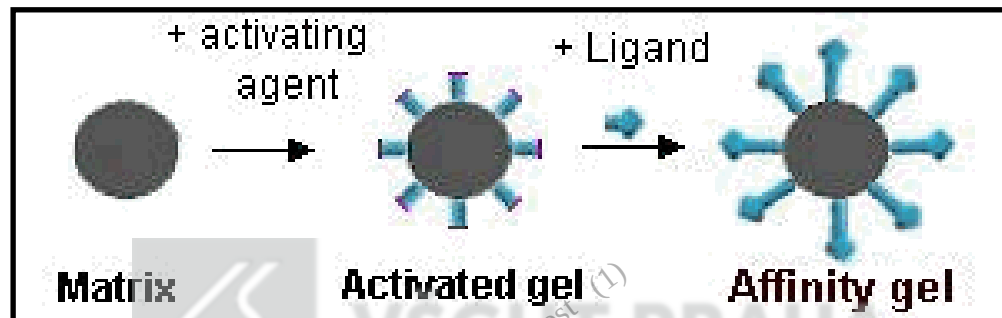


pomalá desorpce



Typy afinitních ligandů

Ligandy používané pro mono-specifickou afinitní chromatografii



Látky používané pro připojování ligandů

aktivátor

N-hydroxysukcinimid (NHS)

CNBr

Karbodiimid

Epoxid

...

skupina ligandu

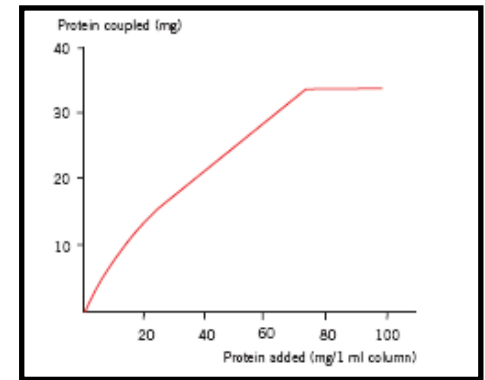
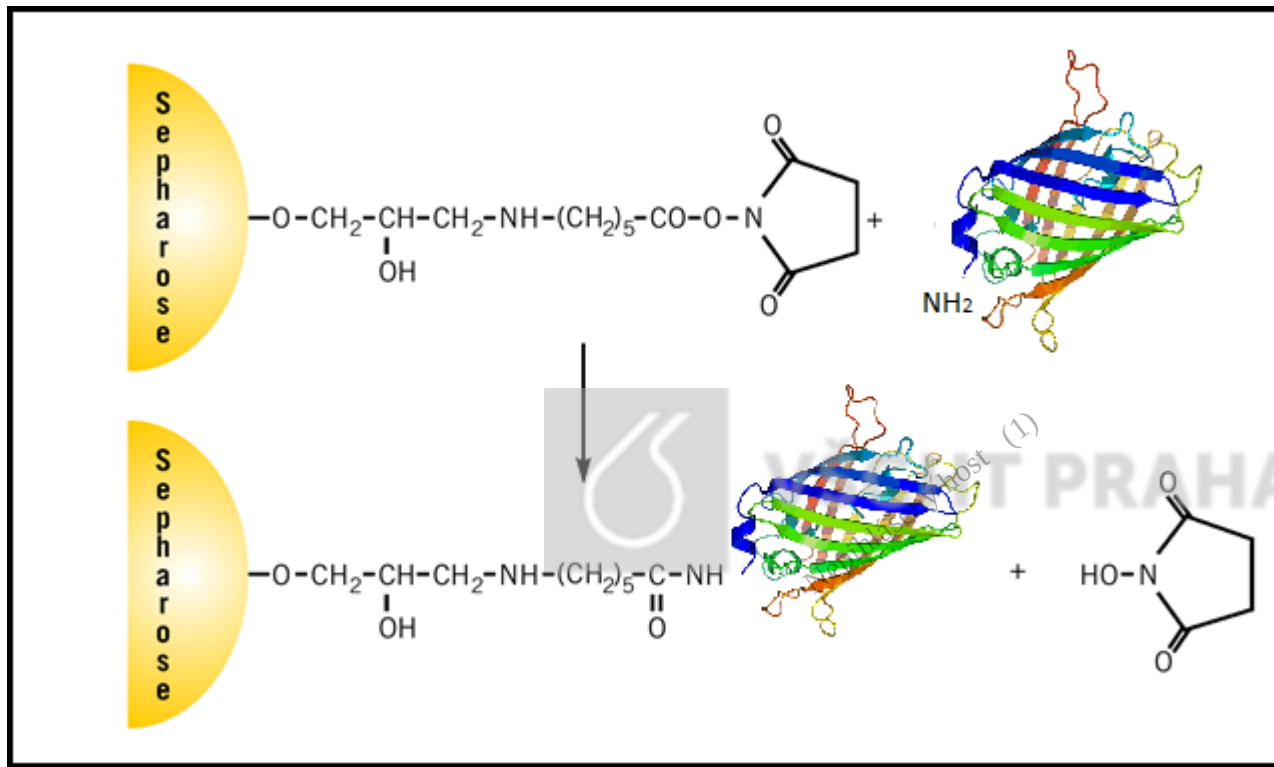
-NH₂

-NH₂

-NH₂, -COOH

-SH, -NH₂, -OH

N-hydroxysukcinimid (NHS-Sepharosa)

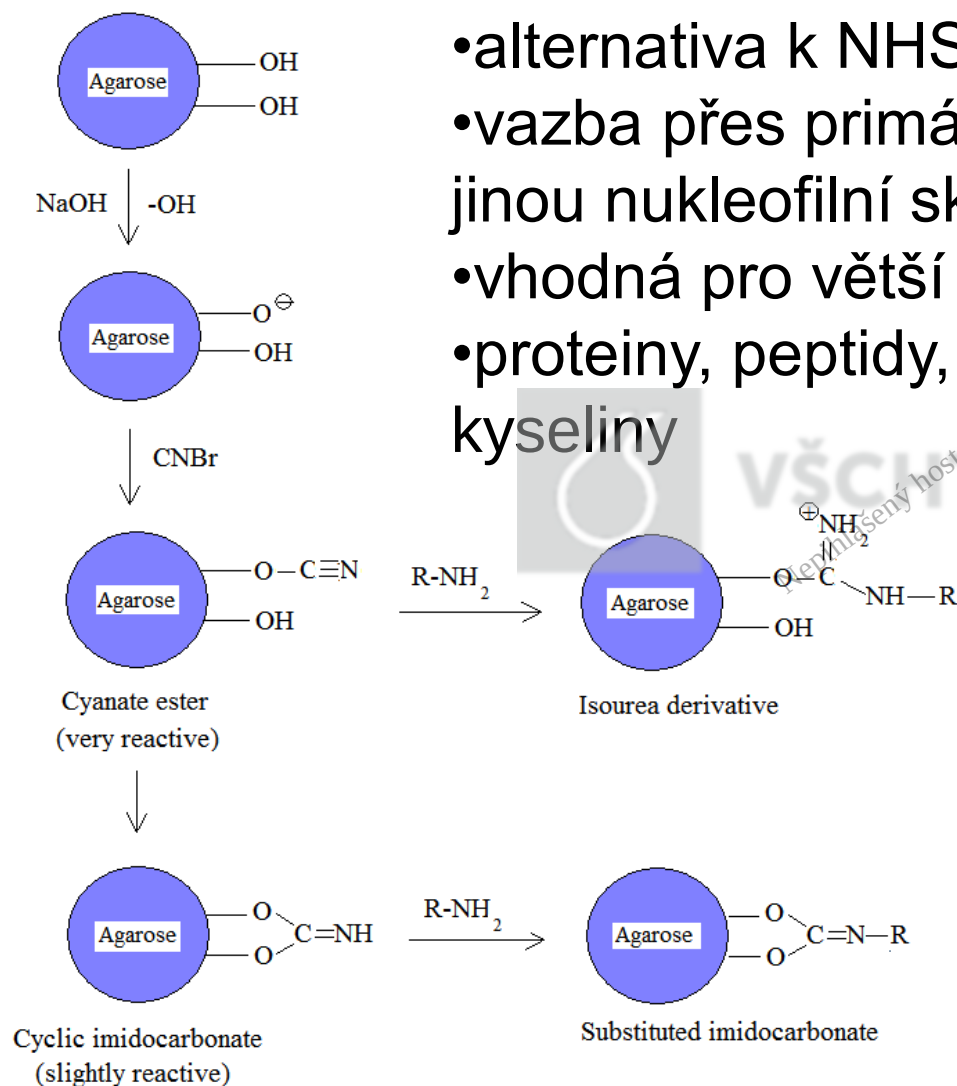


> 30 mg / 1 ml nosiče

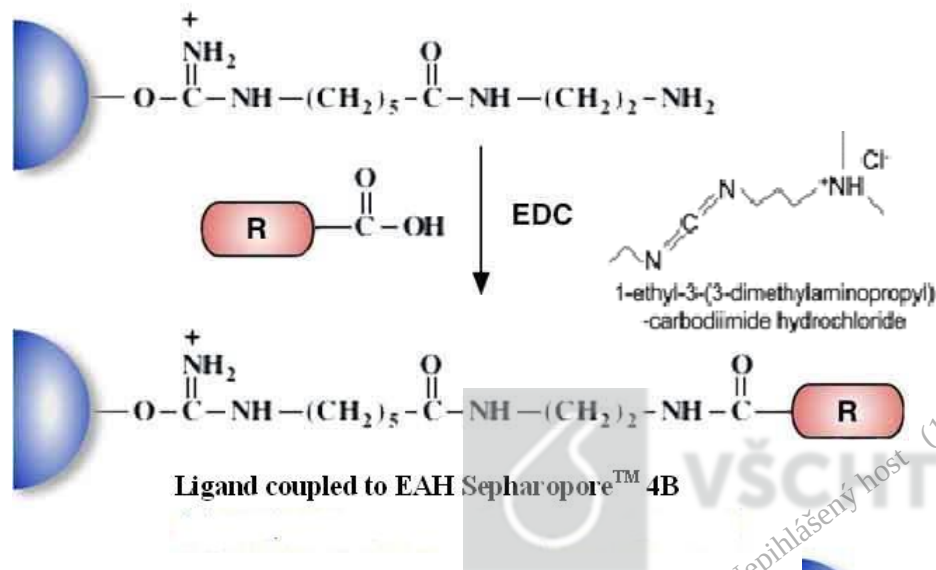
- připojení přes amino skupinu (často protilátka nebo antigen)
- první výběr při přípravě imunospecifického média

CNBr (CNBr aktivovaná Sepharosa)

- alternativa k NHS aktivované Sepharose
- vazba přes primární aminoskupinu nebo přes jinou nukleofilní skupinu
- vhodná pro větší ligandy
- proteiny, peptidy, aminokyseliny, nukleové kyseliny

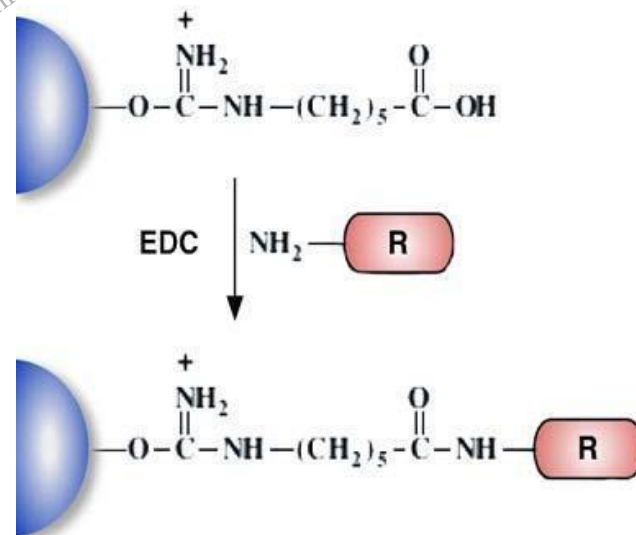


N, N'-disubstituovaný karbondiimid



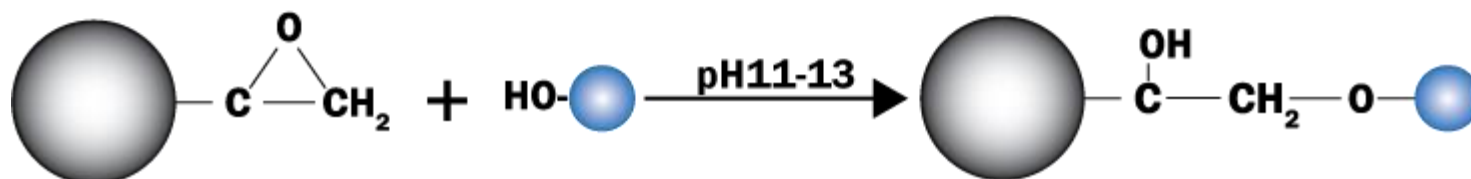
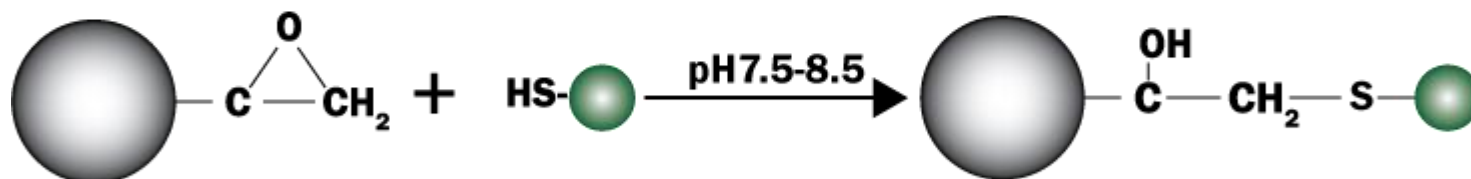
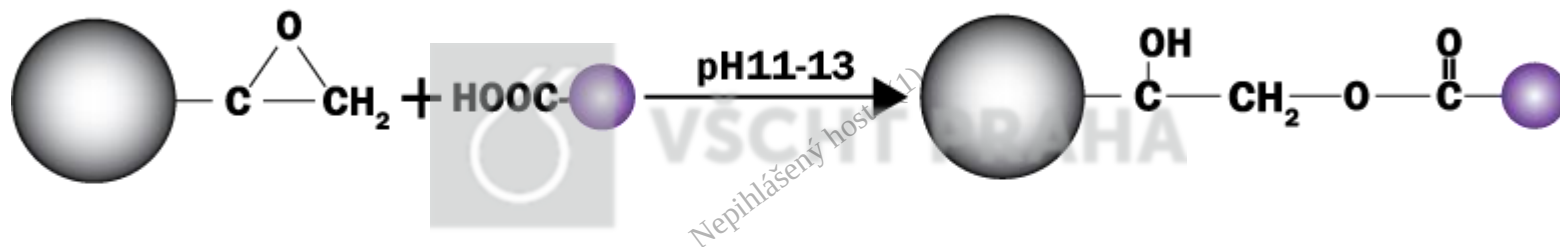
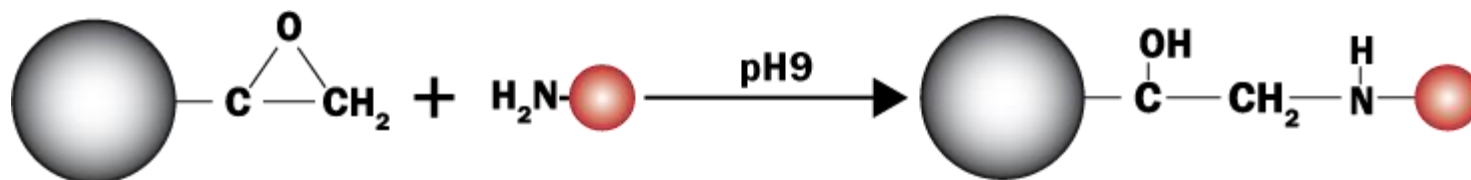
EAH Sepharosa + ligand-COOH

ECH Sepharosa + ligand-NH₂



•malé ligandy

Epoxid (Epoxy-aktivovaná Sepharosa 6B)



Aktivovaná thiolová skupina

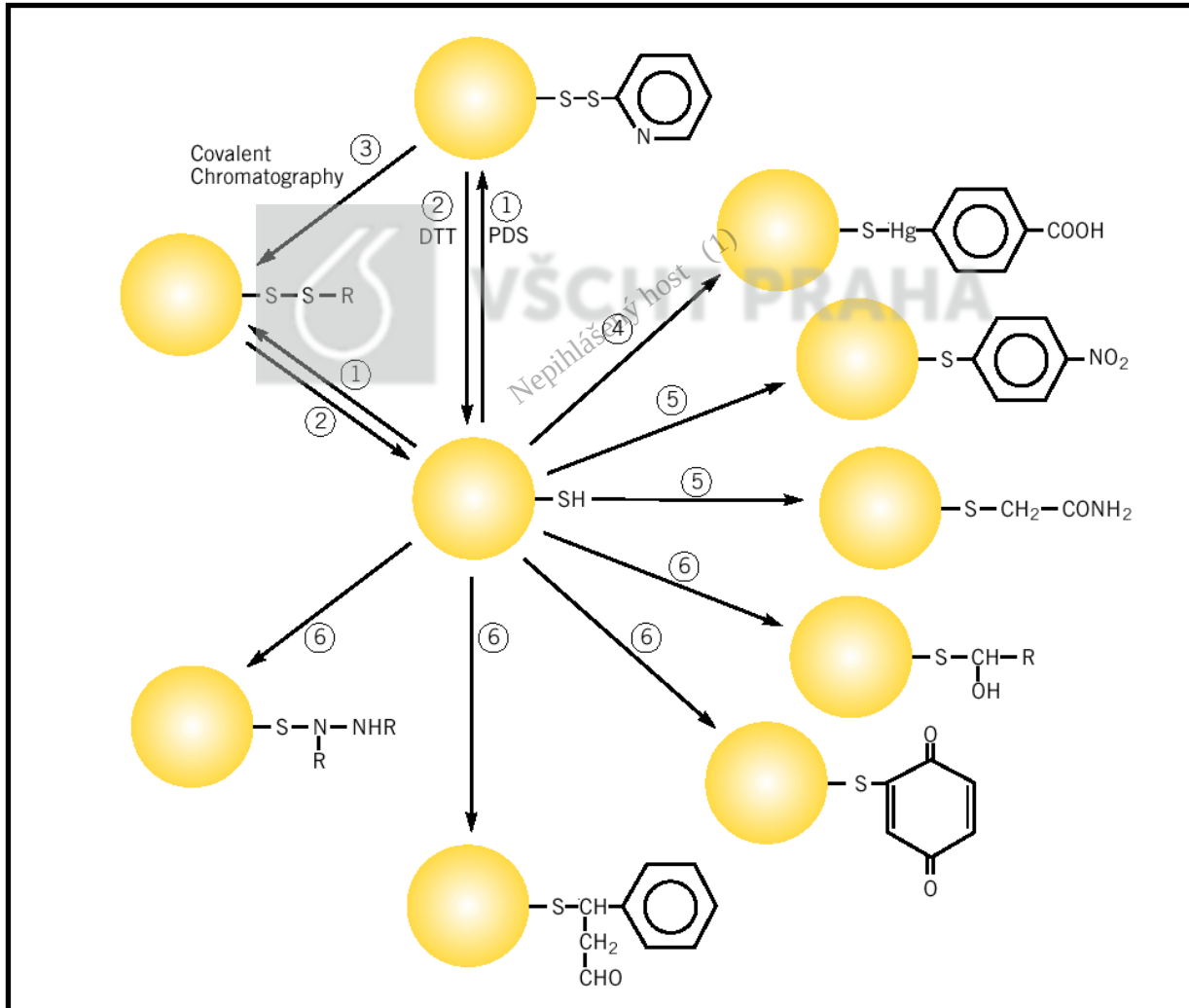
1– 2 tvorba disulfidů (reversibilní-DDT)

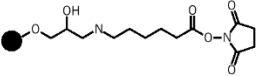
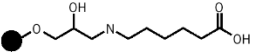
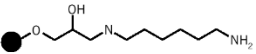
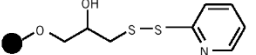
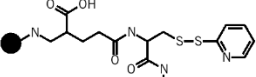
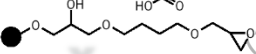
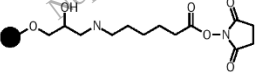
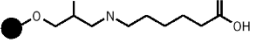
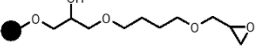
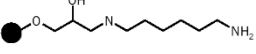
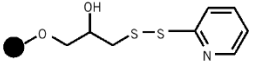
3– kovalentní chromatografie

4– reakce s těžkými kovy a jejich deriváty např. *p*-chloromercuribenzoate → mraptidy

5- reakce s alkylovými nebo arylovými halogenidy → thioleterové deriváty

6- reakce s látkami obsahujícími C=O, C=C a N=N



Chemical group on ligand	Length of spacer arm	Structure of spacer arm	Product
Proteins, peptides, amino acids			
amino	10-atom		HiTrap NHS-activated HP NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow
	None	—	CNBr-activated Sepharose 4B CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow
carboxyl	10-atom		ECH Sepharose 4B
	11-atom		EAH Sepharose 4B
thiol	4-atom		Thiopropyl Sepharose 6B
	10-atom		Activated Thiol Sepharose 4B
	12-atom		Epoxy-activated Sepharose 6B
Sugars			
hydroxyl	12-atom		Epoxy-activated Sepharose 6B
amino	10-atom		HiTrap NHS-activated HP
	10-atom		ECH Sepharose 4B
	12-atom		Epoxy-activated Sepharose 6B
carboxyl	11-atom		EAH Sepharose 4B
Polynucleotides			
amino	None		CNBr-activated Sepharose 4B CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow
mercurated base	4-atom		Thiopropyl Sepharose 6B
Coenzymes, cofactors, antibiotics, steroids			
amino, carboxyl, thiol or hydroxyl			use matrix with spacer arm (see above)

Ligandy používané pro skupinově-specifickou afinitní chromatografii

skupinově specifický ligand	specifita
Protein A	Fc region IgG
Protein G	Fc region IgG
Lektiny	glukopyranosylové a mannopyranosylové skupiny
Cibacron Blue	široká skupina enzymů, NAD ⁺ dependentní enzymy, sérový albumin
Procion Red	NADP ⁺
Lysin	plasminogen, rRNA
Arginin	serinové proteasy
Benzamidin	serinové proteasy
Kalmodulin	proteiny regulované kalmodulinem
Heparin	kolagulační faktory, lipoproteiny, lipasy, hormony, steroidní receptory, nukleové kyseliny vázající enzymy
Streptavidin	Biotin a biotinylované látky
Oligo (dT, dA, ...)	mRNA, nukleasy
Kovové ionty	proteiny a peptidy obsahující dostupný His

Protein A a Protein G

protein A – *Staphylococcus aureus*

protein G – *Streptococcus*

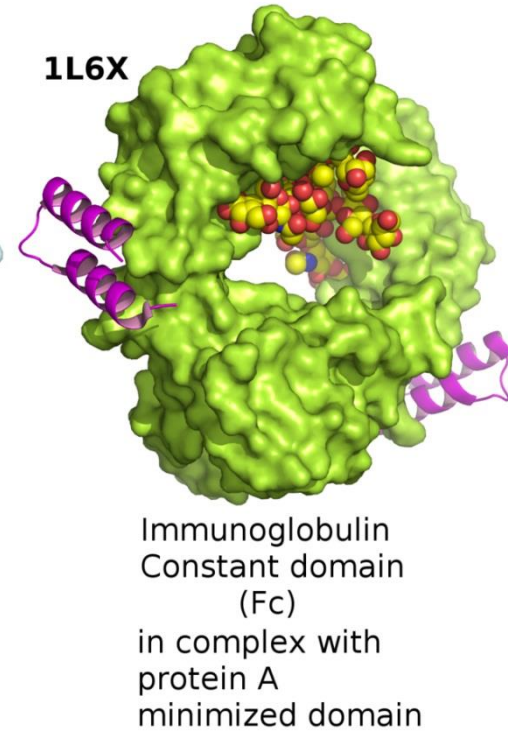
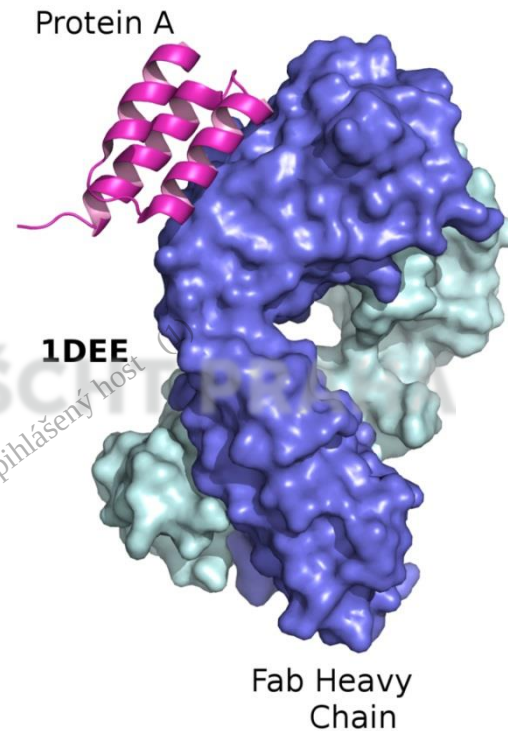
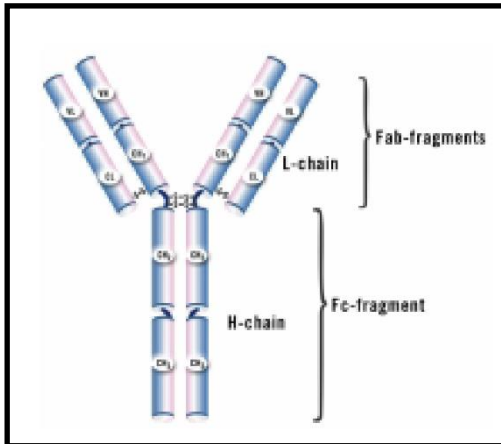
purifikace:

monoklonální protilátky IgG

polyklonální protilátky IgG

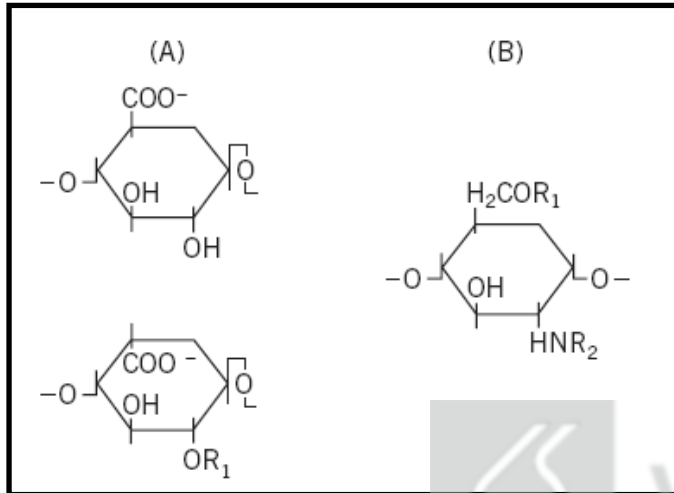
imunokomplexy

Protein A neváže albumin - dočišťovací
krok při purifikaci IgM, IgY



Species	Protein A	Protein G
Human	Strong	Strong
Mouse	Strong	Strong
Rat	Weak	Medium
Cow	Weak	Medium
Goat	Weak	Strong
Sheep	Weak	Strong
Horse	Weak	Strong
Rabbit	Strong	Strong
Guinea pig	Strong	Weak
Pig	Strong	Weak
Dog	Strong	Weak
Cat	Strong	Weak
Chicken	Unknown	Unknown

Heparin



A hexuronová kyselina - D-glukuronová kyselina
nebo L-iduronová kyselina (C-5 epimer)

B D-glukosamin

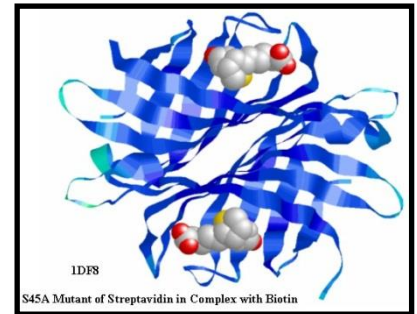
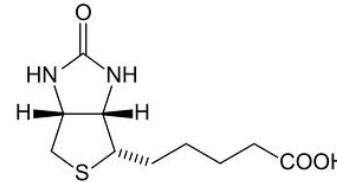
R₁ = -H nebo -SO₃

R₂ = -SO₃ nebo -COCH₃.

- DNA vázající proteiny – iniciační a elongační faktory, restriční endonukleasy, DNA ligasa, DNA and RNA polymerasa
- inhibitory serinových proteas - antithrombin III
- lipoprotein lipasy, koagulační enzymy, superoxid dismutasa
- růstové faktory
- extracelulární matrixové proteiny
- hormonální receptory - androgenní receptory
- Lipoproteiny

Streptavidin

- streptavidin - molekula izolovaná z *Streptomyces avidinii*
- biotinylované protilátky – purifikace antigenů

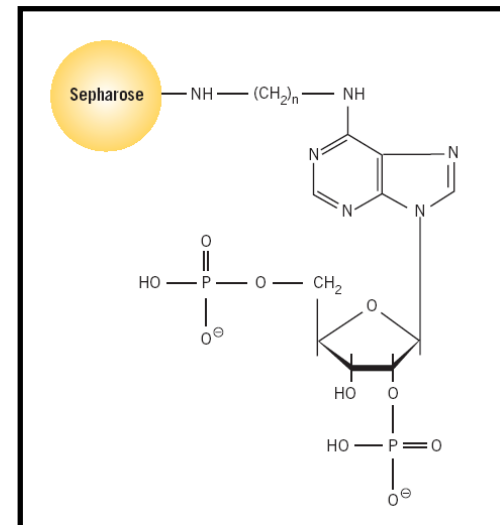


5'-AMP-Sepharosa

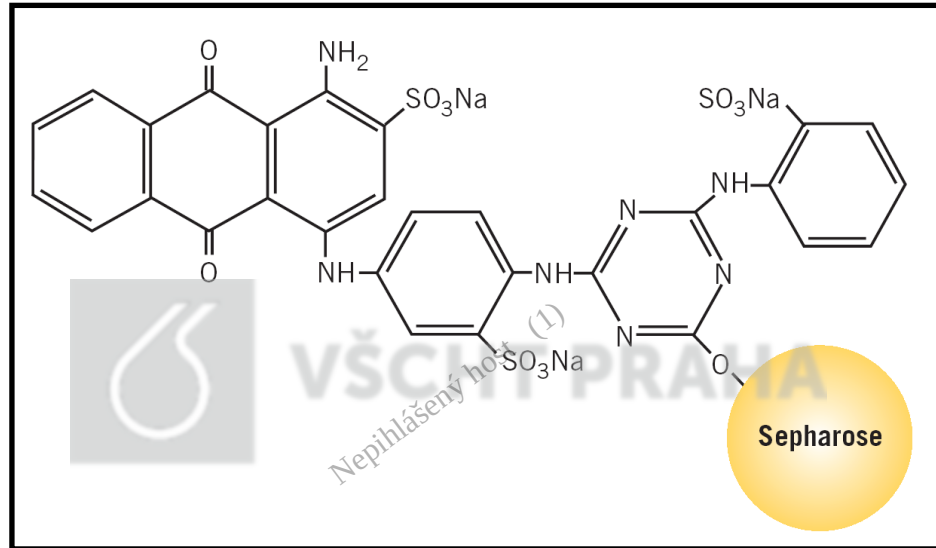
- ATP-dependentní kinasy

2'5'-ADP-Sepharosa

- NADP⁺-dependentní dehydrogenasy
silně interagují s 2'5'-ADP

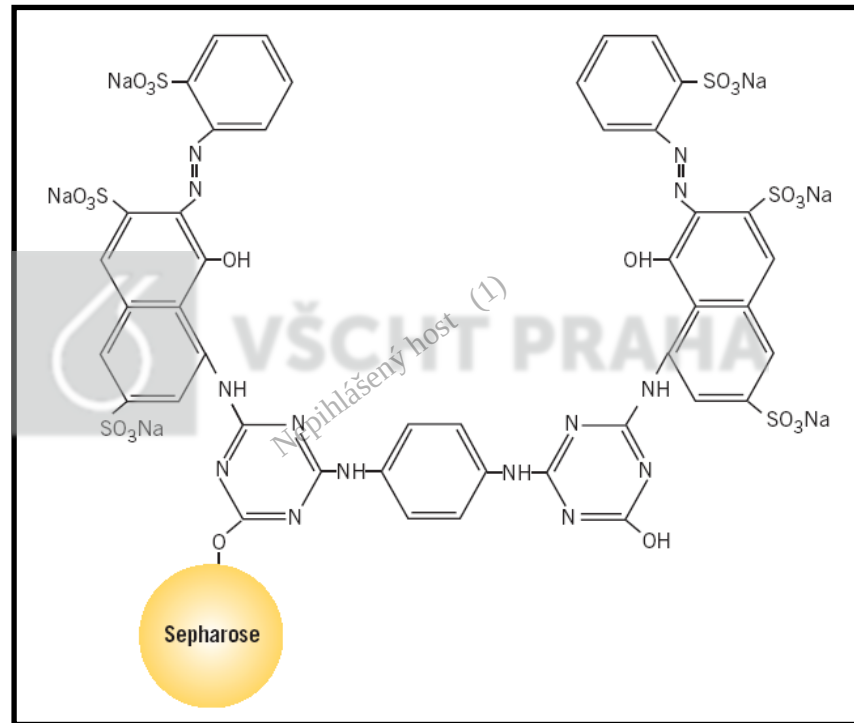


Cibacron™ Blue F3G-A (Blue Sepharosa)



- Cibacron Blue F3G-A ~ „analog“ NAD⁺ ⇒ enzymy vyžadující kofaktory obsahující adenyl - kinasy, dehydrogenasy
- vazba albuminu, koagulačních faktorů, lipoproteinů a interferonu (elektrostatické a hydrofobní interakce)

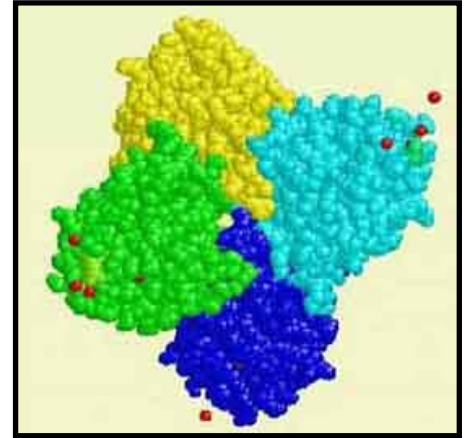
Procion™ Red (Red Sepharosa)



- enzymy vyžadující kofaktor NADP^+
- vazba albuminu, koagulačních faktorů, lipoproteinů a interferonu (elektrostatické a hydrofobní interakce)

Konkavalin A

- lektin z *Canavalia ensiformis* (jack bean)
- tetramerní metalloprotein
- větvené mannosidy, cukry s terminální mannosou nebo glukosou ($\alpha\text{Man} > \alpha\text{Glc} > \text{GlcNAc}$)



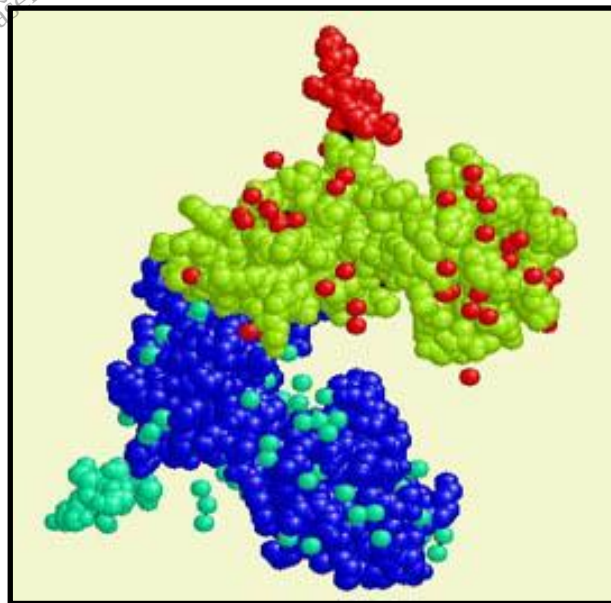
- purifikace glykoproteinů, polysacharidů a glykolipidů
- detekce změn ve složení látek obsahujících cukry
- izolace povrchových buněčných glykoproteinů

„Lentil“ lektin

- lektin z *Lens culinaris* (čočka)
- větvené mannosidy obsahující fukosu α -1,6 vázanou na N-acetylglukosamin
- membranové glykoproteiny, povrchové buněčné antigeny, virální glykoproteiny

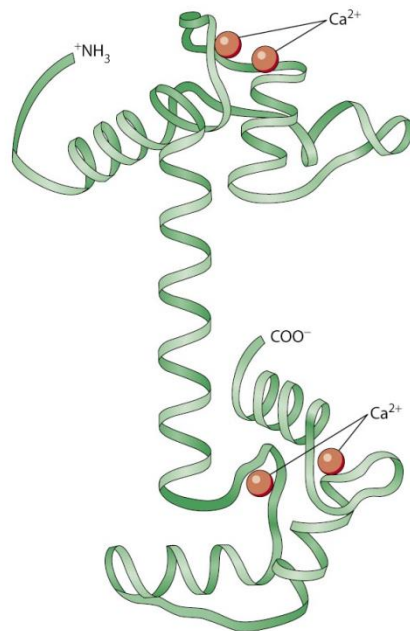
Pšeničný lektin

- ze semen *Triticum vulgare* (pšenice)
- homodimerní neglykosylovaný protein
- vazba - N-acetylglukosaminových zbytků, chitobiosového jádra N-oligosacharidů, N-acetylneuraminové kyseliny

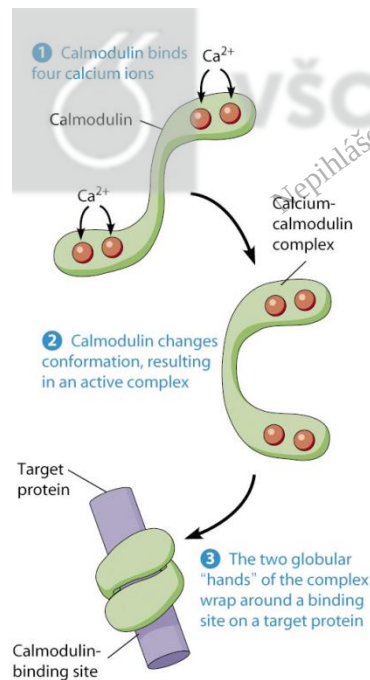


Kalmodulin

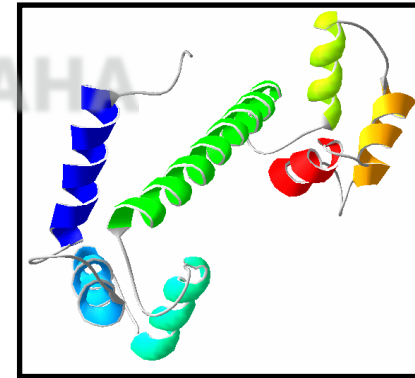
- vysoce konservovaný regulační protein eukaryotních buněk
- účastní se mnoha buněčných procesů – metabolismus glykogenu, přenos nervových impulsů, regulace, kontrola poměru $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$
- purifikace kalmodulin vázajících proteinů - ATPasy, adenylát cyklasy, protein kinasy, fosfodiesterasy, neurotransmitery



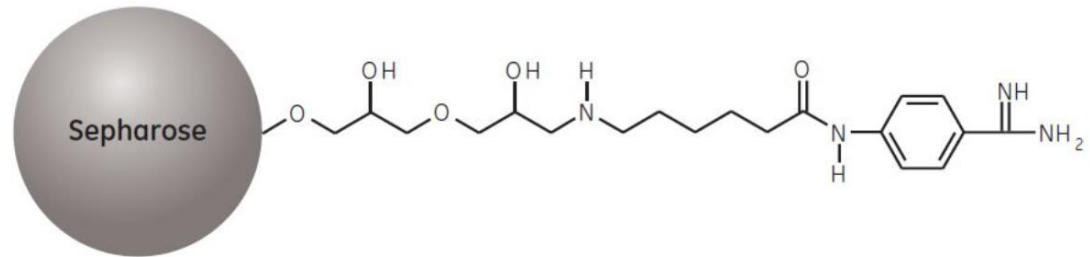
(a) Structure of Ca^{2+} -calmodulin complex



(b) Function of Ca^{2+} -calmodulin complex

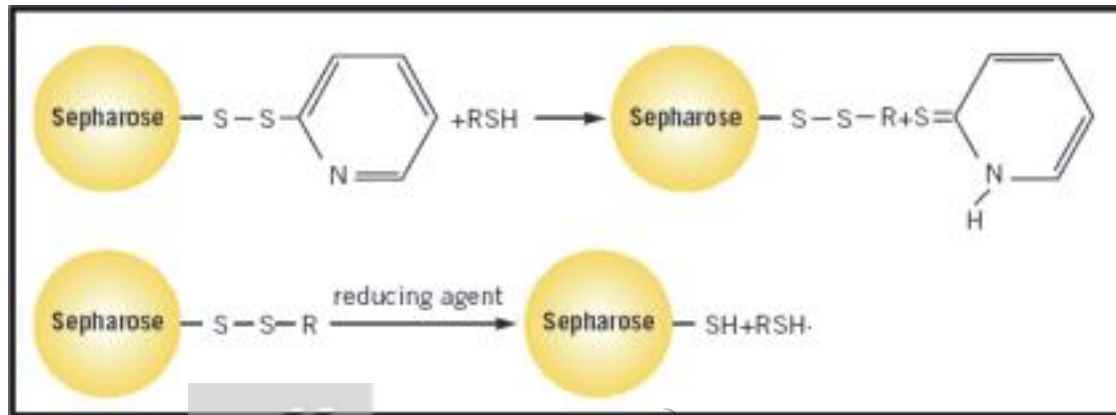


Benzamidin



- purifikace/odstranění serinových proteas

Aktivovaný thiol



- Thiol-obsahující látky
- ~ kovalentní chromatografie

VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

Rekombinantní fúzní proteiny

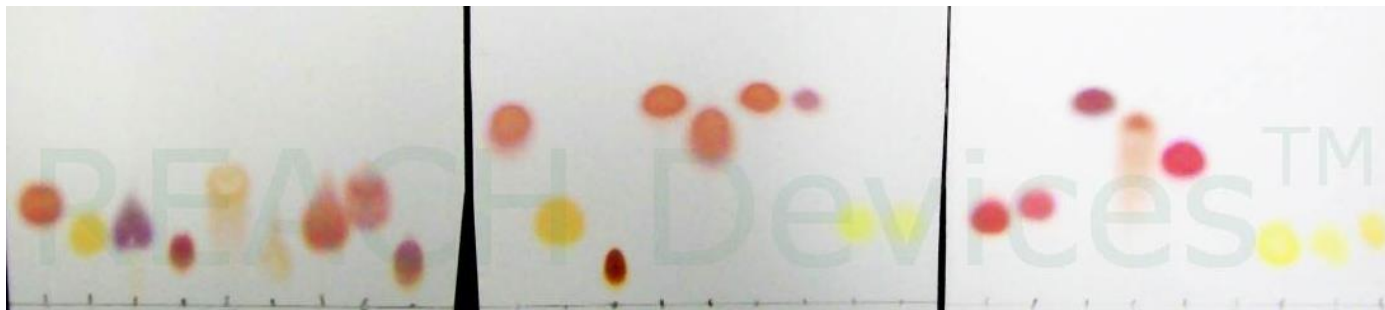
fúzní kotva	imobilizovaný ligand	podmínky vazby	podmínky eluce
Glutathion S-transferasa GST	redukovaný glutathion	Neutrální pH, nedenaturující prostředí, glutathion musí být redukovaný a GST musí být aktivní	volný redukovaný glutathion
Histidinová kotva His-tag	Chelatovaný nikl nebo kobalt	Neutrální pH bez redukčních a oxidačních látek	>200 mM Imidazol, nízké pH, silné chelatační činidlo
Maltose Binding Protein MBP	Amylosa	Neutrální pH, nedenaturující prostředí; přídavek NaCl k snížení nespecifické sorbce	maltosa
Protein A	IgG	Neutrální pH, nedenaturující prostředí	změna pH, iontové síly
Green Fluorescent Protein GFP	Anti-GFP antibody	Neutrální pH, nedenaturující prostředí	nízké pH, iontová síla

PLANÁRNÍ (PLOŠNÁ) CHROMATOGRRAFIE

Tenkovrstvá chromatografie a papírová chromatografie

techniky pro **identifikaci** a **separaci** směsi organických látek

- Identifikace složek směsi (nutné použít standard)
- analýsa frakcí sbíraných během purifikace
- analýsa čistoty látek



tenkovrstvá chromatografie (TLC)

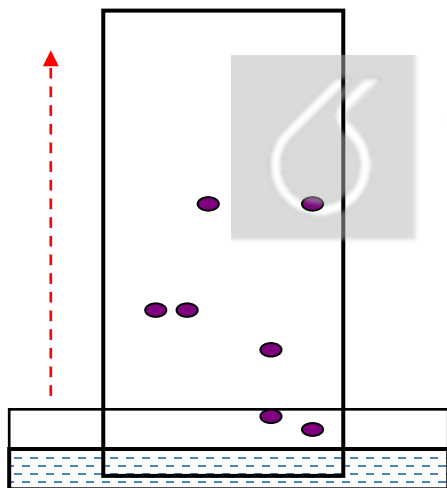
rozdělovací -	stacionární fáze: mobilní fáze:	kapalina zachycená v tenké vrstvě kapalina
adsorpční -	stacionární fáze: mobilní fáze:	pevný adsorbent, který je součástí tenké vrstvy kapalina

papírová chromatografie (PC)

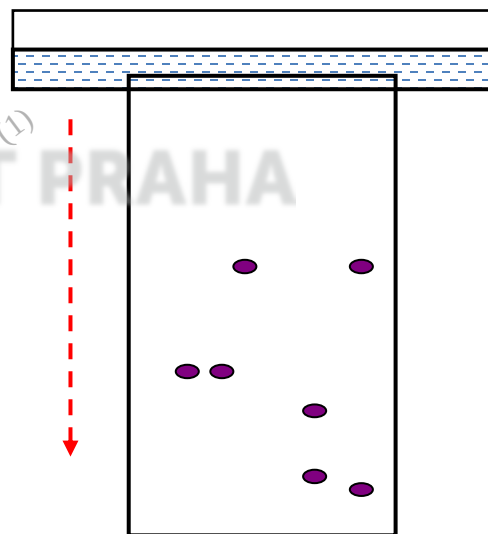
rozdělovací -	stacionární fáze: mobilní fáze:	kapalina zachycená v papíře kapalina
adsorpční -	stacionární fáze: mobilní fáze:	stacionární fáze jsou tuhá vlákna papíru kapalina

Uspořádání tenkovrstvé a papírové chromatografie

Vzestupné



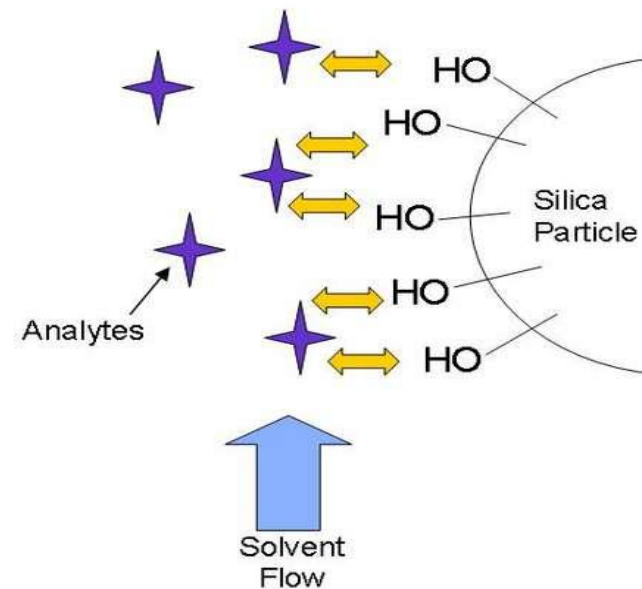
Sestupné



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

mobilní fáze vzlíná stacionární fází TLC – látky rozpuštěné v mobilní fázi putují TLC deskou

složky směsi putují rozdílnou rychlostí, která záleží na intermolekulárních silách mezi látkou a silikagelem stacionární fáze a látkou a složkami mobilní fáze



<http://www.instructables.com/id/EW1YDCYF4REC0IU/>

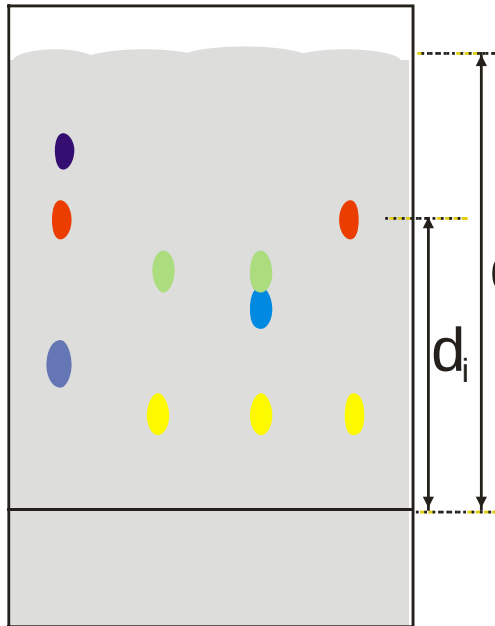
stacionární fáze SiO_2 je velmi polární – silné dipól-dipól interakce, vodíkové můstky

čím polárnější analyt, tím silnější vazba se stacionární fází, tím menší rychlost

mobilní fáze relativně nepolární – silné Londonovy síly, dipól-dipól interakce, vodíkové můstky

nepolární analyt interaguje se stacionární méně silně než s mobilní fází – putuje rychleji

Charakterizace separece



$$R_{F,i} = \frac{u_i}{u_m} = \frac{d_i}{d_m}$$

u_i
 u_m
 d_i
 d_m

rychlost skvrny i-tého analytu

rychlost (čela) mobilní fáze

vzdálenost středu skvrny i-tého analytu od startu

vzdálenost čela mobilní fáze od startu

Co nám říká hodnota R_f ?

- R_f hodnoty lze použít k usnadnění identifikace látky v porovnání se standardy
- R_f hodnota není fyzikální konstanta, mělo by být provedeno srovnání pouze skvrny na stejné desce za stejnou dobu
- Dvě látky, které mají stejnou hodnotu R_f mohou být totožné; ty, které mají různé hodnoty R_f nejsou totožné

Typ látky		
málo polární	alkany	polárnější látky se váží silněji na stacionární fázi
	alkeny	
	etery	
	aromáty	
	aldehydy a ketony	
	alkoholy	
	aminy	
	organické kyseliny	
nejvíce polární	soli	
rozpouštědlo		
málo polární	hexany	eluční síla běžných rozpouštědel
	tetrachlormethan	
	toluen	
	chloroform	
	diethyleter	
	ethylacetát	
	aceton	
	methanol	
nejvíce polární	kys. octová	
	voda	

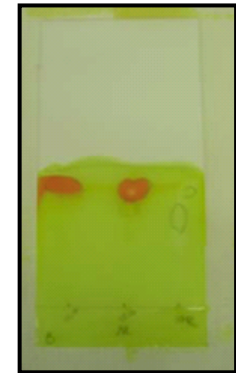
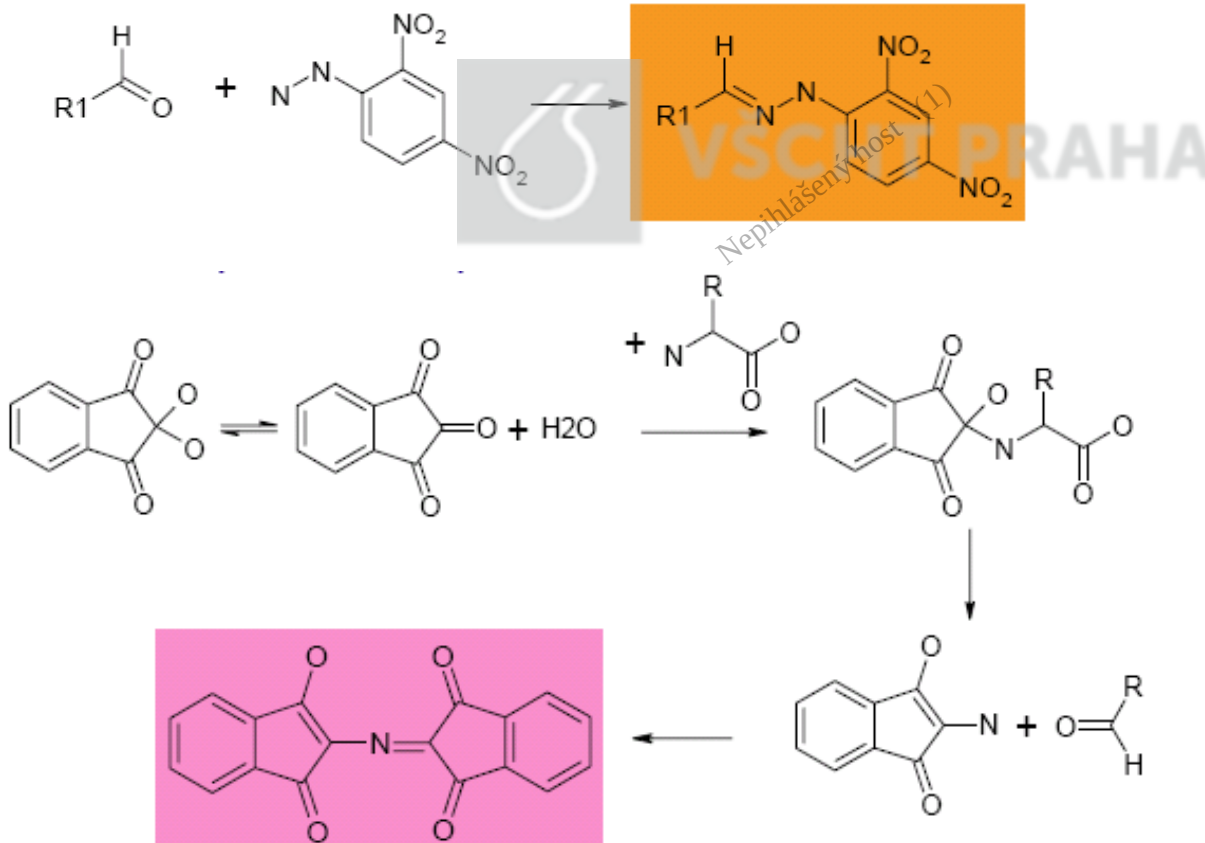
mobilní fáze: - dvou a vícesložkové systémy

běžná rozpouštědla:

- dichloromethan/hexan
- ether/hexan
- hexan/ethylacetát
- dichloromethan/methanol
- chloroform/ethanol
- chloroform/aceton

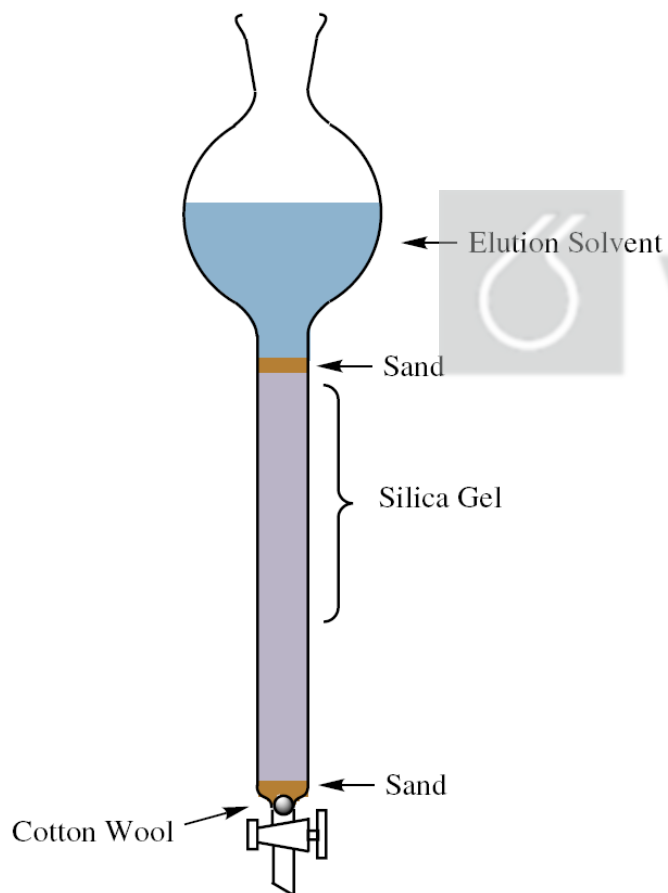
Detekce

- barevný produkt – SUPR ☺
- UV - fluoreskující látky, látky zhašející fluorescenci činidla
- vizualizace postřikem s vhodným chemickým činidlem (ninhydrin, H_2SO_4 , KMnO_4 , I_2)



„Flash“ chromatografie – použití pro purifikaci nízkomolekulárních přírodních látek a produktů organických synthes

Flash Chromatography Column



Stanovení koncentrace bílkovin

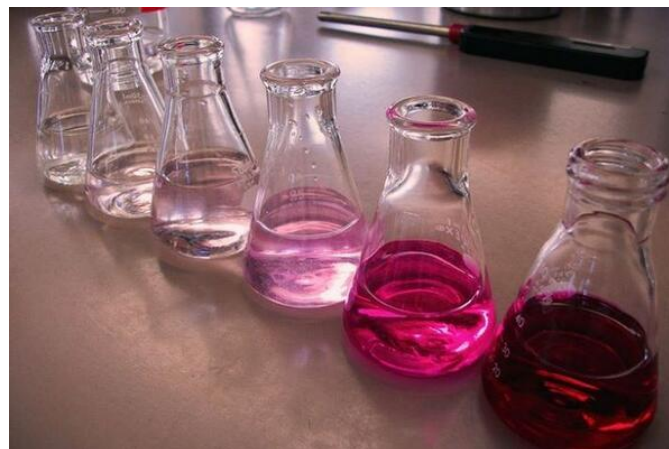


VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host (1)

Kjeldahlova metoda – stanovení N_2

- Mineralizace vzorku – převedení organického dusíku na NH_4^+
- Stanovení NH_4^+ - titrace, fotometrie, selektivní elektrody



UV spektrofotometrie

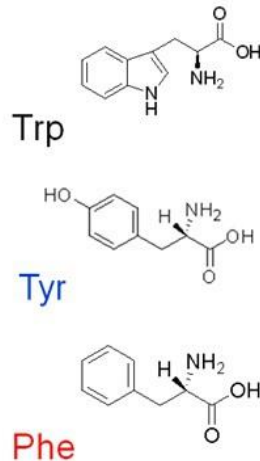
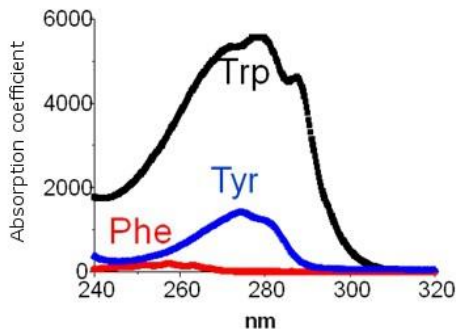


- 280 nm – aromatické AMK
interference nukleotidů
- 180 - 230 nm – peptidová vazba

$$\epsilon_{280} = (nW \times 5500) + (nY \times 1490) + (nC \times 125)$$

proteiny – $A_{280}^{1\%} \sim 4,0 - 24,0$
 $A_{280}^{1\%} = 10$

Výhody - nedestruktivní metoda



	molární ext. koef.
W, Trp	5500 M ⁻¹ cm ⁻¹
Y, Tyr	1490 M ⁻¹ cm ⁻¹
F, Phe	200 M ⁻¹ cm ⁻¹ (260 nm)
C, Cys-Cys	125 M ⁻¹ cm ⁻¹
BSA	43 824 M ⁻¹ cm ⁻¹
lysozym	38 940 M ⁻¹ cm ⁻¹
IgG	??? M ⁻¹ cm ⁻¹

Imunoglobuliny

$$A_{280}^{1\%} \sim 12 - 15$$

$$A_{280}^{0,1\%} = A_{280}^{1 \text{ mg/ml}} = 1,4$$

$$M_w = 150000 \text{ Da}$$

VIS spektrofotometrie

- Přídavek činidla → barevný derivát
- Destruktivní metody
- Nutná kalibrační závislost



Biuretová metoda

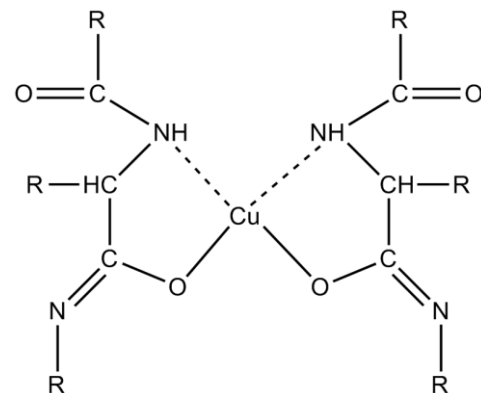
Princip:

chelatace měďnatého iontu imidovými strukturami polypeptidu ionizovanými v silně alkalickém prostředí za vzniku červeno-fialového komplexu

Činidlo obsahuje: CuSO_4 , vínan sodno-draselný a NaOH

Interference: NH_4^+ , Tris, glukosa a jiné měď redukující látky jako např. proteiny bohaté na sulfhydrylové skupiny (keratin)

Měření : 540 – 560 nm
1-10 mg/ml



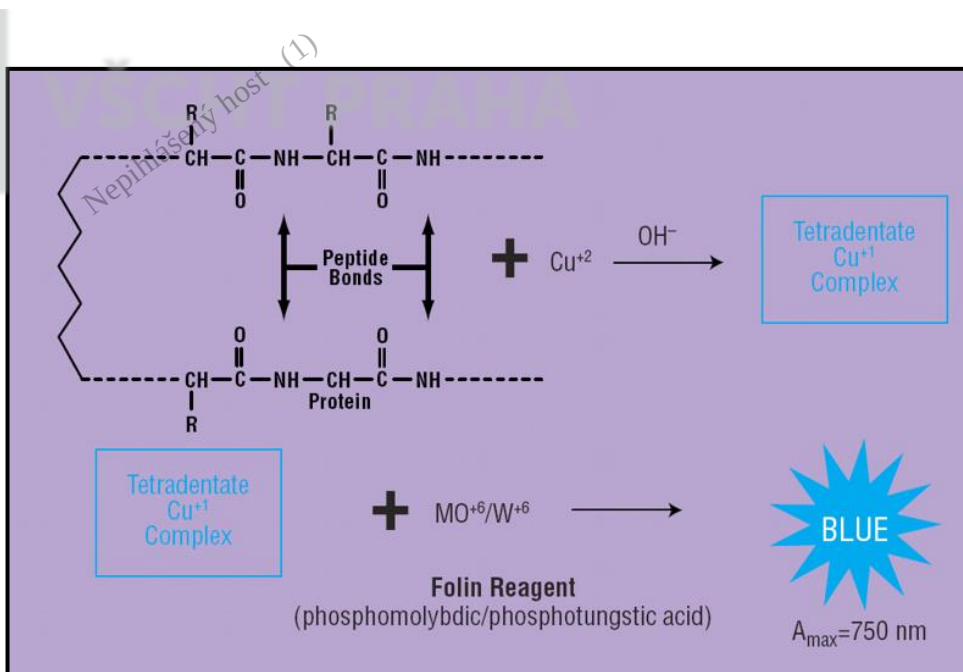
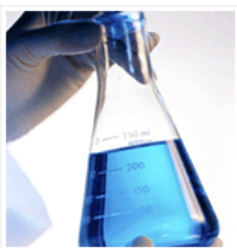
Lowryho metoda

Princip:

kombinace Folinovy a biuretové metody – přidavek Folin-Ciocalteu činidla (fosfomolybdenan a fosfowolframan), které reaguje s Cu^+ , Tyr, Trp, Cys

Měření : 720-750 nm

5-250 mg/ml



Metoda dle Bradforda

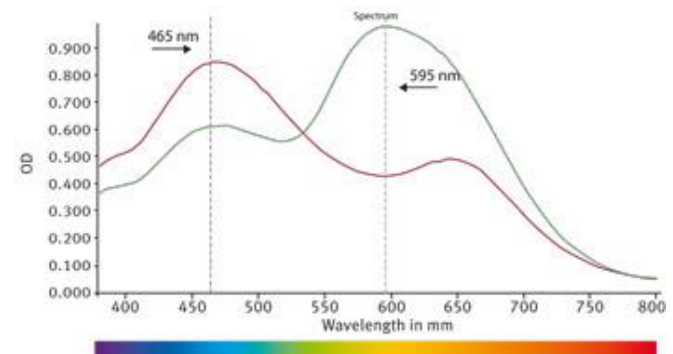
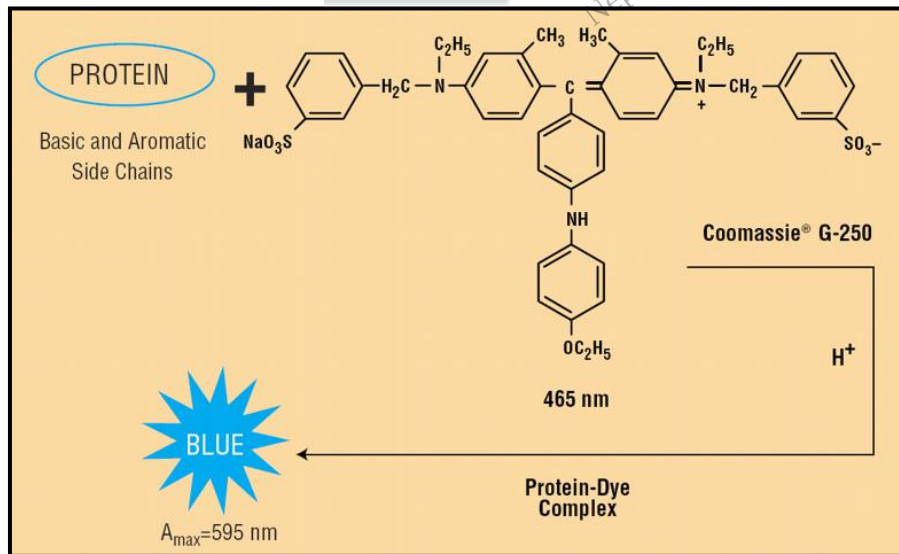
Princip:

při vazbě Coomassie Brilliant Blue G 250 na bílkovinu (Arg, His, Lys, Tyr, Trp, Phe) dochází k posunu absorpčního maxima z 465 na 595 nm
kompatibilní s redukujícími látkami

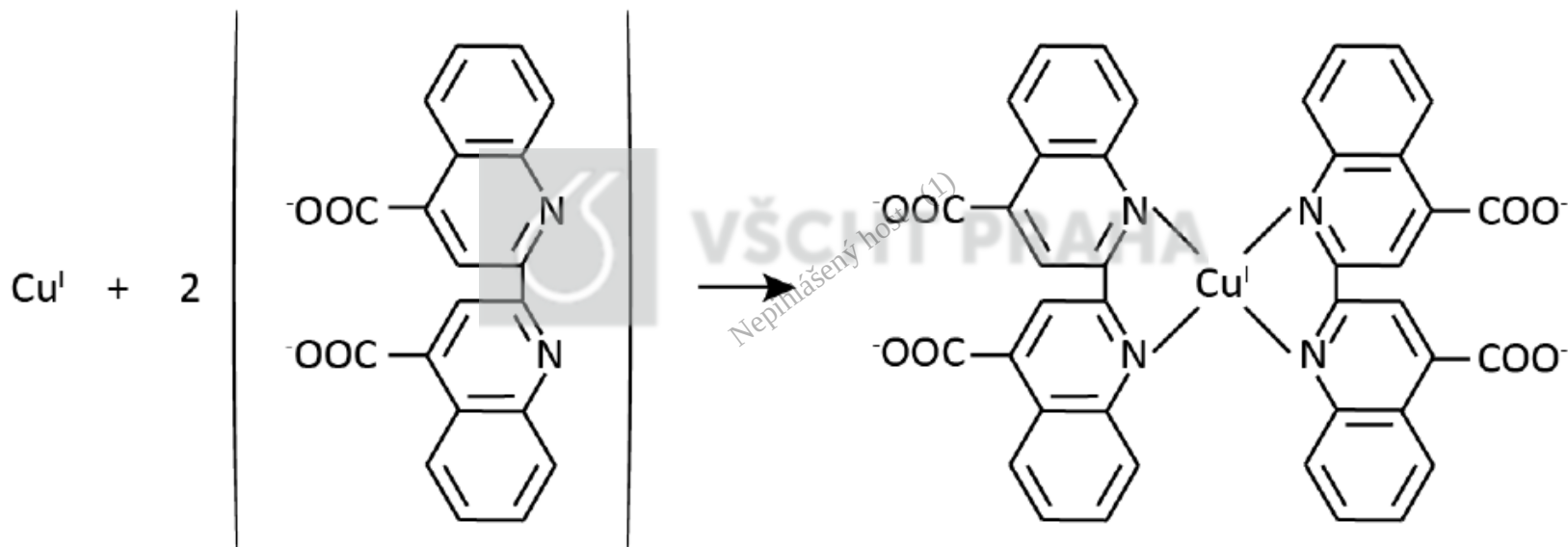
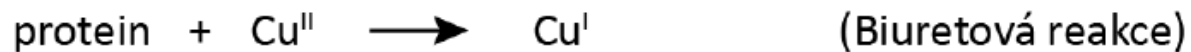
Interference: detergenty

Meření : 595 nm

1-1000 mg/ml



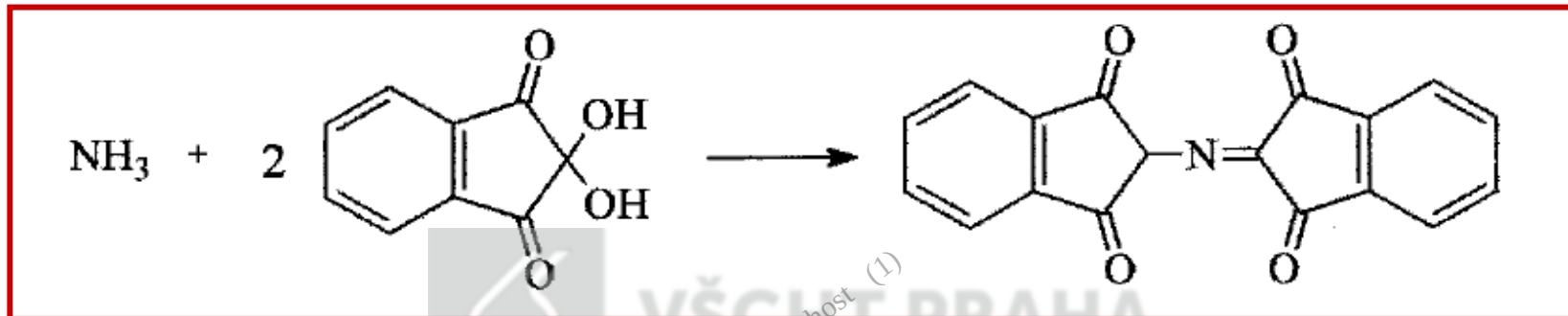
BCA metoda



Meření : 562 nm

0,4-100 mg/ml

Ninhydrinová metoda



Měření: 575 nm

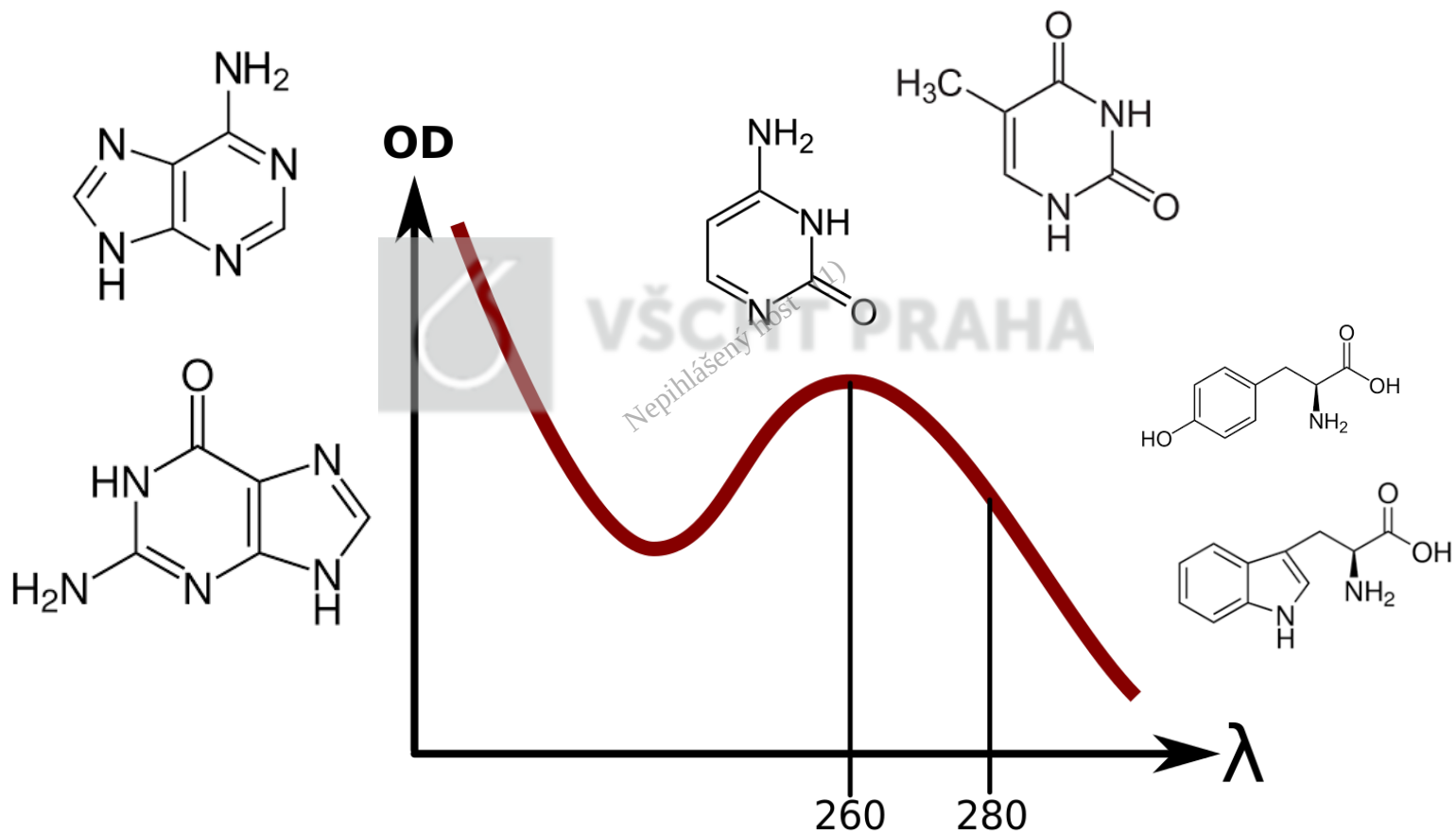
Stanovení koncentrace nukleových kyselin



VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host

Metoda měření absorbance v UV oblasti



	$\epsilon \text{ [(mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	$A_{260} \approx 1$
dsDNA	20	
ssDNA	27	
RNA	25	
oligonukleotidy	záleží na složení a délce	

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Glase, J.A. (1995) Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by A260/A280 Absorbance Ratios, Biotechniques 18:62-63.

Maniatis T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook (1982) Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, NY.

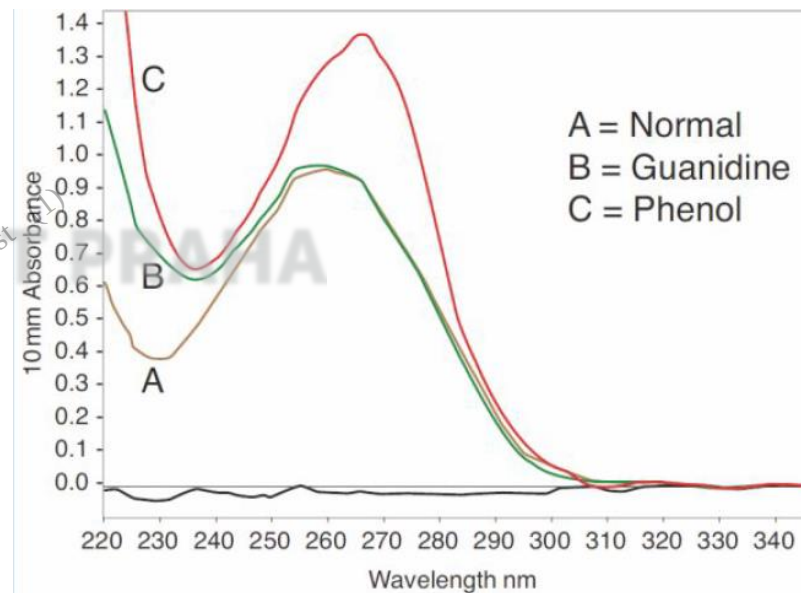
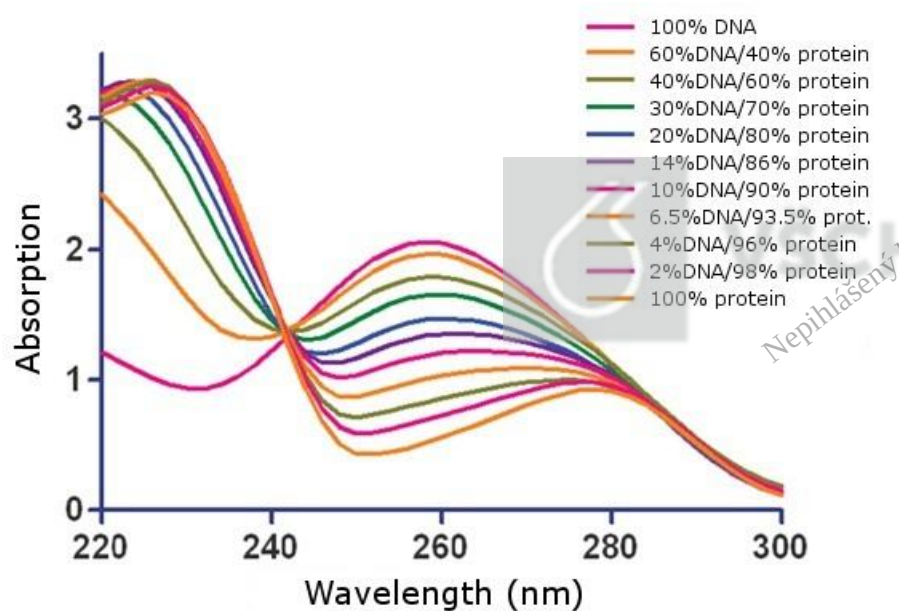
	$\epsilon \text{ [(mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	$A_{260} \approx 1$
dsDNA	20	50 $\mu\text{g/ml}$
ssDNA	27	33 $\mu\text{g/ml}$
RNA	25	40 $\mu\text{g/ml}$
oligonukleotidy	záleží na složení a délce	

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Glase, J.A. (1995) Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by A260/A280 Absorbance Ratios, Biotechniques 18:62-63.

Maniatis T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook (1982) Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, NY.

- nejčastější kontaminace: proteiny, organické látky, ...



<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch04s06.htm>

Jak posoudit čistotu DNA/RNA?

Extinční koeficienty:

	260 nm	280 nm
dsDNA	20 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	10 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
protein	0,57 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	1,00 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹

$$A_{260/280} = \frac{\epsilon_{260\text{DNA}} \cdot \% \text{DNA} + \epsilon_{260\text{prot}} \cdot \% \text{PROT}}{\epsilon_{280\text{DNA}} \cdot \% \text{DNA} + \epsilon_{280\text{prot}} \cdot \% \text{PROT}}$$

% DNA	% proteinů	A _{260/280}
100	0	
75	25	
50	50	
25	75	
0	100	

Glasel, J.A. (1995) Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by A260/A280 Absorbance Ratios, Biotechniques 18:62-63.

Maniatis T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook (1982) Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, NY.

Warburg, O. and W. Christian. 1942. Isolation and crystallization of enolase. Biochem. Z. 310:384-421.

Jak posoudit čistu DNA?

Extinční koeficienty:

	260 nm	280 nm
dsDNA	20 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	10 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
protein	0,57 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	1,00 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹

$$A_{260/280} = \frac{\epsilon_{260\text{DNA}} \cdot \% \text{DNA} + \epsilon_{260\text{prot}} \cdot \% \text{PROT}}{\epsilon_{280\text{DNA}} \cdot \% \text{DNA} + \epsilon_{280\text{prot}} \cdot \% \text{PROT}}$$

% DNA	% proteinů	A _{260/280}
100	0	2
75	25	1,95
50	50	1,87
25	75	1,67
0	100	0,57

Další ukazatel poměr 260:230

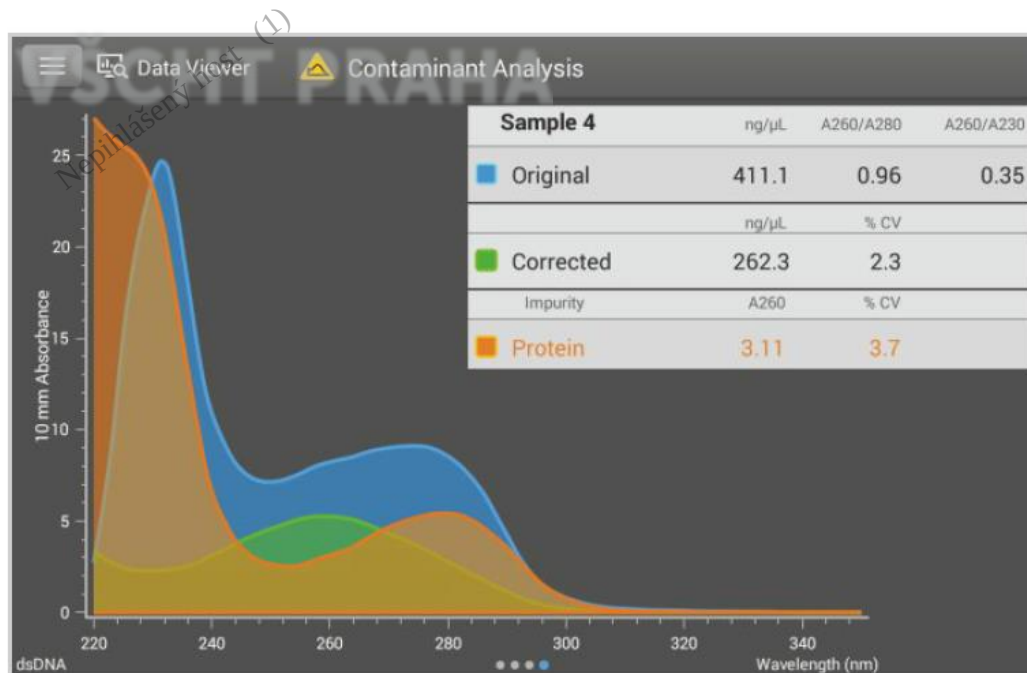
$$A_{230:260:280} \sim 1:2:1$$

Glasel, J.A. (1995) Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by A260/A280 Absorbance Ratios, Biotechniques 18:62-63.

Maniatis T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook (1982) Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, NY.

poměr A_{260}/A_{230}	•kontaminace sacharidy (častý problém u rostlin). •zbytkový fenol z extrakce •zbytkový guanidin (kity)
poměr A_{260}/A_{280}	•zbytkový fenol nebo další reagentie z purifikačního protokolu •velmi nízká koncentrace DNA (< 10 ng/ml)

NanoDrop



Jiné metody stanovení koncentrace DNA

Metoda s diaminobenzoovou kyselinou

Měření: depurinace + DABA

Měření: 420 nm

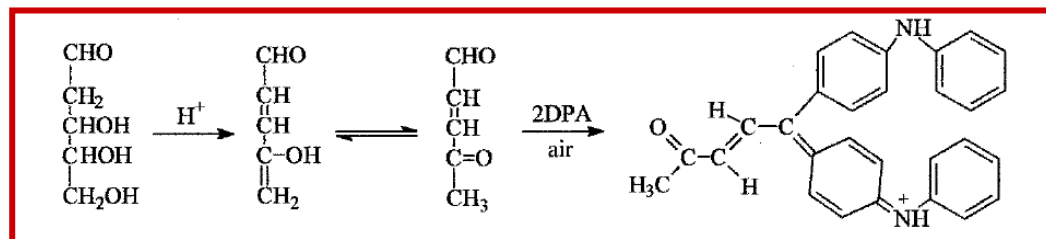
25 µg

Metoda s difenylaminem

Měření: depurinace + DPA

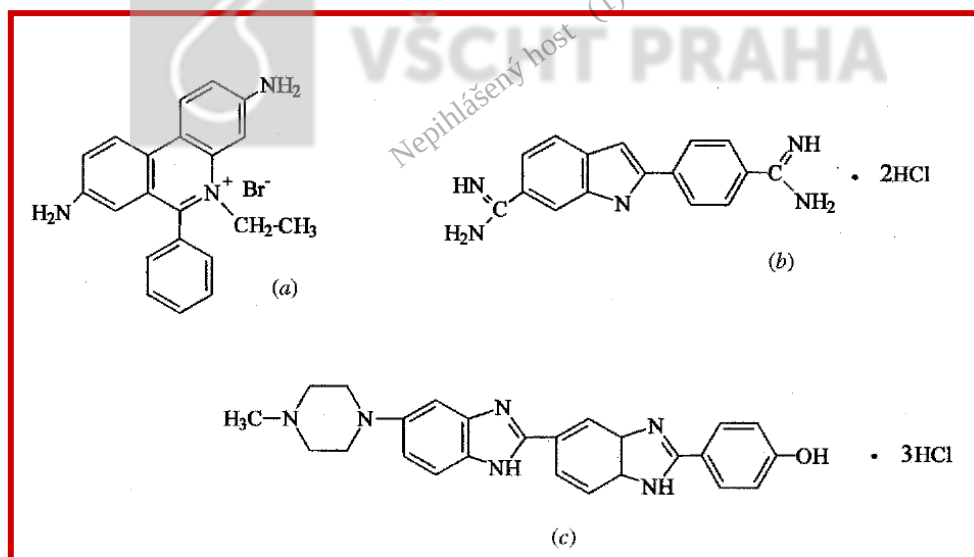
Měření: 595 nm

25 µg



Fluorescenční metody

- Ethidiumbromid
- 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI)
- 2-(2-[4-hydroxyphenyl]-6-benzimidazolyl)-6- (1-methyl-4-piperazyl)benzimidazol trihydrochlorid (Hoechst 33258)



Jiné metody stanovení koncentrace DNA

Metoda s orcinolem

Princip: depurinace + reakce s orcinolem

Měření: 660 nm

