

Izolace, separace a detekce proteinů a nukleových kyselin a jejich význam

VOJTĚCH ADAM

Mendelova
univerzita
v Brně



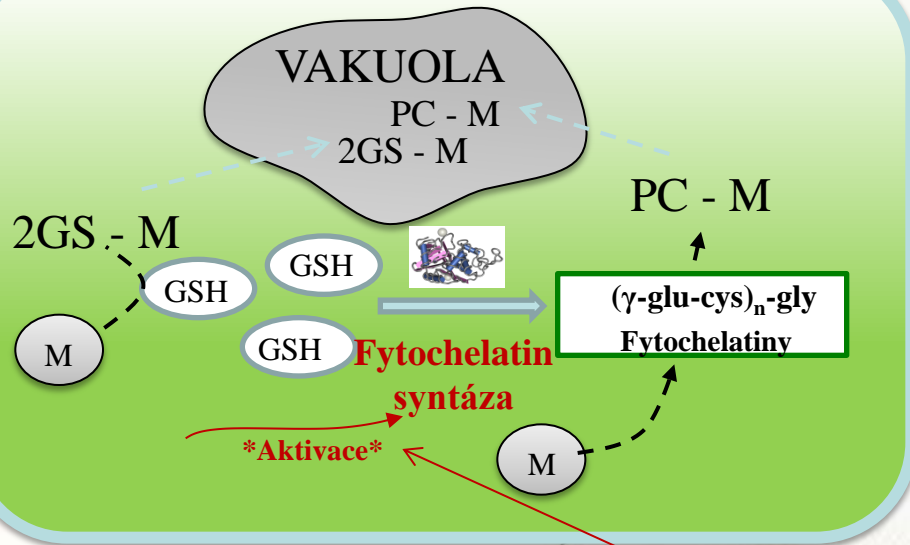
Agromomická
fakulta

Životní prostředí

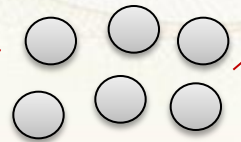
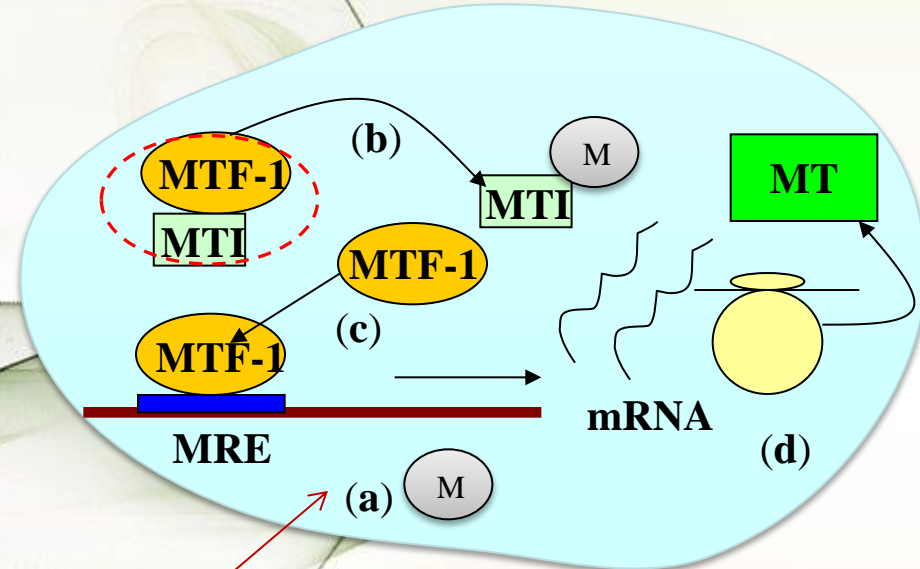


Obranné mechanismy

Rostlinná buňka



Živočišná buňka



Ionty kovů (M)

I. Genová exprese

II. Rostlinné obranné mechanismy

III. Živočišné obranné mechanismy

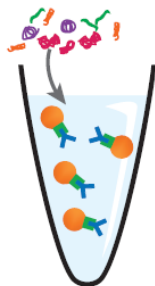
I. Genová exprese

II. Rostlinné obranné mechanismy

III. Živočišné obranné mechanismy

Pokročilé materiály v izolaci nukleových kyselin

A. Přidání vzorku



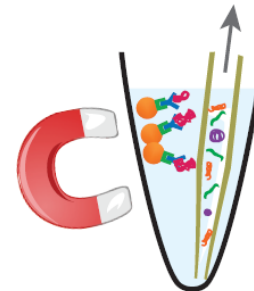
B. Izolace nukleové kyseliny



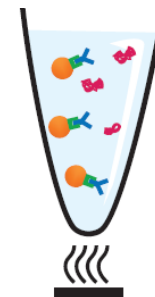
C. Separace pomocí magnetu



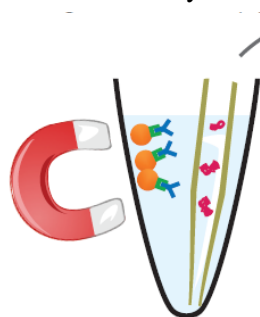
D. Promývání



E. Ohřev 85°C



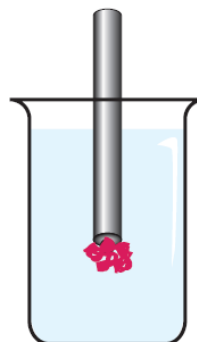
F. Získání cílové molekuly



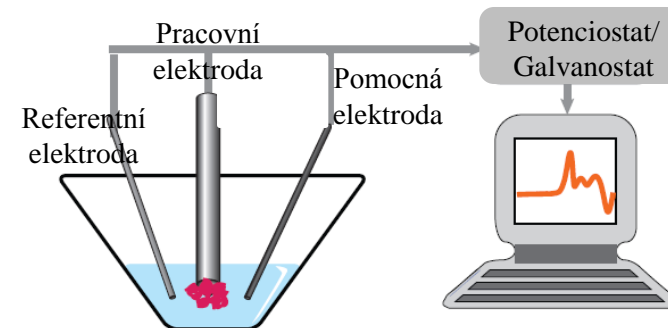
G. Adsorpce na povrch molekuly



H. Promytí



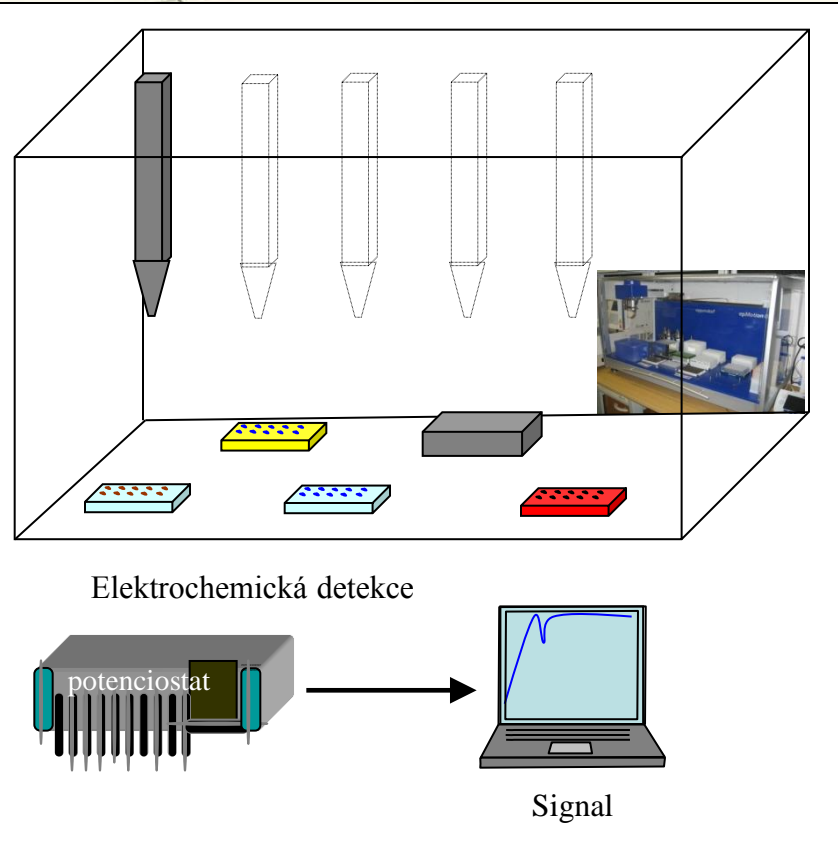
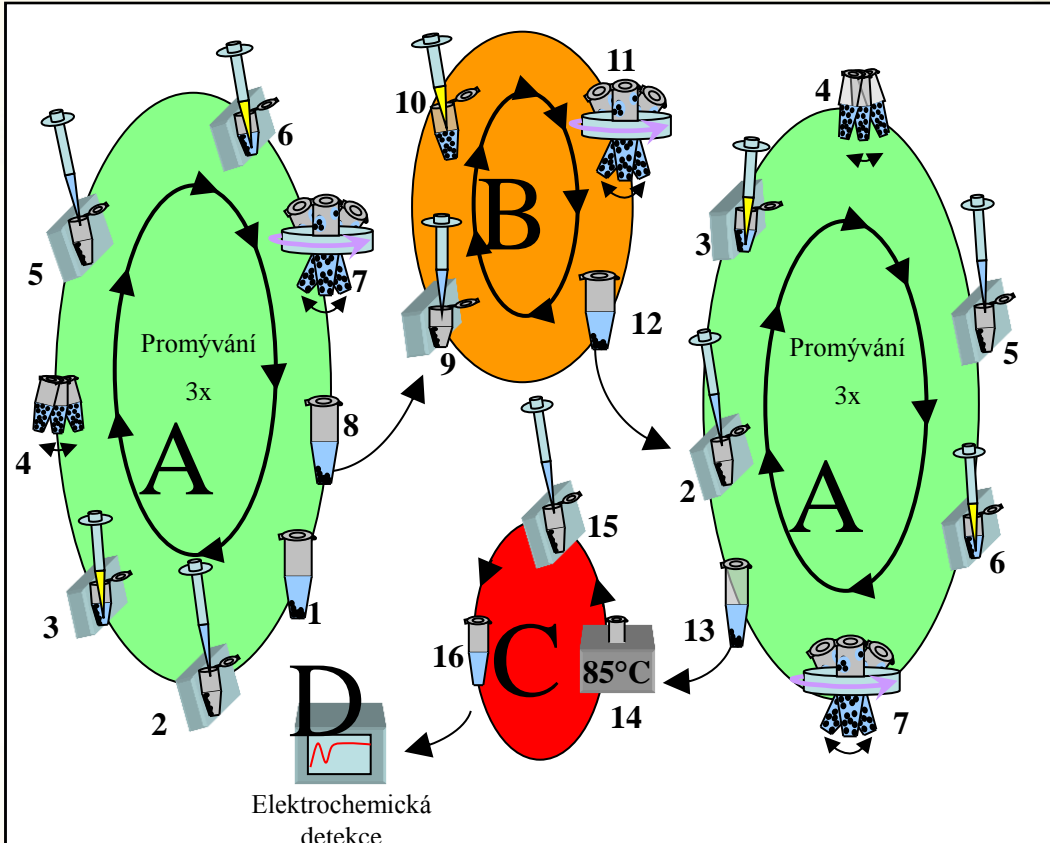
I. Měření



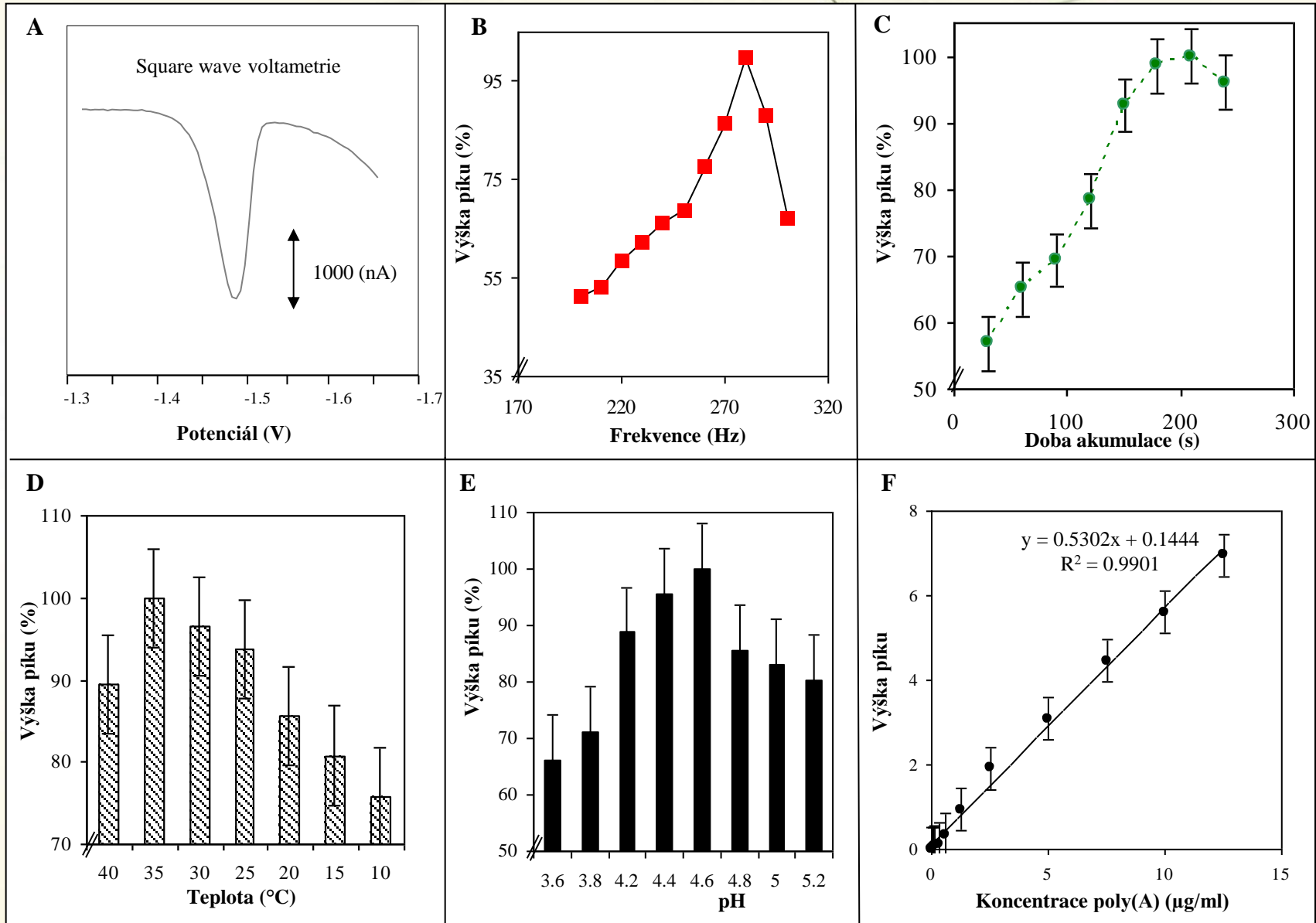
Izolace nukleových kyselin

Poloautomatická

Automatická

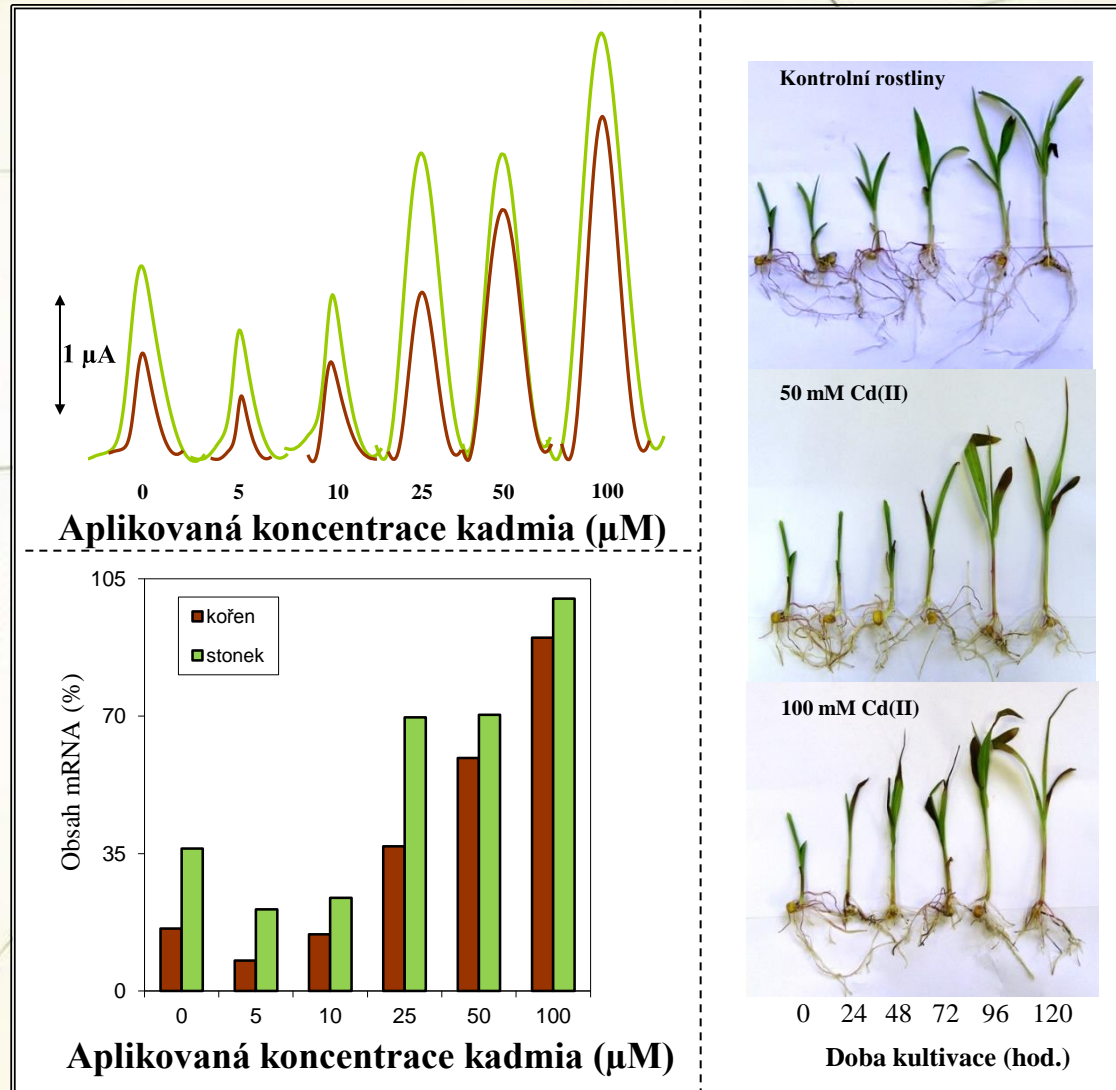


Optimalizace elektrochemické detekce nukleových kyselin



Je separace založená na paramagnetických částicích v kombinaci s elektrochemickou detekcí využitelná pro analýzu reálných vzorků?

Izolace mRNA z reálného vzorku

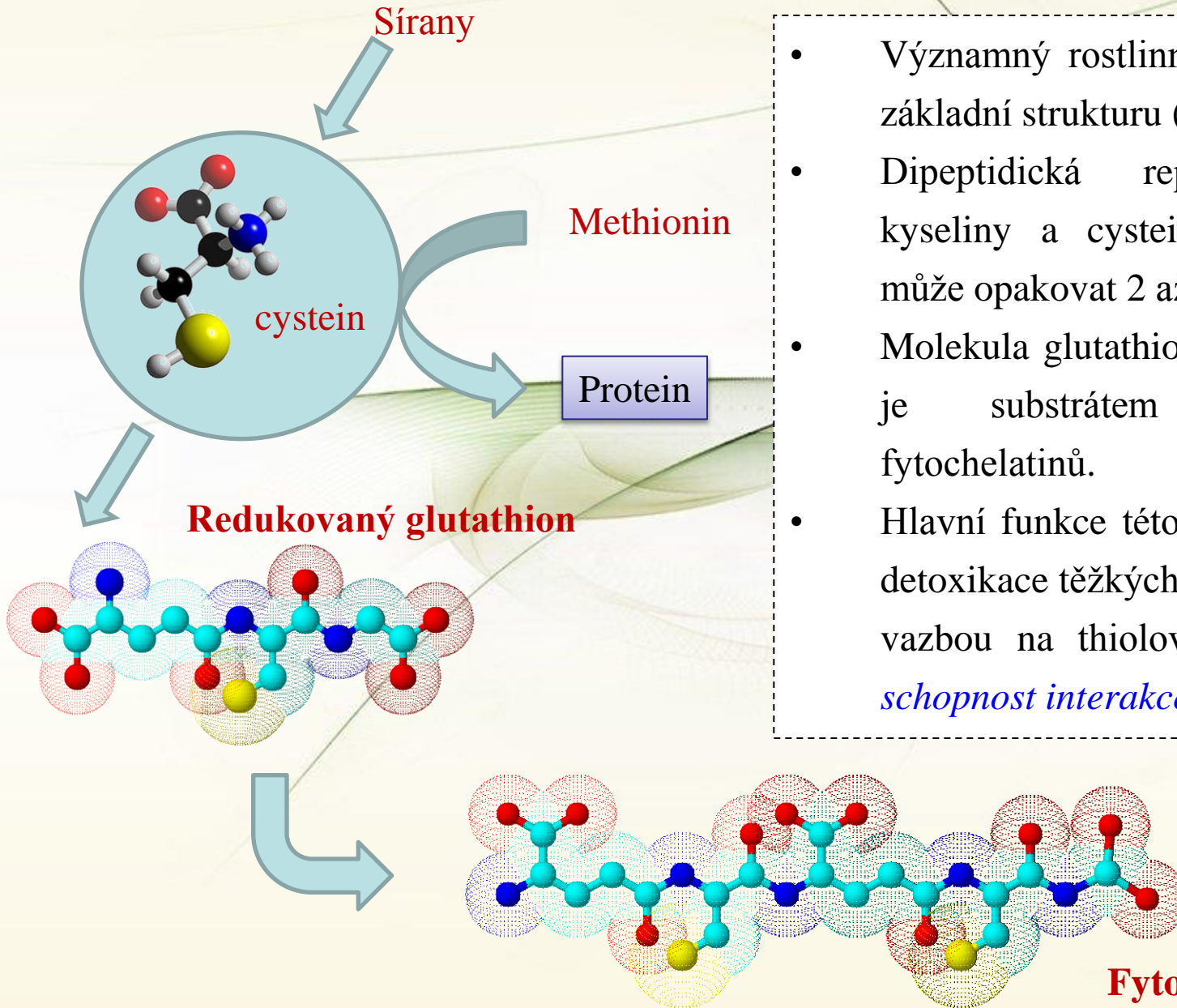


I. Genová exprese

II. Rostlinné obranné mechanismy

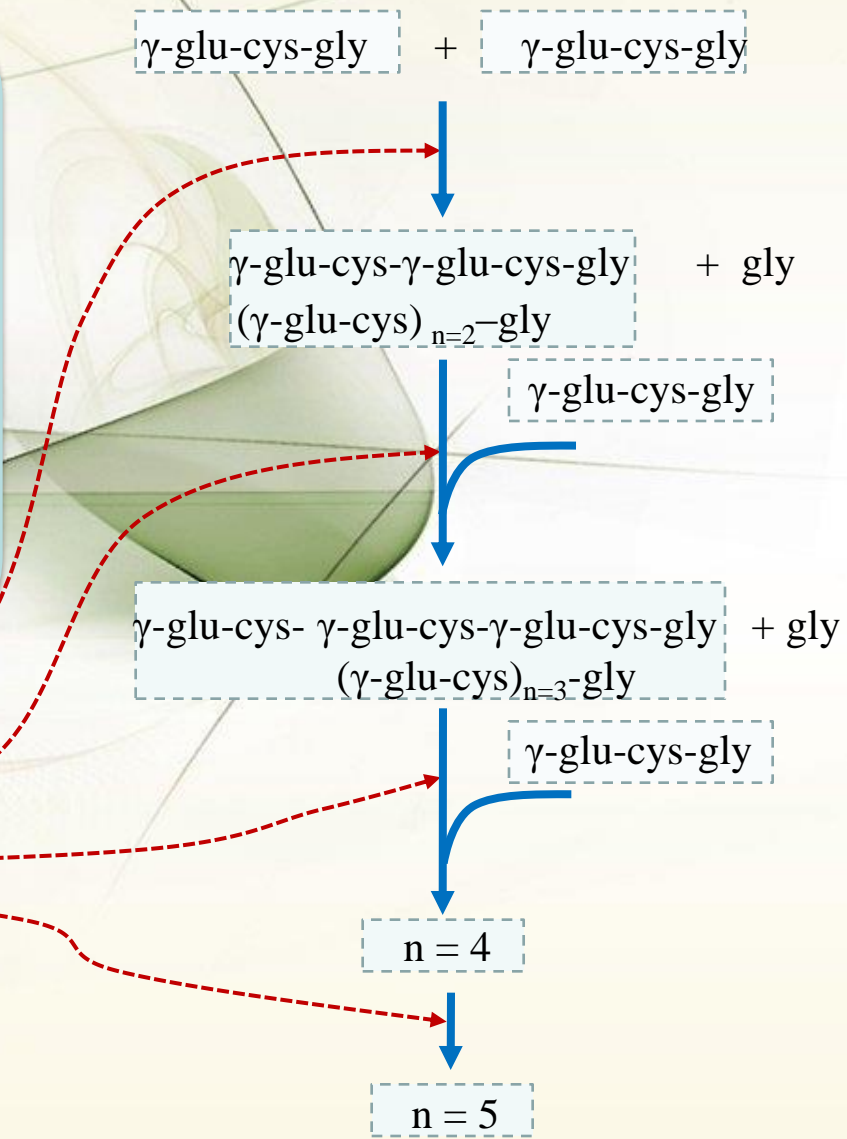
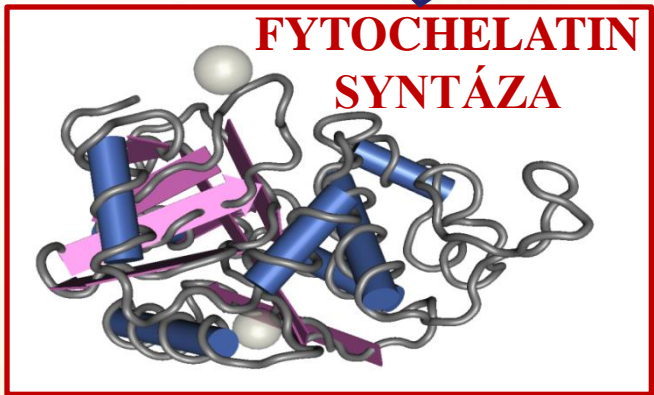
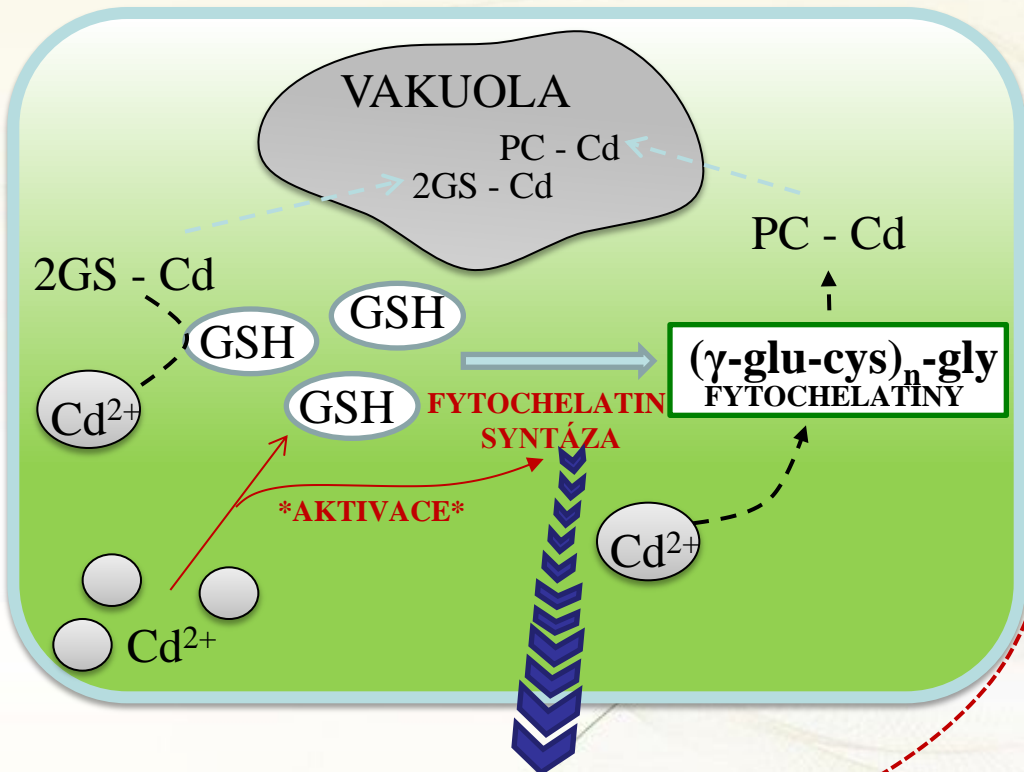
III. Živočišné obranné mechanismy

Fytochelatiny



- Významný rostlinný peptid, který má základní strukturu $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$.
- Dipeptidická repetice glutamové kyseliny a cysteinu ($\gamma\text{-Glu-Cys}$) se může opakovat 2 až 11krát.
- Molekula glutathionu ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) je substrátem pro syntézu fytochelatinů.
- Hlavní funkce této skupiny peptidů je detoxikace těžkých kovů, která probíhá vazbou na thiolové skupiny peptidu *schopnost interakce*.

Fytochelatin syntáza



Jak komplexně hodnotit reakci rostliny na přítomnost těžkého kovu?

Tabáková BY-2 buněčná line

Kultivace BY-2 buněk s přidavkem různých koncentrací Cd(II) iontů během třídní kultivace v tekutém médiu Murashige and Skoog.

0 μM



5 μM



10 μM



25 μM



50 μM

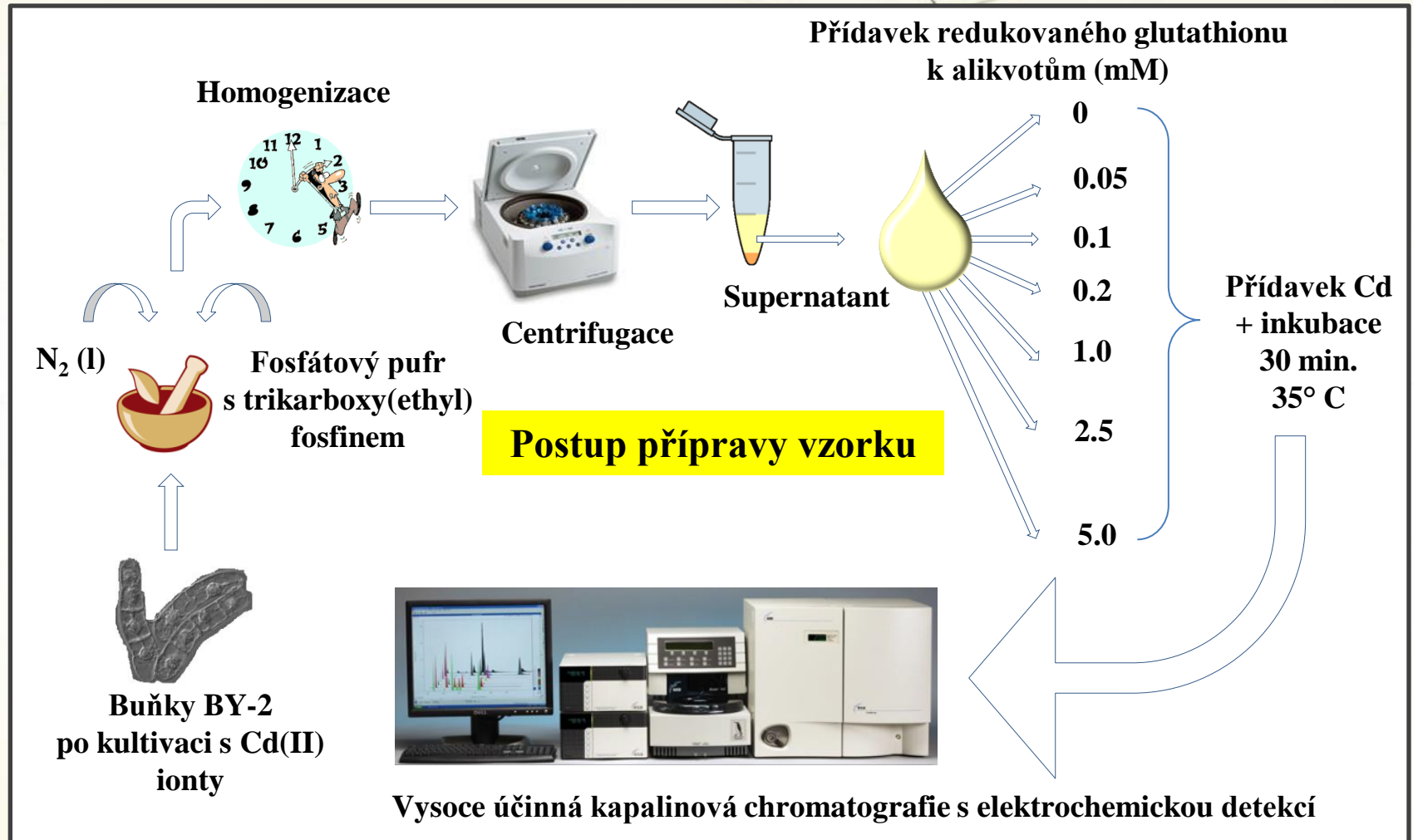


100 μM

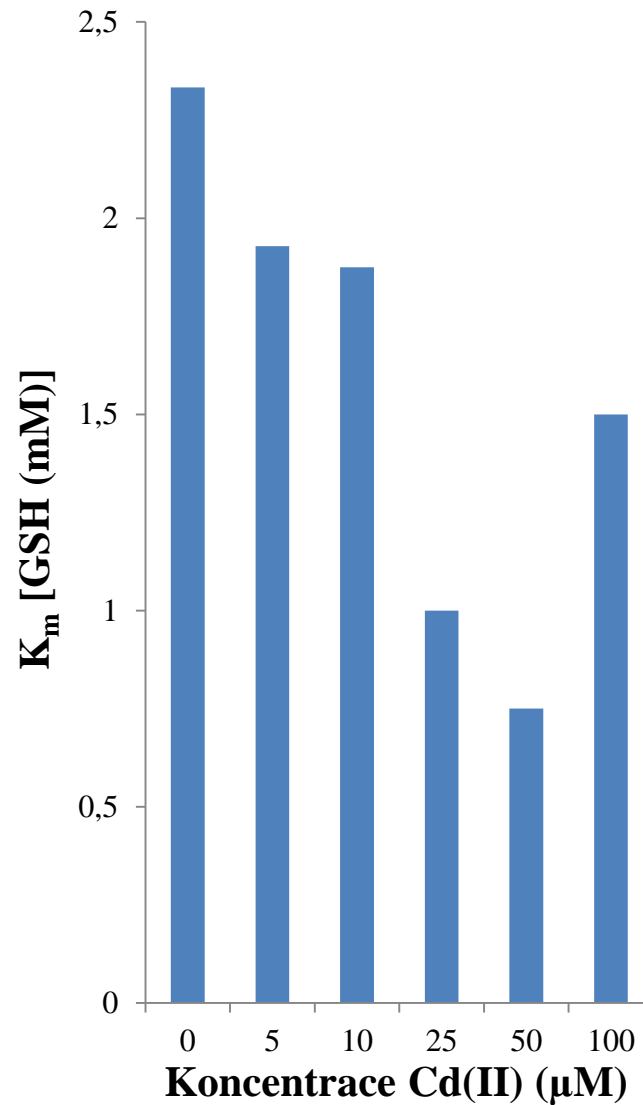


- **Životnost buněk** – stanovena pomocí esterázové aktivity
- **Celkový obsah Cd(II) v BY-2 buňkách** – stanoven pomocí diferenční pulzní voltametrie
- **Obsah fytochelatinu2 jako produktu fytochelatin syntázy** – stanoven pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí

Aktivace fytochelatin syntázy



K_m fytochelatin syntázy



Obsah

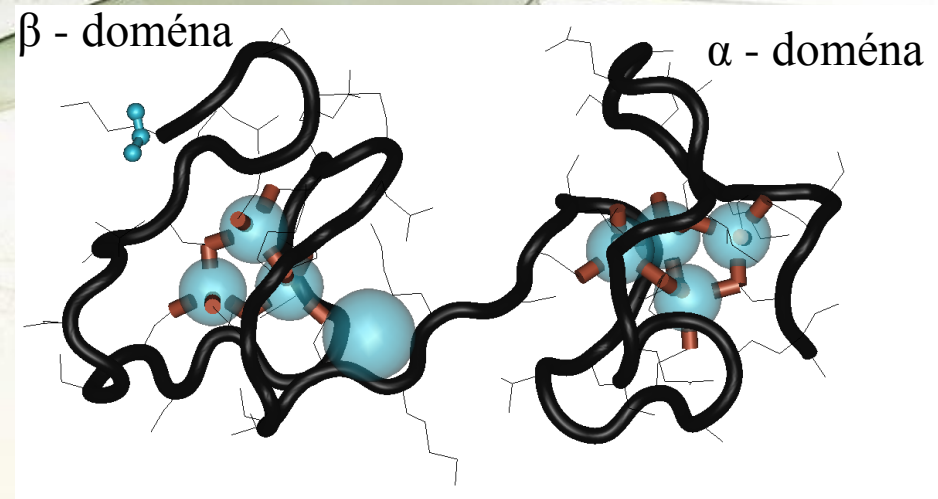
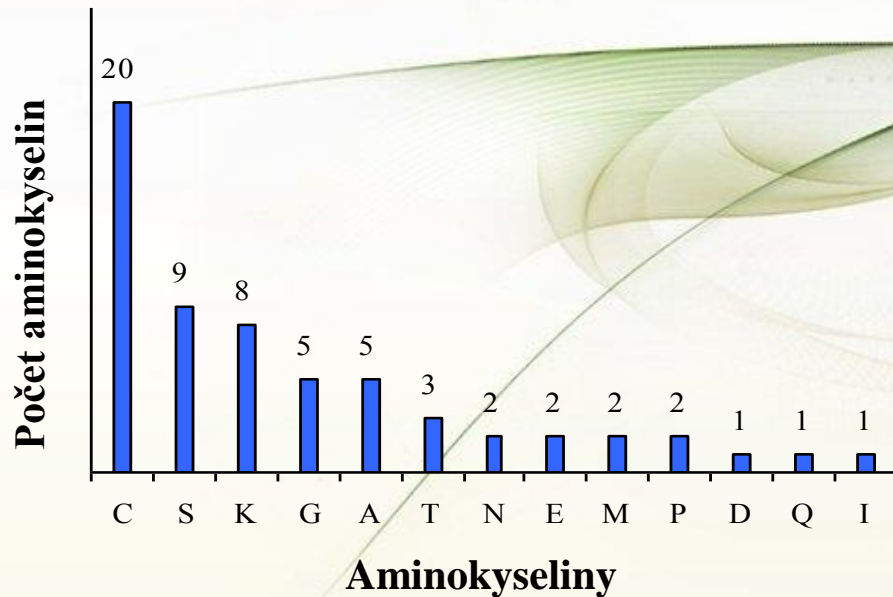
I. Genová exprese

II. Rostlinné obranné mechanismy

III. Živočišné obranné mechanismy

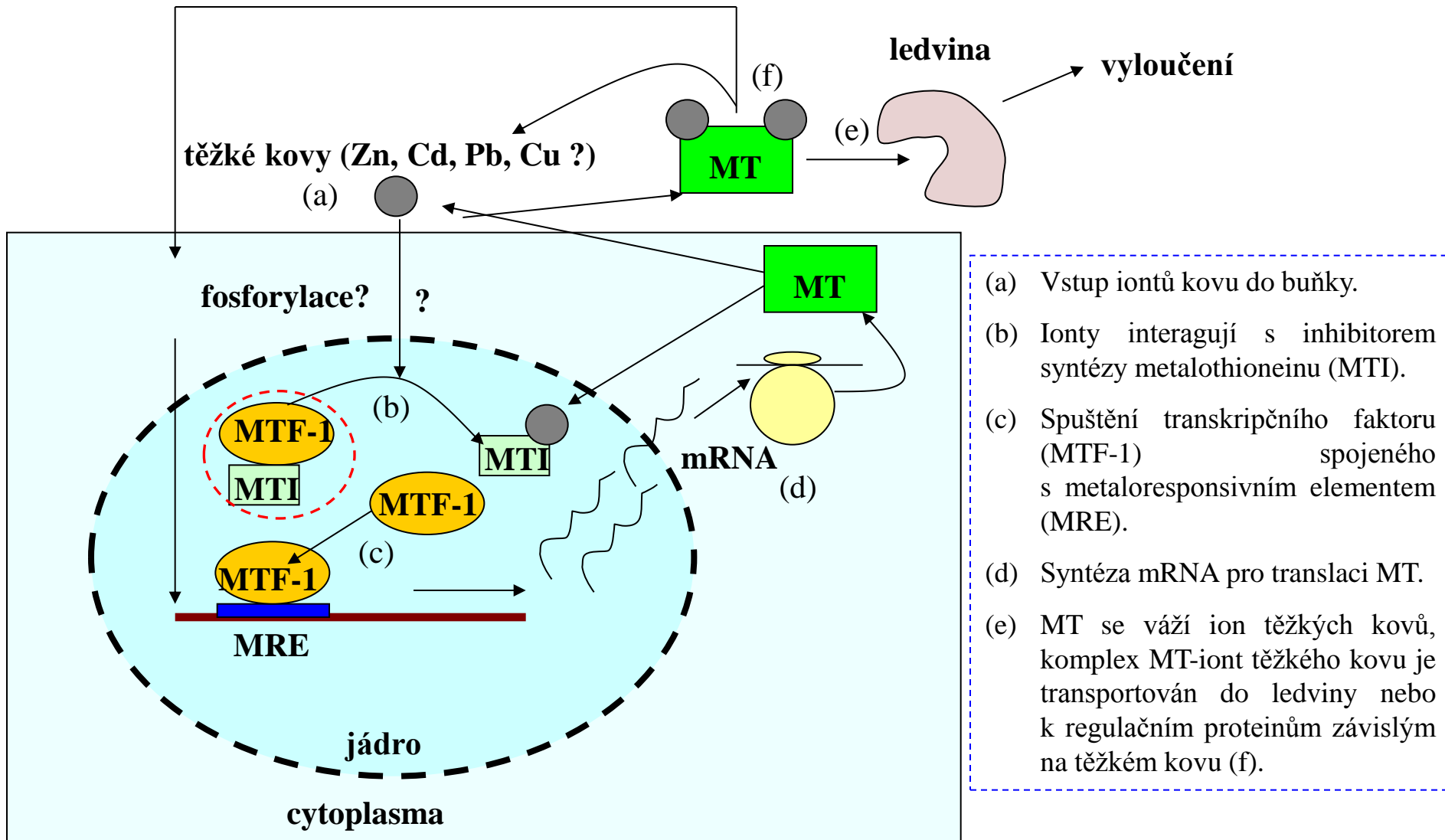
Metalothionein – protein

- Intracelulárny, nízkomolekulárny, na cystein veľmi bohatý protein (6 – 10 kDa).
- Metalothionein sa skladá ze dvoch vazebných domén – α a β .
- N-terminálna časť peptidu – β -doména; tri vazebné miesta pre dvojvalentné ióny.
- C-terminálna časť peptidu – α -doména; štyri vazebné miesta pre dvojvalentné ióny kovů.
- Najčastejšia repetícia: cystein(C)–serin(S)–cystein(C).



(C – cystein, S – serin, K – lysin, G – glycin, A – alanin, T – threonin, N – asparagin, E – kyselina glutamová, M – methionin, P – prolin, D – kyselina asparagová, Q – glutamin, I – isoleucin)

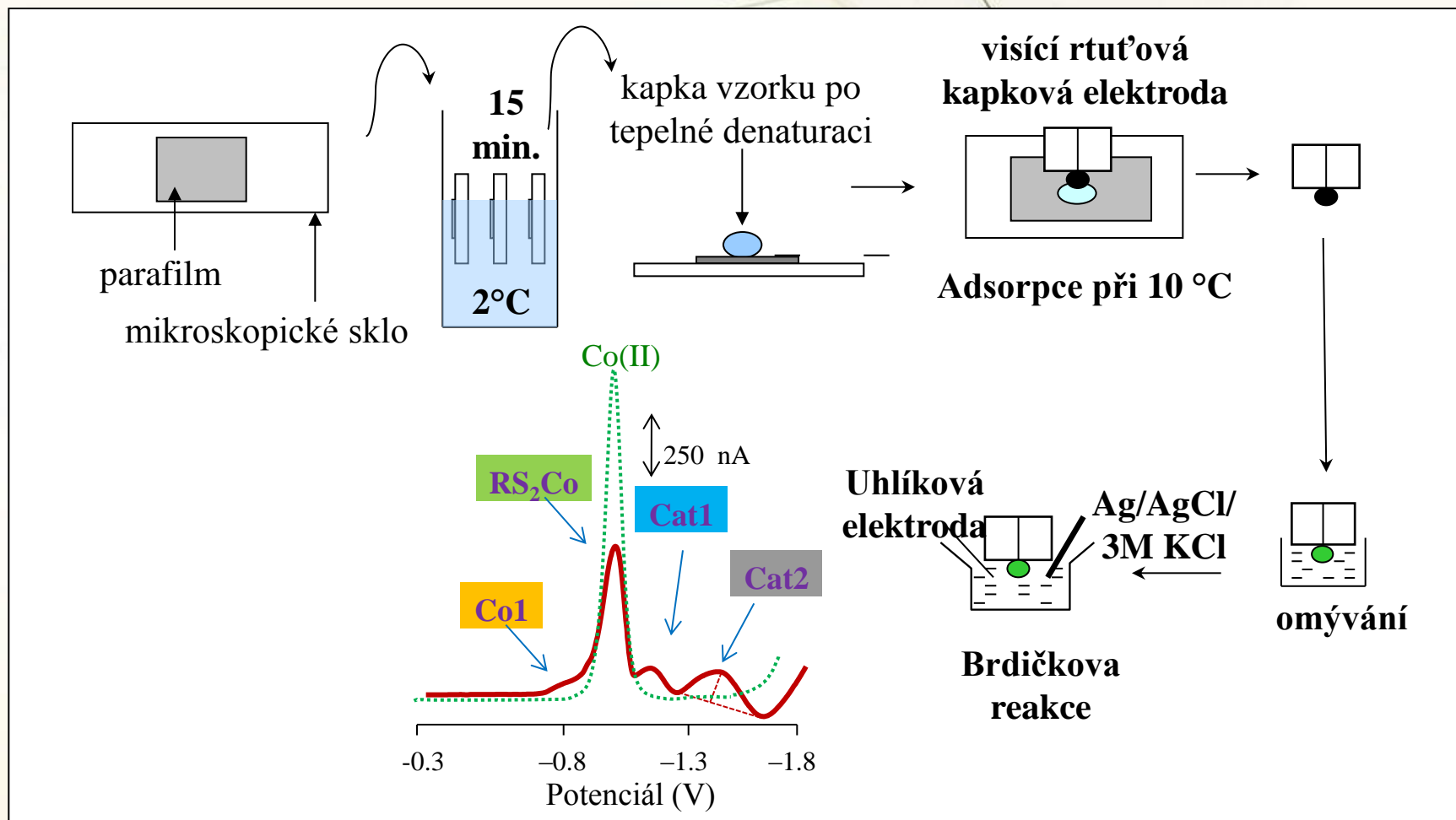
Detoxikace těžkých kovů



- (a) Vstup iontů kovu do buňky.
- (b) Ionty interagují s inhibítorem syntézy metalothioneinu (MTI).
- (c) Spuštění transkripčního faktoru (MTF-1) spojeného s metaloresponsivním elementem (MRE).
- (d) Syntéza mRNA pro translaci MT.
- (e) MT se váží ion těžkých kovů, komplex MT-iont těžkého kovu je transportován do ledviny nebo k regulačním proteinům závislým na těžkém kovu (f).

Jak studovat úlohu tohoto proteinu v buňce?

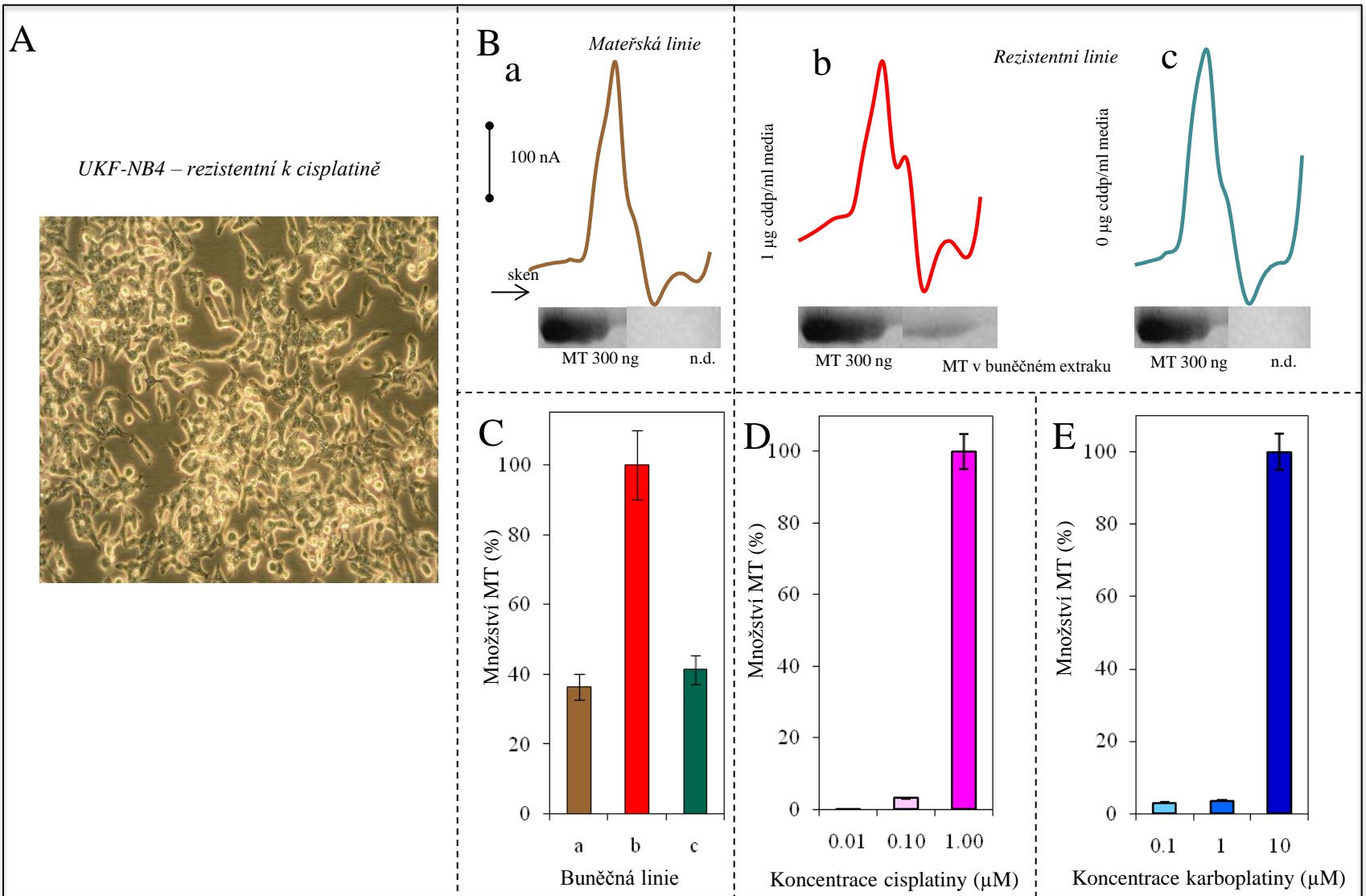
Tepelná denaturace a přenosová technika



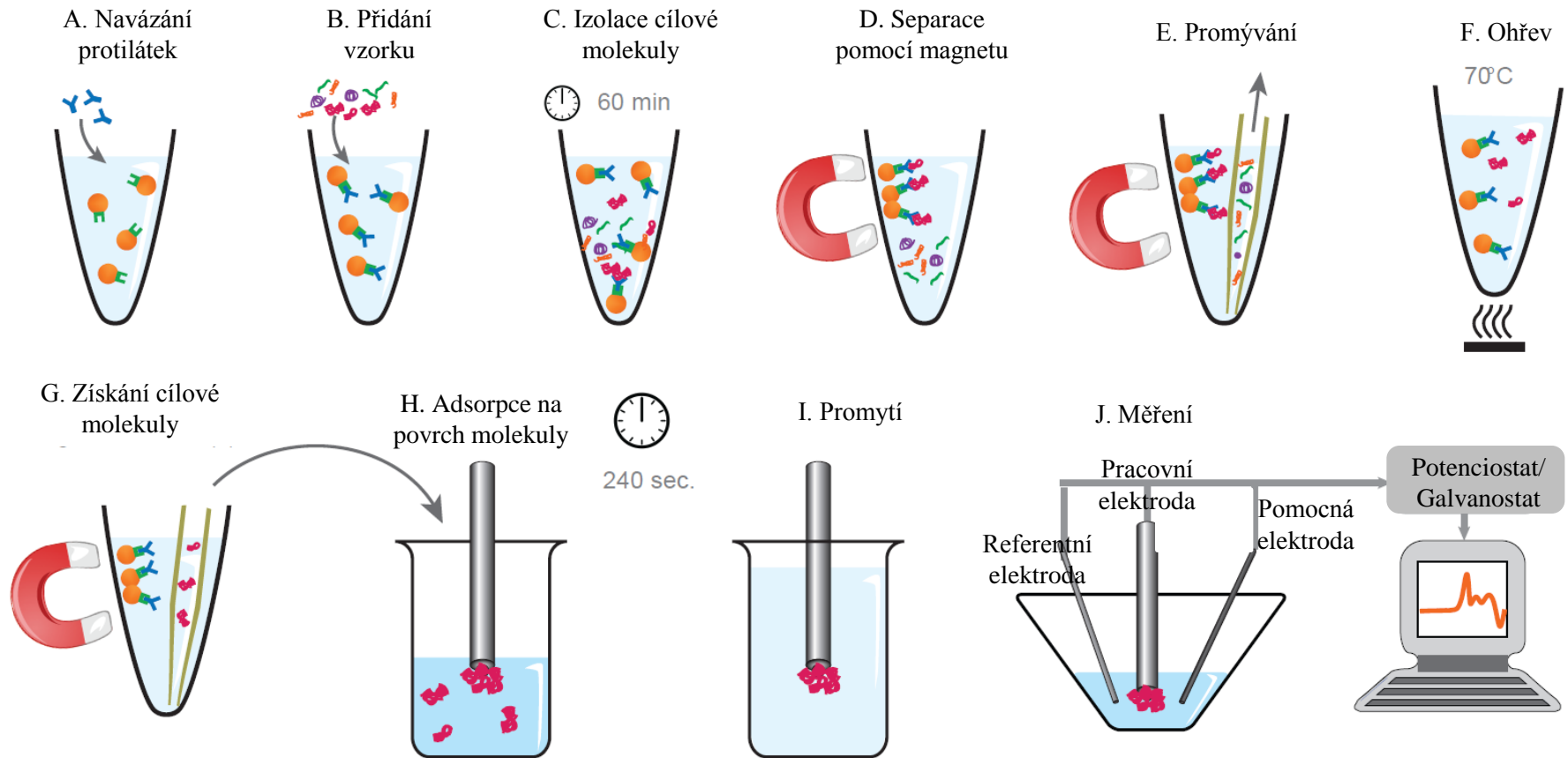
J. Petrlova, et al. (2006) *Electrochim. Acta*, 51, 5112-5119.

V. Adam, et al. (2008) *Sensors*, 8, 2293-2305.

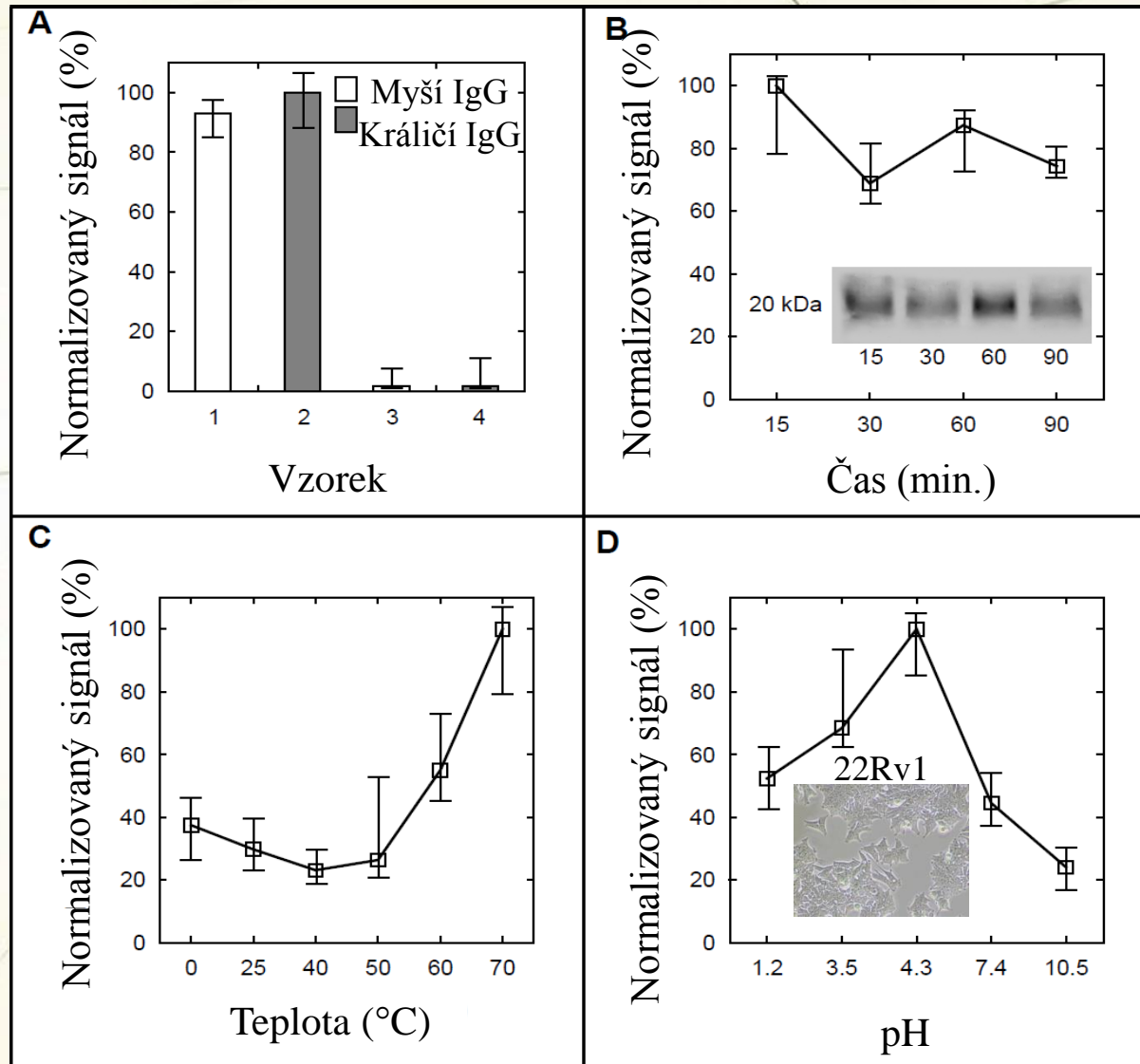
Cisplatina a buněčné linie



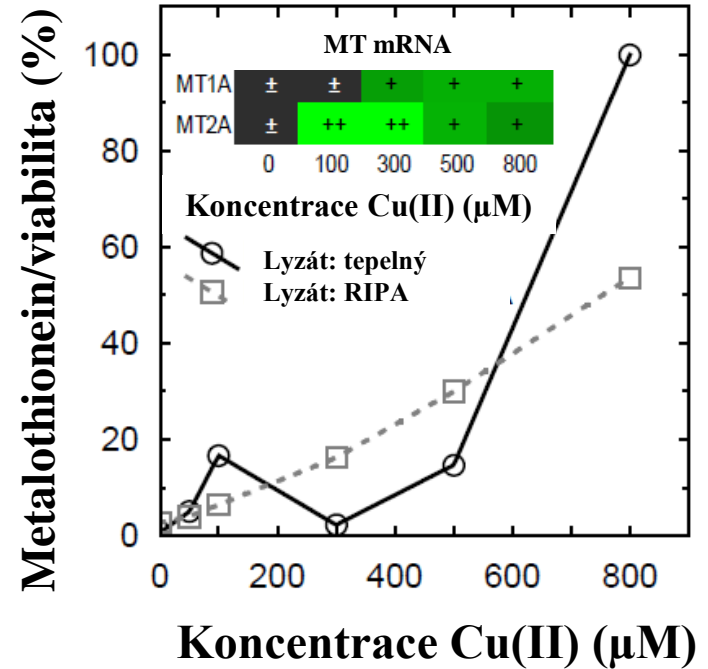
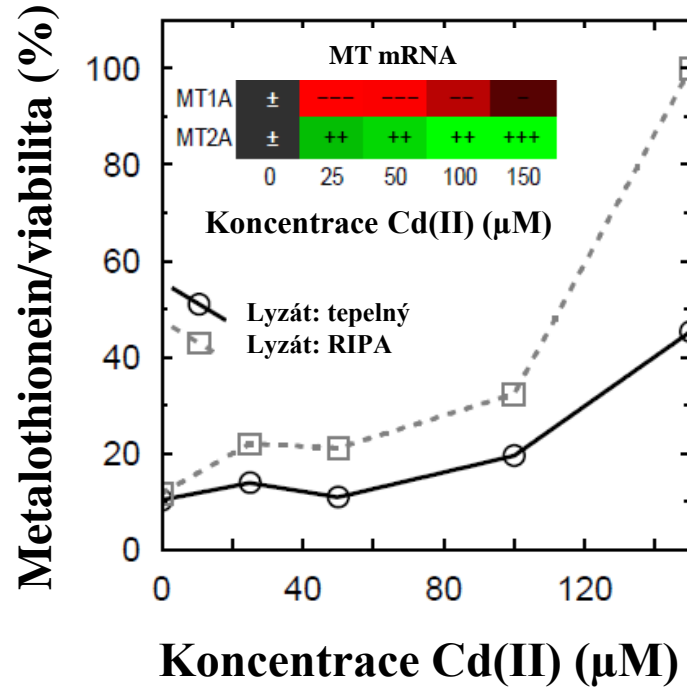
Pokročilé materiály v izolaci metalothioneinu



Optimalizace postupu izolace



Analýza prostatické buněčné linie 22Rv1



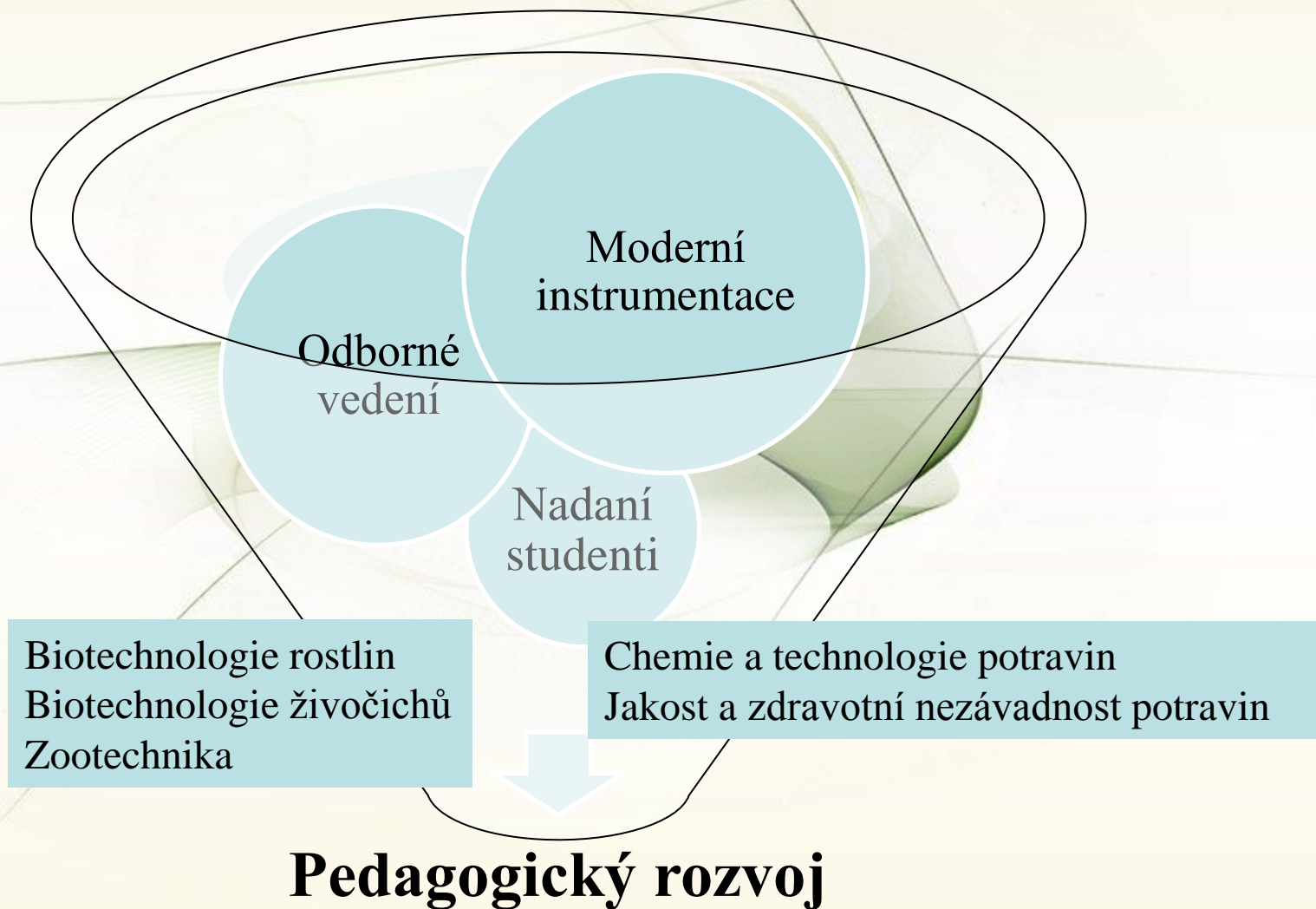
Shrnutí

- ✓ Multi-instrumentální přístup
- ✓ Nové materiály založené na nanotechnologiích
- ✓ *In situ* a on line detekce
- ✓ Praktické aplikace

Pedagogický rozvoj oborů vyučovaných na Agronomické fakultě

- ✓ Využití moderní a robustní analytické, biochemické a biologické instrumentace v základní výuce Anorganické a Analytické chemie a Biochemie.
- ✓ Unikátní přístroje ve specializovaných chemických a biochemických předmětech (Bioanalytická chemie, Biotechnologie životního prostředí, Biosenzory, Biochemické pokročilé praktikum).
- ✓ Bakalářské a diplomové práce.

Pedagogický rozvoj oborů vyučovaných na Agronomické fakultě



Pedagogický rozvoj oboru Zemědělská chemie na Agronomické fakultě

Výchova mladých vědeckých pracovníků

- ✓ Rozvoj izolačních a separačních postupů založených na pokročilých materiálech.
- ✓ Lab-on-chip technologie, aplikace *in situ*.
- ✓ Praktická aplikace, studium biochemických procesů v organismech všech úrovní.

Vědecký rozvoj oboru Zemědělská chemie na Agronomické fakultě

Základní výzkum (grantové projekty národní i evropské)

GA ČR 522/07/0692 „Studium tvorby thiolových sloučenin u rostlin –
uplatnění při remediačních technologiích“

EU 7H10021 „MAS, Nanoelectronics for mobile AAL-Systems“

Zemědělská chemie

Aplikovaný výzkum

NAZV QI91A032 „Výběr
rezistentních genotypů meruněk
k PPV s tržní kvalitou plodů“

Zahraniční spolupráce

John Innes Institute (Prof. Kopřiva)
The estación experimental del
Zaidín (Dr. Ferrol)

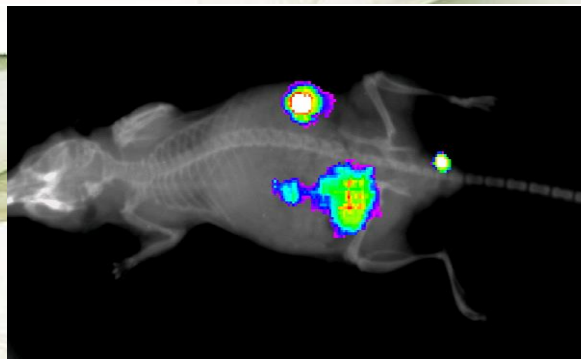
Pedagogický a vědecký rozvoj oboru Zemědělská chemie na Agronomické fakultě

In vivo zobrazovací technologie

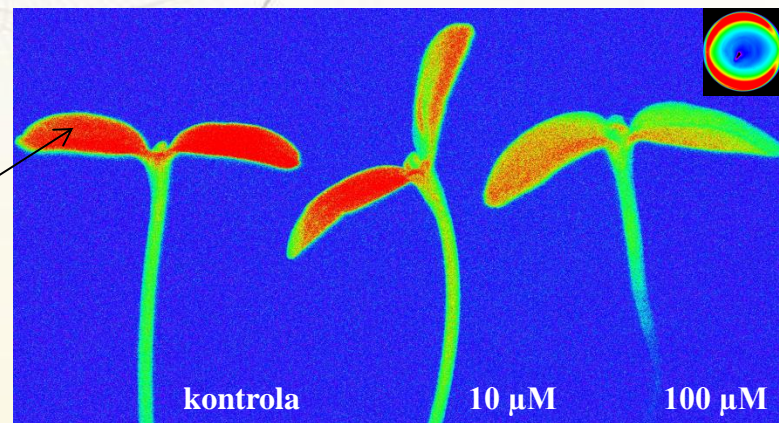


<http://www.carestream.com>

Kvantová tečka – quantum dot, ohraničená oblast polovodiče o průměru kolem 30 nm a výšce 8 nm, schopná v důsledku nižší energie ve srovnání s energií vodivostního pásu okolního polovodiče vázat elektrony. **Důležitou vlastností je také optická schopnost teček se zabarvovat.**



Intenzita signálu > 100 000
Excitace (440 nm), Emise (790 nm)



PODĚKOVÁNÍ



Agronomická
fakulta





PODĚKOVÁNÍ



Laboratoř metalomiky a nanotechnologií

Prosinec 2005



Červen 2007



Duben 2008



Duben 2006

Listopad 2007



Září 2010



Květen 2011



Březen 2009



Děkuji za pozornost

