

## Metody analýzy proteomu

### Dvourozměrná elektroforéza cytoplasmatických bílkovin

Dvourozměrná elektroforéza (2D-PAGE) představuje základní nástroj v novém rozvíjejícím se směru proteomiky. Umožňuje rozdělení komplikovaných směsí stovek různých bílkovin. Je kombinací isoelektrické fokusace (IEF) a elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Obě separace se provádějí postupně tak, že nejprve se provede isoelektrická fokusace na proužku gelu s imobilisovaným pH gradientem (IPG), kdy se bílkoviny rozdělí podle svých isoelektrických bodů (pI). Poté se připraví polyakrylamidový gel s přídavkem dodecylsulfátu sodného (SDS), na jehož startovní stranu se těsně přiloží proužek IPG a po zalití spojovacím gelem (obvykle agarosa) se provede elektroforéza ve směru kolmém na původní směr IEF. Bílkoviny se zde rozdělí podle svých  $M_r$ . Po jejím ukončení se gel obarví na bílkoviny a získá se dvourozměrný obraz sestávající z více či méně dobře oddělených skvrn představujících jednotlivé bílkoviny. Spolu se vzorkem je možno ve 2. směru (SDS-PAGE) dělit standardní směs bílkovin o známých  $M_r$  a okalibrovat gel tímto parametrem. Tak můžeme každou skvrnu charakterisovat podle její polohy jak jejím pI tak  $M_r$ .

**Pozor! Všechny laboratorní kroky počínaje přípravou extrakční směsi provádíme v rukavicích. Předjdeme tím kontaminaci vzorku kreatinem, který může dávat falešné výsledky při barvení stříbrem a zcela nezbytné je toto opatření při manipulaci s monomery (akrylamidem) při přípravě gelu.**

#### 1. Kultivace mikroorganismu

Studovaný mikroorganismus kultivujeme podle doporučeného postupu optimálního pro příslušný druh event. kmen či mutant. Sklizenou kulturu dobře promyjeme pomocí centrifugace a suspendování v odpovídajícím mediu. Pro účely elektroforézy je důležité nepřekročit tolerovanou hodnotu iontové síly, pro IEF v našem provedení je maximum

odpovídající 40 mM TrisCl. V našem modelovém provedení použijeme jako vzorek buněk komerční preparát pekařského droždí *Saccharomyces cerevisiae*.

### *Provedení:*

10 g pasty pekařského droždí rozmícháme v malém množství vody a pak doplníme na 200 ml. Suspensi zcentrifugujeme 5 min. při 10 000 ot/min. a supernatant vyhodíme. Sediment suspendujeme v 10 ml vody a změříme objem suspense. Odhadneme objem sedimentu (rozdíl objem suspense – 10 ml). Pak doplníme do ca 200 ml a znovu centrifugujeme. Toto promytí provedeme celkem 4krát (alespoň poslední 2 promytí s destilovanou vodou). Poslední suspensi doplníme vodou tak, že 1 ml sedimentu bude odpovídat 10 ml. Centrifugaci pak provedeme v menších kyvetách s 10 ml suspense v každé. Supernatanty vyhodíme, sedimenty zpracujeme nebo uskladníme při –20 °C.

## 2. Extrakce bílkovin a předúprava vzorku

Standardní metoda reprodukovatelně solubilizuje všechny typy bílkovin včetně hydrofobních. Zabraňuje agregaci a změnám rozpustnosti během dělení a modifikacím bílkovin při dalších operacích. Interferující sloučeniny, zvl. DNA, jsou při ní odstraněny. V případě potřeby se doplňuje částečnou frakcionací, pokud je sledovaná bílkovina velmi málo zastoupena, odstraní se nadbytek interferujících majoritních bílkovin. Toho je dosaženo působením směsi detergentů, chaotropních látek, reduktantů, pufrů a amfolytů. Jejich vhodnou kombinaci představují komerční extrakční směsi, ve cvičení si je připravíme smícháním individuálních komponent dle tabulky. Stejná směs se používá i pro rehydrataci IPG proužků pro IEF. Připravíme si tedy jen nezbytné množství, roztok je možno omezeně skladovat při –20 °C.

### *Provedení:*

Připravíme si extrakční směs podle tabulky. Obsahuje močovinu, redukční agens dithiothreitol (DTT) nebo tributylfosfin (TBP), detergent 3-[(3-Cholamidopropyl)dimetylammonio]-1-propansulfonát (CHAPS), stabilizační amfolyt a bromfenolovou modř ke sledování migrace vzorku při elektroforéze. DTT nebo TBP se

přidává bezprostředně před užitím. Případné nadbytečné množství lze rozdělit na alikvotní podíly a zmrazit, rozmrazujeme pouze jedenkrát, nadbytek již nezmrazujeme, ale vyhodíme. Je-li nutno pufrovat pH, lze přidat Tris v koncentraci 10-40 mM. Je nezbytné udržovat nízkou iontovou sílu roztoku, jinak může proud při IEF překročit stanovený limit.

Komponenta	Množství
8 M močovina	25 g močoviny rozp. v 25 ml vody, nebo 47 ml 8,5 M zásobního roztoku (510 g/l)
50 mM DTT nebo 2 mM TBP	385 mg DTT nebo 500 µl 200 mM zásobního roztoku TBP
4% CHAPS	2 g
0,2% amfolyt <sup>a</sup>	125 µl 40% nebo 250 µl 20%
2 ppm bromfenolové modři	100 µl 0,1% zásobního roztoku
Voda	do 50 ml

<sup>a</sup> Výběr amfolytu odpovídá rozmezí pH gradientu při IEF. Je dodáván jako roztok ve 40% event. 20% koncentraci

Buňky získané ad 1 extrahujeme v poměru 1 ml sedimentu s nejméně 9 ml extrakční směsí (konc. močoviny je nejméně 6,5 M). Extrakci provádíme v centrifugační kyvetě odpovídající velikosti za laboratorní teploty. Suspensi buněčného sedimentu v extrakční směsí promícháváme skleněnou tyčinkou a roztíráme po dobu ca 5 min. Pak ji centrifugujeme až dostaneme čirý supernatant a pevný sediment (obvykle stačí 8 min. při 12 000 g). Sediment je možno opakovaně extrahovat nebo vyhodit. Supernatant zpracováváme dále, je výhodné jeho větší množství rozdělit na alikvoty a uchovávat při -20 °C. Ve vzorku stanovíme koncentraci bílkovin některou z běžných metod (viz základní cvičení z biochemie) s přihlédnutím k omezením plynoucím z přítomnosti detergentu.

*Modifikace extrakčního postupu: Solubilizační roztoky pro dokonalejší extrakci lze doplnit dalšími chaotropními látkami (2M thiomočovina) a detergenty nebo použít postupnou extrakci různými extrakčními roztoky. To umožní extrahovat též hydrofobní membránové bílkoviny.*

## 1. Isoelektrická fokusace – 1. směr

IEF provádíme na komerčních proužcích s imobilizovaným pH gradientem (IPG). Je možno zvolit některé z nabízených rozmezí a formy gradientů i délku IPG proužku. Ta určuje množství bílkoviny ve vzorku a jeho objem, který aplikujeme pro tento krok – pro 17 cm je to 100–300 µg bílkovin a 300 µl, pro 11 cm 50-200 µg a 185 µl a pro 7 cm 10-100 µg a 125 µl. Dodané proužky je nutno rehydratovat – to se provádí extraktem (obsahuje jak původní směs tak vyextrahované bílkoviny), takže se současně vnáší na gel vzorek.

### *Provedení:*

Napipetujte 125 µl supernatantu do rehydratační vaničky. Odstraňte ochrannou folii z IPG proužku pH 3-10NL a položte ho opatrně pomocí pinsety gelem dolů na vrstvičku kapaliny tak, aby celý povrch byl dobře smočen. Nechejte stát po dobu 1 hod. a pak proužek opatrně převrstvěte minerálním olejem a nechejte v chladničce botnat přes noc.

Pinsetou umístíte na elektrody aparátu pro IEF tamponky z buničité vaty ovlhčené 5-8 µl vody. Nabotnalý IPG proužek položíme do dráhy gelem dolů tak, aby jeho konce spočívaly na tamponech s odpovídající orientací - tj. konec 3 na katodě a konec 10 na anodě. Převrstvíme opatrně minerálním olejem tak, aby proužky byly zaplaveny. Na aparátu nastavíme požadované parametry (pod dohledem vedoucího), obvykle 50 µA na proužek, maximum 4000 V, celkovou hodnotu 7-10000 V.hod a zvolíme program (obvykle rychlý způsob). Po ukončení běhu proužky můžeme skladovat v rehydratačních vaničkách při -20 °C i níže nebo je okamžitě podrobíme SDS-PAGE.

## 2. SDS – PAGE – 2. směr

Toto dělení provádíme na gelech o rozměru odpovídajícím délce IPG proužku, k tomu nutno připočíst místo pro standarty bílkovin. Nejprve si připravíme směs pro dělicí gel a během její polymerace upravíme IPG proužky z 1. dělení. Ty pak vložíme na horní část gelu, vedle umístíme tampon se standarty a necháme proběhnout dělení.

### *Provedení:*

Příprava dělicího gelu.

Přichystáme (zkontrolujeme příp. hotové) zásobní roztoky

3. monomery - roztok A – 87,6 g akrylamidu a 2,4 g BIS (N,N'-metylen-bisakrylamidu) v 300 ml vody
4. roztok B – 1,5 M TrisCl o pH 8,8
5. roztok D – 10% SDS (dodecylsulfát sodný)

a připravíme zcela čerstvý roztok persíranu amonného (150 mg/ml).

Ve stojánku sestavíme formu pro 7 cm gel ze dvou skel a 1 mm distančních proužků, zafixujeme šrouby a zaklapnutím upevníme. Naplněním vodou zkontrolujeme, že sestava je těsná, vodu pak vylejeme a zbylé kapky odsajeme proužkem filtračního papíru.

Čerstvě připravené roztoky A a B i vodu odvzdušníme (ultrazvukem nebo v odsávače). Připravíme roztok pro 12% gel smícháním 6 ml A, 3,75 ml B, 5,05 ml vody, 0,1 ml D, 0,1 ml persíranu a 10 µl TEMED (tetrametyletylendiaminu). Směs opatrně promícháme, abychom předešli zavzdušnění a naplníme jí formu pomocí injekční stříkačky. Nahoře ponecháme asi 1 cm místa pro vložení IPG proužku a převrstvíme isobutanolem. Necháme polymerovat asi 1 hod. i více a mezitím si upravíme IPG proužek po IEF.

Úprava IPG.

Bílkovinné frakce získané IEF se upraví tak, aby získaly uniformní tvar a náboj. Toho se dosáhne působením redukcí disulfidických můstků pomocí dithiotreitolu (DTT), alkyací vzniklých –SH skupin jodacetamidem (IAA), rozrušením vodíkových vazeb močovinou a navázáním silného aniontogenního detergentu SDS (dodecylsulfát sodný).

Nejprve si připravíme (není-li již hotov) základní pufr o složení 50 mM TrisCl o pH 8,8, 6 M močovina, 2% SDS a 20% glycerol. Ve 2,5 ml tohoto pufru rozpustíme 50 mg DTT (2%) na nalejeme ho na IPG proužek umístěný ve vaničce. Necháme působit 10 min. za mírného pohybu kapliny (na třepačce nebo ručně). Mezitím rozpustíme v dalších 2,5 ml základního pufru 65 mg IAA (2,5%) a až ukončíme působení 1. pufru zdekantujeme ho a nalejeme na IPG proužek 2. pufr a opět necháme alespoň 10 min. inkubovat.

Mezitím si připravíme vzorek standartních bílkovin tak, že odstříhneme asi 5 mm z proužku svého tamponu (Protean IEF), vneseme 10 µl roztoku standartů a necháme vsáknout.

Připravíme si asi 10 ml 1% roztoku agarosy v pracovním pufru pro SDS-PAGE – viz níže. Je-li již připraven v chladničce, zahřátím na vodní lázni agarosu rozpustíme.

Slijeme z polymerovaného gelu (PAG) krycí vrstvu isopropanolu a zbytky odsajeme.

Inkubovaný IPG proužek vyjmeme z vaničky a vložíme na připravený PAG. Zatlačíme ho špachtlí do těsného kontaktu s gelem bez bublin, vedle něj zasuneme proužek se standarty a zalejeme teplým roztokem agarosy.

Elektroforetické dělení.

Připravíte si pracovní elektrodový pufr zředěním 60 ml zásobního roztoku (15 g Tris, 72 g glycinu a 3 g SDS v 1 litru, upraveno HCl na pH 8,3) 240 ml destilované vody. Po zatuhnutí agarosy se desky vloží do aparátu Protean II a jeho nádobky se naplní pracovním elektrodovým pufrem. Do horní nádobky kápneme několik kapek 0,05% bromfenolové modři, aby byl pufr slabě modře zbarven. Připojíme zdroj, zapneme a nastavíme napětí na 150 V. Dělení trvá asi 4 hodiny, jeho postup sledujeme podle modré linie bromfenolové modři. Až doputuje na konec gelu, odpojíme zdroj, vyjmeme desky a opláchneme vodou.

## 6. Barvení a snímání obrazu

Provádí se několika způsoby lišících se citlivostí, náročností na chemikálie a provedení apod. Jednoduché a spolehlivé barvení spočívá v adsorpci barviva (Coomasie Blue), jež se dá vymýt z gelu, na bílkovinách je však poutáno pevněji (přehnaným odbarvováním se však vymyje i z nich!)

*Provedení:*

Demontujeme rámeček s gelem, odstraníme krycí sklo a gel opatrně přeneseme do misky s fixačním roztokem (30% isopropanol, 10% kys. octová). Po 2 hod. roztok slijeme a nahradíme barvicím roztokem (0,04% Coomasie Blue R-250 v 25% isopropanolu a 10% kys. octové). Necháme působit alespoň 6 hod. za mírného pohybu (na třepačce), pak slejeme a gel odbarvujeme 40% metanolem s 10% kys. octovou, který vyměňujeme po 30 min. až 2 hod. (zprvu častěji) až je pozadí gelu téměř bezbarvé. Hotový gel se oskenuje (provede obsluha vyhodnocovacího zařízení), obrázek se vytiskne a přiloží k protokolu. Podrobnější vyhodnocování se provádí pomocí počítače vybaveného patřičným softwarem, jednotlivé skvrny proteinů se dají vyříznout a dále analyzovat pomocí hmotnostní spektroskopie. To však vyžaduje dokonale zvládnutou techniku dělení a reprodukovatelné výsledky ve formě prakticky identických snímků 2D-SDS-PAGE. Toho lze dosáhnout pouze mnohonásobným opakováním základní dělicí techniky.

