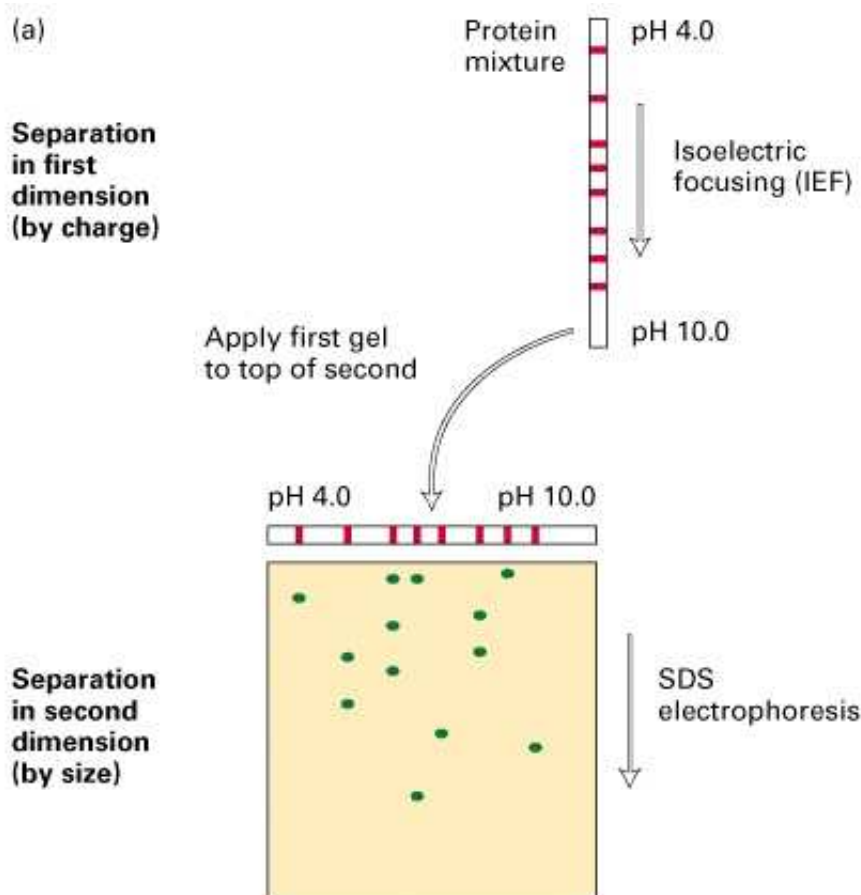


## Dvourozměrná elektroforéza (2D-PAGE)

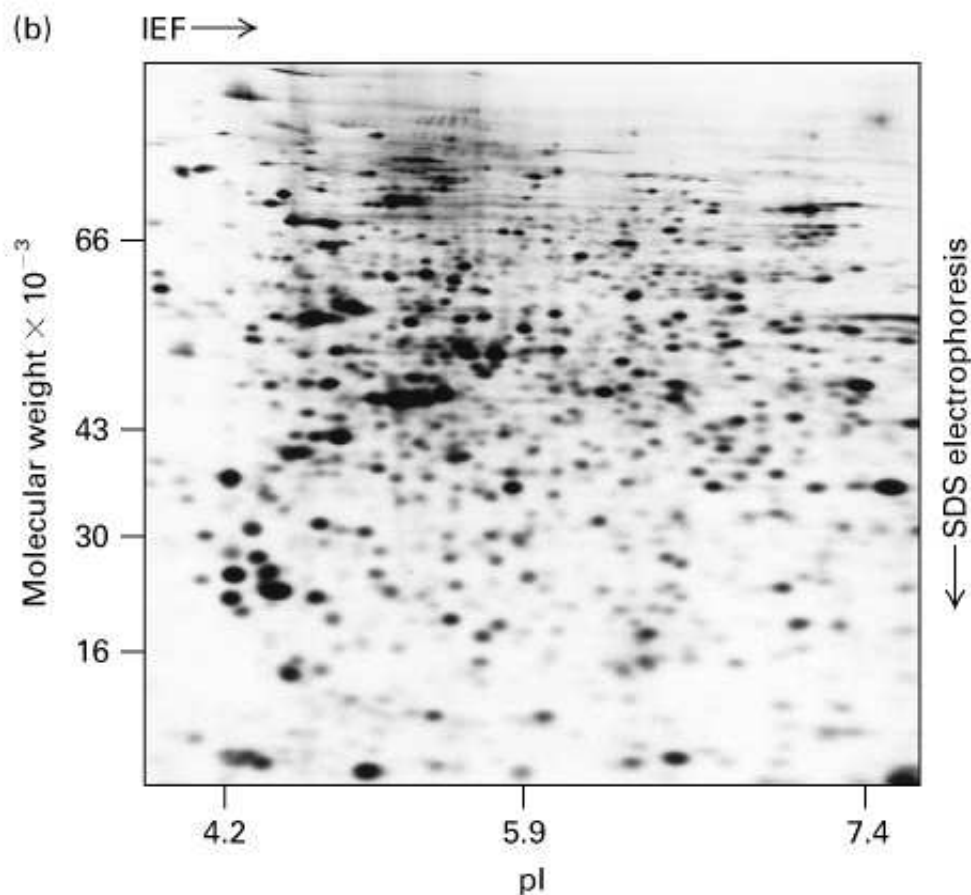
2D-PAGE je vysoce efektivní separační metodou umožňující rozdělení komplikovaných směsí stovek různých bílkovin a představuje základní nástroj v novém rozvíjejícím se směru proteomiky. Je kombinací isoelektrické fokusace (IEF) a elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Obě separace se provádějí 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) - viz obr. 1(a). Rozsah gradientu pH je udán výrobcem a pI skvrn lze určit podle její polohy.

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 elektroforesa ve směru kolmém na původní směr IEF. Bílkoviny se zde rozdělí podle svých  $M_r$  - obr. 1 dole. Po jejím ukončení se gel obarví na bílkoviny a získá se



Obr. 1. Schematické znázornění 2D-PAGE (převzato z Lodish, H. a kol.: Molecular Cell Biology, 3. vyd., Freeman 1996)

dvourozměrný obraz sestávající z více či méně dobře oddělených skvrn představujících jednotlivé bílkoviny - ukázka je na obr. 2, kdy byl dělen bezbuněčný extrakt bakterie *Escherichia coli*. 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 pI tak  $M_r$ .



Obr. 3. Reálný příklad 2D-PAGE (stejný zdroj)

Vyhodnocování elektroferogramů se provádí pomocí počítače speciálními programy, kdy po oskenování gelů se dají porovnávat jednotlivé obrazy a srovnávat s hodnotami z databází event. vzájemně mezi sebou a sledují se tak např. rozdíly v expresi bílkovin za různých podmínek apod. Častým, nicméně experimentálně náročným způsobem je charakterisace jednotlivých bílkovin tak, že se odpovídající skvrna vyřízne, podrobí specifickému štěpení (obvykle trypsinem) a produkty se analyzují pomocí hmotnostní spektroskopie (MS). Získané údaje se opět pomocí počítačových programů srovnávají s hodnotami uloženými v databázích.

Oba tyto způsoby vyhodnocení daleko přesahují rámec této úlohy, v níž se prakticky seznámíte s technikou dělení vzorků. Zpracování pomocí MS se provádí specializovanými laboratořemi formou servisu

Vlastní provedení 2D-PAGE sestává z několika kroků.

**POZOR! Veškeré operace se provádějí v ochranných rukavicích: jednak z důvodů zdravotních, jednak aby se předešlo kontaminaci bílkovinami z kůže (zvl. kolagenem).**

## Úprava vzorku

Cílem úpravy je zajistit dobrou rozpustnost bílkovin a převést jejich molekuly do pokud možno uniformního tvaru tak, aby neovlivňoval dělení. Toho se dosáhne účinkem detergentů usnadňujících rozpouštění, chaotropních látek rušících vodíkové vazby a redukujících látek rušících disulfidické můstky v molekule bílkoviny. Jeden z nejužívanějších roztoků pro tuto úpravu (tzv. extrakční roztok) má toto složení:

8 M močovina (chaotropní agens)

50 mM DTT (ditiotreitol, redukující agens)

4% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonát, detergent)

0,2% amfolyt (speciální pufr pro IEF podle požadovaného rozmezí pH gradientu)

0,0002% bromfenolová modř (slouží ke sledování postupu dělení)

Tímto roztokem se bílkoviny extrahují z tuhého vzorku jako je sediment buněk (min. 9 ml na 1 ml sedimentu) nebo se k němu přidává roztok bílkovin (nejvíce 20% objemu činidla) - přitom je nutno dbát na to, aby se nezvýšila iontová síla např. přítomným pufrům (maximum je 40 mM Tris).

Uvedená směs je již připravena a skladována při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Obsahuje amfolyt 3/10 (pro gradient pH 3-10). Pro práci se 7 cm proužky rozmrazte špičku se 150  $\mu\text{l}$  roztoku a přidejte 10-30  $\mu\text{l}$  směsi bílkovin tak, aby obsahovala 200 - 500  $\mu\text{g}$  bílkovin (preparát obdržíte od vedoucího spolu s údajem o koncentraci bílkovin). Po dobrém promíchání nechte stát 30 min. za laboratorní teploty a pak zcentrifugujte 8 min. při 12 000  $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ . Supernatant použijete k rehydrataci proužků pro IEF.

## Rehydratace proužků pro IEF (IPG proužky)

IPG proužky se dodávají v suchém stavu s imobilisovaným pH gradientem různých rozsahů. Nechávejte se nabotnat v extrakčním roztoku, s výhodou v přítomnosti vzorku, který se tak spolu s ostatními komponentami přenesou do gelu.

Napipetujte 125  $\mu$ l 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.

### **Isoelektrická fokusace (IEF)**

Pinsetou umístíte na elektrody aparátu pro IEF tamponky z buničité vaty ovlhčené 5-8  $\mu$ l 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  $\mu$ A 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.

### **Příprava gelu pro SDS-PAGE**

Sestavíme formu pro gel ze dvou skel (pro 7 cm aparát) a distančních proužků 1 mm a zafixujeme v držáku šrouby. Vložíme do stojánku a zaklapnutím zajistíme. Připravíme roztok pro 12% gel smícháním připravených roztoků:

6 ml zásobního roztoku A ( 87,6 g akrylamid + 2,4 g BIS v 300 ml)

3,75 ml roztoku B ( 1,5 M Tris pH 8,8)

5,05 ml vody

0,1 ml roztoku D ( 10% SDS)

0,1 ml čerstvého roztoku persíranu amonného ( 150 mg . ml<sup>-1</sup>)

10  $\mu$ l TEMED (tetrametyletylendiamin)

Směs vpravíme injekční stříkačkou mezi skla tak, aby nahoře zůstal asi 1 cm volný pro vložení IPG proužku a převrstvíme isobutanolem. Necháme polymerovat asi 1 hod. i více a mezitím si upravíme IPG proužek po IEF.

### **Ekvilibrace IPG pro SDS-PAGE**

Tento krok zajišťuje redukci -SH skupin (DTT) a jejich alkylaci (jodacetamid, IAA), aby nemohlo dojít k vytváření disulfidických můstků, rozrušení vodíkových vazeb (močovina) a navázání SDS na bílkovinné molekuly (podjednotky) v uniformním tvaru. Je to analogie úpravě vzorku před jednorozměrnou SDS-PAGE varem v SDS-puftru.

Je připraven základní pufr o složení

50 mM Tris.HCl, pH 8,8

6 M močovina

2% SDS

20% glycerol.

Z něho připravíme po 2,5 ml puftru 1 a 2 tak, že v jednom rozpustíme 50 mg DTT (2%) a nalejeme ho na IPG proužek umístěný ve vaničce. Necháme působit 10 min. za mírného pohybu kapliny (na třepačce nebo ručně). Mezitím upravíme pufr 2 přidáním 65 mg IAA (2,5%) a až ukončíme působení puftru 1 zdekantujeme ho a nalejeme na IPG proužek pufr 2. Po 10 min. IPG proužek vyjmeme a vložíme na připravený PAG. Zatlačíme ho špachtlí do těsného kontaktu s gelem bez bublin a zalejeme teplým roztokem agarosy (1% v pracovním puftru pro SDS-PAGE).

### **SDS-PAGE**

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. Poté demontujeme skla 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% Coomassie 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).