

I. ANALÝZA PROTEOMU

A) DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA

RNDr. Jana Buršíková, Danuše Fridrichová

Dvourozměrná elektroforéza je kombinací dvou elektromigračních metod, které slouží k separaci jednotlivých proteinů z komplexní směsi.

Prvním rozměrem je izoelektrická fokusace, tj. separace proteinů podle jejich izoelektrických bodů (pI) v imobilizovaném gradientu pH vytvořeném v polyakrylamidovém gelu (*IPG stripu*) v prostředí ionizovaných látek. K rozdělení proteinů dochází po vložení *stripu* do elektrického pole.

Druhý rozměr tvoří denaturační polyakrylamidový gel s obsahem dodecylsulfátu sodného, ve kterém dochází k rozdělení předem separovaných proteinů podle relativní molekulové hmotnosti (MW).

Po provedení dvourozměrné elektroforézy jsou proteiny vizualizovány přímo v gelu barvením Coomassie Brilliant Blue, stříbrem, fluorescenčně, popř. autoradiograficky.

Vybraný protein se manuálně vyřízne z gelu, enzymaticky naštěpí na peptidy, které jsou dále analyzovány hmotností spektrometrií. K příslušnému MS-spektru je identifikace proteinu dohledána z databáze srovnáním s peptidovými spektry známých proteinů.

Praktická část:

Vzorky se připraví acetonovou extrakcí z listů *Arabidopsis thaliana* buď wild type *Columbia* nebo *amp 1* – mutantní linie nadprodukující rostlinné hormony cytokininy.

1. Extrakce proteinů z listů:

- listy se rozdrtí v třecí misce v tekutém dusíku
- přidá se roztok aceton/TCA (kyselina trichloroctová) – vysrážení proteinu
- centrifugace, pelet se promyje roztokem acetonu (s obsahem EDTA a inhibitorů proteáz)
- centrifugace, vysušení peletu (tj. proteinový prášek)

2. Solubilizace proteinů:

- rozpuštění proteinů - 1h třepat při 37 °C v solubilizačním pufru
- centrifugace, filtrace, stanovení koncentrace proteinu metodou kompatibilní s redukčními látkami a detergenty obsaženými v solubilizačním pufru (kit RC/DC, BioRad).

3. Rehydratace IPG stripu se vzorkem

- Proužky se dodávají v dehydratovaném stavu opatřené ochrannou fólií. Všeobecně lze k nanesení proteinového vzorku použít dva postupy přípravy:
 - 1) rehydratace bez vzorku – po odstranění fólie se proužek nechá rehydratovat rehydratačním pufrům 9-16 hodin, vzorek se nanese před samotnou fokusací.
 - 2) rehydratace se vzorkem – po odstranění fólie se proužek nechá rehydratovat v roztoku rehydratačního pufru obsahujícím vzorek. Tímto způsobem lze dosáhnout nanesení velkého množství proteinu (až 1 mg) bez rizika vysrážení.
 - 2.1) rehydratace se vzorkem pasivní – bez působení elektrického proudu
 - 2.2) rehydratace se vzorkem aktivní – 50 V, 20°C, 10 –12 hodin
- V našem případě použijeme postup pasivní rehydratace se vzorkem. Do drážky rehydratační vaničky nanese 50 µg vzorku ředěného rehydratačním pufrům. Z IPG stripu opatrně sloupneme ochrannou fólii a položíme jej GELEM DOLŮ do drážky se vzorkem (případné bubliny je třeba odstranit!). Zalijeme 2 ml minerálního oleje. Rehydratace proužku bude probíhat asi 6 hodin (obvykle však používáme rehydrataci přes noc).

S proužky manipulujeme výhradně pinzetou a v rukavicích !!!

4. Izoelektrická fokusace (1. rozměr)

- Fokusační podmínky závisí na složení vzorku, jeho komplexitě, na délce stripu a na pH rozmezí IPG proužku. Následující podmínky proto berte pouze jako doporučené. Na elektrody fokusační vaničky opatrně pinzetou položíme čtverečky speciálního papíru a navlhčíme je 8 μ l deionizované vody. Z rehydratační vaničky vyjmeme proužek a necháme odkapat olej. Proužek položíme do fokusační vaničky gelem dolů. Jemně jej přitlačíme na elektrody. Zalijeme 2 ml minerálního oleje. Po vložení všech proužků uzavřeme vaničku víkem – pozor na orientaci! – a vložíme ji do přístroje.

Podmínky fokusace (pro strip délky 7 cm):

- krok: odstranění nadbytečných solí
startovní napětí: 150 V
čas: 30 min
- krok: zvyšování napětí
startovní napětí: 150 V
konečné napětí: 1500 V
čas: 3 h
- krok: zvyšování napětí
startovní napětí: 1500 V
konečné napětí: 2500 V
čas: 1 h
- krok: zvyšování napětí
startovní napětí: 2500 V
konečné napětí: 3500 V
celkový počet volthodin: 12000 Vh
- krok: závěrečný udržovací krok
napětí: 500 V
čas: 24 hodin

Po ukončení fokusace proužky vyjmeme z drážky, necháme okapat olej a buď strip hned použijeme na separaci v druhém rozměru nebo zamrazíme na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v hermeticky uzavřené nádobce.

5. SDS-PAGE (2. rozměr)

- Ekvilibrace proužků: Před provedením SDS-PAGE je nezbytné ekvilibrovat proužky v pufru obsahujícím dodecylsulfát sodný (SDS). Proužky po rozmrazení umístíme do rehydratační vaničky obsahující 2.5 ml **ekvilibračního roztoku 1** (obsahuje DTT) a 10 minut jemně promícháváme na třepačce. Po deseti minutách přemístíme proužek do 2.5 ml **ekvilibračního roztoku 2** (obsahuje jodoacetamid) a opět mírně promícháváme na třepačce. Jodoacetamid je fotocitlivý, ekvilibrační roztok 2 proto chráníme před světlem alobalem.
- Po ekvilibraci přeneseme IPG proužek na polyakrylamidový gel druhé dimenze a zalijeme **0.8 % agarosou** v elektroforetickém pufru s obsahem 0,003% bromfenolové modři. Necháme proběhnout standardní SDS-PAGE, gely obarvíme Coomassie Brilliant Blue nebo - pro dosažení vyšší citlivosti - stříbrem.

Roztoky pro 2D elektroforézu:

Solubilizační pufr (totožný s rehydratačním pufrém)

7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 60 mM DTT, 0.8% ampholyte, 0.003% BPB

Ekvilibrační roztoky

- 6 M močovina, 0,375 M Tris/Cl, pH 8,8, 2% SDS, 20% glycerol, 2% (w/v) DTT
- 6 M močovina, 0,375 M Tris/Cl, pH 8,8, 2% SDS, 20% glycerol, 2,5% (w/v) jodoacetamid

Agarosa na zalití IPG stripu

0.8 % agarosa v PAGE elektroforetickém pufru

Elektroforetický pufr

0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % SDS

Koncentrace celkového akrylamidu v gelu pro druhý rozměr 2-D elektroforézy:

Druhý rozměr 2-D elektroforézy provádíme v 12%T gelu:

Barvení gelů Coomassie modří (Coomassie Brilliant Blue R250)

Barvení Coomassie modří patří mezi nespecifické metody vizualizace proteinů. Při obvyklém způsobu barvení Coomassie dochází zároveň k fixaci proteinu do gelu, a to působením 40% methanolu v prostředí 10% kyseliny octové. Barvení trvá přibližně 2 – 8 hodin, v závislosti na množství proteinu naneseného na gelu, na tloušťce gelu a na koncentraci Coomassie.

- Po skončení SDS-PAGE označit orientaci gelu odkrojením jednoho z rožků a opatrně přenést gel do 0,1% Coomassie R 250. Ponechat třepat na třepačce přes noc.
- Následující den vyměnit Coomassie za odbarvovací roztok č. 1. Ponechat na kývačce 30 minut.
- Vyměnit odbarvovací roztok 1 za odbarvovací roztok 2. Ponechat na kývačce do odbarvení; odbarvovací roztok 2 je nutné několikrát vyměnit. V tomto roztoku je gel možné v chladu uchovat i několik týdnů.
- Uchovávání gelů:
 - vysušení mezi celofány
 - vysušení na papíře pod celofánem
 - naskenování a uchování v elektronické podobě (pokud se gel uchovává pro pozdější analýzu, uchovávat ve formátu tiff, nekomprimovaném)

Roztoky:

Barvicí roztok Coomassie

0,1% Coomassie Brilliant Blue R 250

10% kyselina octová

40% methanol

Odbarvovací roztok 1

7% kyselina octová

40% methanol

Odbarvovací roztok 2

10% kyselina octová

5% metanol

Barvení CB je možno též provést komerčně dostupným kitem.

Barvení gelů stříbrem

Barvení stříbrem je další metodou nespecifické vizualizace proteinů. Principem je vazba stříbrných iontů na –SH a –COOH skupiny aminokyselin. Schopnost vázat na sebe stříbrné ionty je tedy u každého proteinu jiná v závislosti na jeho aminokyselinovém složení.

Po proběhnutí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu se proteiny v gelu zafixují zředěnou kyselinou octovou nebo trichloroctovou. Poté jsou vystaveny působení dusičnanu stříbrného. Při vyvíjení v roztoku uhličitanu sodného s formaldehydem dojde k redukci stříbrných iontů na stříbro, což se projeví zčernáním míst na gelu, kde je stříbro v proteinech navázáno.

Stupeň intenzity obarvení lze ovlivnit dobou, po kterou jsou stříbrné ionty vystaveny působení vyvíjecího činidla. Redukční reakce se zastaví přidáním kyseliny octové.

Pro snížení pozadí a zlepšení kvality detekce je vhodné gel odbarvit Farmerovým odbarvovačem a celou proceduru barvení (bez fixace) provést ještě jednou. Stříbro, navázané na proteinech, se totiž Farmerovým činidlem nevymyje tak snadno, jako stříbro nespecificky navázané jako „pozadí“.

Veškeré nádoby, použité pro barvení, je nutno pečlivě umýt 1) saponátem, 2) ethanolem, 3) destilovanou vodou. Pro přípravu veškerých vodných roztoků použít pouze destilovanou deionizovanou vodu.

- Po skončení SDS-PAGE proteiny v gelu zafixovat - opatrně přenést gel do 20% trichloroctové kyseliny (TCA) a ponechat 20 minut třepat na kývačce.
- TCA recyklovat, gel promýt 4x 5 minut vodou.
- Přidat 0,1% roztok dusičnanu stříbrného. Zakrytou misku ponechat 30 minut třepat na kývačce.
- Gel propláchnout vodou 10 vteřin a přidat vyvíjecí činidlo. 10 minut vyvíjet v zakryté misce, netřepat.
- Zastavení vyvíjení 1% kyselinou octovou, 10 minut třepat.
- Promytí gelu vodou, 3x5 minut. Přidat Farmerův odbarvovač, 5 minut třepat.
- Po odstranění Farmerova odbarvovače promývat gel vodou až do úplného odbarvení.
- Opět přidat 0,1% roztok dusičnanu stříbrného. Zakrytou misku ponechat 30 minut třepat na kývačce.
- Gel propláchnout vodou, 10 vteřin a přidat vyvíjecí činidlo. Vyvíjet v zakryté misce do objevení proužků/skvrn.
- Zastavení vyvíjení 1% kyselinou octovou, 10 minut třepat.
- Gel promýt vodou – 15 minut. Uchovávat v chladu ve vodě s 2% (w/v) glycerolem.

Roztoky:

0,1% AgNO₃

0,1 g AgNO₃/100 g roztoku.

Připravit těsně před použitím (nepřipravovat do zásoby). Uchovávat v temnu.

vyvíjecí činidlo

3% uhličitan sodný + formaldehyd

3 g Na₂CO₃/100 g roztoku + 50 µl 37% formaldehydu

Farmerův odbarvovač

2% K₃Fe(CN)₆, 3,2% Na₂S₂O₃·5H₂O

2 g K₃Fe(CN)₆/100 g roztoku

3,2 g Na₂S₂O₃·5H₂O/100 g roztoku

Smíchat těsně před použitím

Barvení stříbrem je možno též provést komerčně dostupným kitem.

Gely uchováváme zatavené ve fólii nebo vysušené.

Sušení gelů mezi celofány

- Odbarvovací roztok 2 vyměníme za 2% glycerol a gel v roztoku ponecháme aspoň 15 minut.
- Ustříháme celofán (Biometra, BioRad), namočíme a ponecháme ve vodě 10 minut.
- Poskládáme sendvič a ten vložíme do sušárny gelů.
- Sušíme 4 hodiny.

2% (w/v) glycerol

2g glycerolu doplnit na objem 100 ml destilovanou vodou

B) HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PROTEINŮ

doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.

Hmotnostní spektrometrie bude použita pro identifikaci vybraných proteinů po jejich separaci 2-D elektroforézou (MALDI-TOF MS), resp. po on-line separaci kapalinovou chromatografií (ESI-IT MS). Studenti se seznámí s metodou analýzy proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie včetně proteolytického štěpení a budou samostatně identifikovat vybrané proteiny na základě srovnání získaných dat s proteinovými databázemi.

Teoretický úvod

MALDI-TOF MS

Hmotnostní spektrometrie s ionizací za přítomnosti matrice a detekcí iontů v průletovém analyzátoru (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) je v současné době jedna z nejrozšířenějších metod identifikace proteinů resp. určení jejich primární struktury. V našem případě bude použita metoda založená na srovnání hmotností peptidů vzniklých proteolýzou analyzovaného proteinu s proteinovými databázemi (peptide mapping, peptide mass fingerprinting).

Obarvené skvrny vybraných proteinů jsou nejprve vyříznuty z gelů připravených 2-D elektroforézou. Vyříznuté kousky gelu s proteiny jsou odbarveny střídavým promýváním v acetonitrilu a roztoku hydrouhličitanu amonného. Po odbarvení jsou dithiothreitem redukovány disulfidické můstky mezi cysteiny a následně jsou -SH skupiny alkylovány jodacetamidem s cílem zabránit opětovnému vytvoření těchto můstků. Po alkylování je ke vzorkům přidána proteáza (obvykle trypsin) a jsou inkubovány přes noc. Působením proteázy jsou proteiny specificky štěpeny na sadu peptidů. Již zmíněný trypsin štěpí protein za lysinem nebo argininem směrem k C-konci peptidu. Soubor takto vzniklých peptidů je specifický pro daný protein (tzv. peptidová mapa). Po ukončení inkubace jsou peptidy extrahovány kyselým vodným roztokem acetonitrilu.

Extrakt peptidů je pak smíchán s matricí, nanesen na terčík a po krystalizaci je analyzován pomocí MALDI-TOF MS. Pro analýzu bude použit přístroj REFLEX IV (Bruker, Brémy, Německo). Výsledkem hmotnostně spektrometrické analýzy jsou přesné hmotnosti peptidů. Soubor naměřených hmotností peptidů je pak srovnáván pomocí prohledávacích programů (např. Mascot, MS Fit) s proteinovými databázemi, resp. s peptidovými mapami vytvořenými *in silico* počítačovým programem pro jednotlivé proteiny uložené ve zvolené databázi. Na základě tohoto srovnání lze protein identifikovat s velkou pravděpodobností, případně určit jeho homology.

LC- MSMS

Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrospřejem a iontovou pastí jako hmotnostním analyzátozem iontů je další velmi rozšířenou metodou identifikace. Výhodou je možnost on-line spojení tohoto typu hmotnostního spektrometru s vhodnou separační technikou (HPLC, CE). V tomto případě bude identifikace proteinů založená na srovnání hmotností fragmentů jednotlivých peptidů vzniklých proteolýzou proteinů v analyzované směsi s proteinovými databázemi.

Směs proteinů je podrobena proteolytické digesci (postup je popsán v předchozím odstavci). Směs vzniklých peptidů je pak separována na kapilární koloně kapalinového chromatografu (Ultimate, LC Packings). K dávkování vzorků bude použit autosampler (Famos, LC Packings). MS/MS analýza separovaných peptidů bude provedena na přístroji Esquire 2000 (Bruker, Brémy, Německo). Pro identifikaci jsou pak srovnávány soubory naměřených hmotností

fragmentů jednotlivých peptidů pomocí prohledávacích programů (např. Mascot, Protein Prospector) s proteinovými databázemi.

Proteolytické štěpení

1. Vyříznutí proteinových skvrn z gelu

- deionizovaná voda
- skalpel
- mikroskopavky (0,5 ml)

Gel opláchneme vodou a pak skalpelem vyřežeme vybrané skvrny gelu. Vyříznutý gel s daným proteinem pak rozkrájíme na kostičky o straně asi 1 mm a vložíme do mikroskopavek.

2. Odbarvení gelu

- deionizovaná voda
- 50 mM NH_4HCO_3 /acetonitril (1:1, v/v)
- acetonitril
- 50 mM NH_4HCO_3

Gel proplachujeme uvedenými roztoky, promytí roztokem pufru a acetonitrilu opakujeme 2x, po promytí acetonitrem nakonec gel usušíme ve vakuové centrifuze.

3. Redukce a alkylace

- 10 mM dithiothreitol/25 mM NH_4HCO_3 – redukční činidlo
- 55 mM jodacetamid/25 mM NH_4HCO_3 – alkylační činidlo
- 50 mM NH_4HCO_3 /acetonitril (1:1, v/v)
- acetonitril

K částicím gelu přidáme redukční činidlo a inkubujeme 1 hodinu při 56 °C, pak roztok odstraníme a přidáme na 30 minut alkylační činidlo (lab. teplota, temno). Odstraníme roztok alkylačního činidla a propláchneme roztokem pufru v acetonitrilu a pak samotným acetonitrem, opět roztok odpaříme.

4. Proteolytické štěpení

- trypsin (5 ng/μl) v 25 mM NH_4HCO_3

Přidáme roztok enzymu, tak aby zakrýval kousky gelu, a inkubujeme při 37°C přes noc.

5. Extrakce peptidů

- 50 % acetonitril/1% trifluoroctová kyselina

Po 10 minutách v ultrazvukové lázni odpipetujeme původní inkubační roztok, pak přidáme roztok acetonitrilu a opět dáme na deset minut do ultrazvukové lázně a odpipetujeme supernatant (tento krok opakujeme). Jednotlivé supernatanty spojíme.

MALDI-TOF MS analýza

1. Příprava peptidového extraktu k analýze

- matrice - nasycený roztok kyseliny hydroxy α -kyano skořicové v 50 % acetonitrilu s 0,1 % trifluoroctovou kyselinou

Peptidový extrakt smícháme 1:1 s matricí a výsledný roztok (0,5 μ l) nanese na terčík. Po vykrytalizování je vzorek připraven k analýze.

2. Vlastní analýza

Peptidy měříme v refletronovém modu a za použití externí kalibrace na směs standardních peptidů.

LC-MSMS analýza

1. LC analýza

- kapilární kolona s reversní fází C18
- mobilní fáze acetonitril/voda s přísávkem kyseliny mravenčí (0,1%), gradientová eluce

2. Vlastní analýza

Iontová past pracuje v MSMS modu.

Identifikace proteinů

Základy práce s databázemi

Seznámíme se s nejdůležitějšími zdroji dat a nástroji pro studium proteinů přístupných na Internetu. Použití si vyzkoušíme na několika praktických příkladech v počítačové učebně a studenti vypracují několik praktických úkolů.

Typy zdrojů informací a nástrojů

Doc. Dr. Zbynek Zdrahal (zdrahal@sci.muni.cz)
<http://www.sci.muni.cz/LMFR/Proteomika.html>

1. Základní data

– sekvence

- NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>)
- Expasy (<http://www.expasy.ch/>)
- SwissProt (<http://www.expasy.ch/sprot/>)

– struktura

- PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>)

2. Nástroje

– analýza sekvence, srovnávání více sekvencí

- odkaz na Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>)
- CLUSTAL
- BLAST
- PHYLIP

– zobrazení struktury

- PDB Java Viewer
- Cn3D (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>)
- Swiss Pdb Viewer (<http://www.expasy.ch/spdbv/mainpage.htm>)
- Chime (<http://www.mdli.com/support/chime>)

- předpovídání struktury
 - Swiss Model (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)
 - I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)
- komplexní
 - Biology WorkBench (<http://workbench.sdsc.edu/>)
 - SwissProt Tools (<http://www.expasy.ch/tools/>)

3. Odvozená a speciální data

- podobnosti mezi druhy
 - COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)
- domény
 - PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>)
- typy skládání
 - SCOP (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>)
- fosforylační místa
 - PhosphoBase (<http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/>)
- hmotnostní spektra pro MALDI-TOF, 2-D gely, identifikace z gelu
 - SwissProt 2-D PAGE (<http://www.expasy.ch/ch2d/>)
 - PeptideSearch (<http://www.mann.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html>)
 - ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu/>)
- nomenklatura enzymů
 - SwissProt ENZYME (<http://www.expasy.ch/enzyme/>)
- pohyby proteinů
 - MolMovDB (<http://bioinfo.mbb.yale.edu/MolMovDB/>)

Vyhodnocení MS dat (samostatná práce)

Po seznámení se s nejdůležitějšími zdroji dat a nástroji pro studium proteinů přístupných na Internetu data získaná MALDI-TOF analýzou (hmoty peptidů) zadáme do prohlídacího programu Mascot (Matrix Science) s příslušnými parametry a identifikujeme proteiny z jednotlivých skvrn.

Poznámka:

Proteolytické štěpení a MALDI-TOF analýza bude provedena z části demonstrační formou z časových a kapacitních důvodů. Studenti obdrží seznam hmot peptidů pro každý analyzovaný vzorek a vlastní identifikaci proteinů si každý student provede sám.

Hledání v databázi proteinů.

RNDr. Lubomír Janda PhD

www.expasy.ch

The ExpASY (Expert Protein Analysis System) [proteomics](#) server of the [Swiss Institute of Bioinformatics](#) (SIB) je vytvořen pro analýzu proteinové sekvence a struktury stejně tak jako pro 2-D elektroforézu.

Tento server používám k práci s proteiny.

- Databases
- Tools and software packages

Jak najít námi hledaný protein v databázi.?

- [European Bioinformatics Institute](#)
- [Swiss Institute of Bioinformatics](#)
- [Georgetown University](#)

1. Bud známe prvotní přístupové číslo: UniProtKB/Swiss-Prot entry **P49235**

Potom jdeme přímo do databáze http://www.expasy.ch/expasy_ref.html a zadáme tam číslo.

2. Nebo známe název enzymu – to bývá nejčastější a potom musíme najít číslo proteinu: rostlinná beta-glukosidáza z kukuřice, **glycosyl hydrolyse family1**, EC 3.2.1.21, P49235, BGLC_MAIZE.

Potom doporučuji jít na webové stránky Prosite - <http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>

* β -glucosidases (EC 3.2.1.21) from various bacteria such as *Agrobacterium* strain ATCC 21400, *Bacillus polymyxa*, and *Caldocellum saccharolyticum*.

* Two plants (clover) β -glucosidases (EC 3.2.1.21).

* Two different β -galactosidases (EC 3.2.1.23) from the archaeobacteria *Sulfolobus solfataricus* (genes *bgaS* and *lacS*).

* 6-phospho- β -galactosidases (EC 3.2.1.85) from various bacteria such as *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, and *Staphylococcus aureus*.

* 6-phospho- β -glucosidases (EC 3.2.1.86) from *Escherichia coli* (genes *bglB* and *ascB*) and from *Erwinia chrysanthemi* (gene *arbB*).

* Plants myrosinases (EC 3.2.1.147) (sinigrinase) (thioglucosidase).

* Mammalian lactase-phlorizin hydrolase (LPH) (EC 3.2.1.108 / EC 3.2.1.62). LPH, an integral membrane glycoprotein, is the enzyme that splits lactose in the small intestine. LPH is a large protein of about 1900 residues which contains four tandem repeats of a domain of about 450 residues which is evolutionary related to the above glycosyl hydrolases.

3. Můžeme znát však pouze jen DNA sekvenci – potom doporučuji převést sekvenci do proteinové sekvence pomocí Translace a pak použít sekvenci bez stop kodonů. Tato sekvence se pak zadá do BLASTu hledání podobných sekvencí a to s velkou pravděpodobností Vám ukáže hned první odkaz, který by měl být Váš protein.

Co vše můžeme zjistit z databází. Dalo by se říct, že vše.

Hmotnost proteinu, isoelektrický bod, zda je monomer nebo vícemer, synonyma proteinu, genový název, odkazy na literaturu, funkci, katalytickou aktivitu, jak je protein regulován, biofyzikální vlastnosti, lokalizaci, tkáňovou specifiku, podobnost s jinými proteiny, 3D strukturu.

4. Struktura proteinu, pokud byl protein krystalizován a nebo byla zjištěna sekvence pomocí NMR, tak lze nalézt na webových stránkách:

<http://www.pdb.org/pdb/explore.do>

Potom musíte znát pdb (protein databank) označení a pakliže ho neznáte, musíte ho znovu najít. Označení pdb můžete najít ze základní stránky prositu a nebo si můžete zadat do site search (beta-glucosidase maize) a zobrazí se vám seznam beta-glukosidáz z kukuřice spolu s mutanty.

Strukturu můžeme buď stáhnout a prohlížet v staženém prohlížeči jako je RASMOL, nebo PYMOL a nebo PDBviewer.

Proteiny můžeme také podrobit doménové analýze SMART <http://smart.embl-heidelberg.de/> nebo PFAM <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>

CATH Protein Structure Classification

CATH je strukturovaná klasifikace proteinových domén na čtyřech úrovních Class(C)-třída, Architecture(A)-architektura, Topology(T)-umístění and Homologous superfamily (H)-stejná rodina

SCOP: Structural Classification of Proteins.

Hledání 3-D konformace strukturně podobných proteinů (samostatná práce)

doc. dr. Jaromír Marek, Ph.D. (marek@chemi.muni.cz)

Úkol: s pomocí databáze PDB určete známou(é) 3-D strukturu(y) proteinu podobnou(é) zadané sekvenci aminokyselin a stručně popište výsledek

Nástroje:

- 1) <http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html> - vyhledávání podobných sekvencí
- 2) databáze proteinových struktur PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- 3) Swiss Pdb Viewer (<http://www.expasy.ch/spdbv/mainpage.htm>)

Příklad: hledání struktur podobných k haloalkan dehalogenáze LinB ze *Sphingomonas paucimobilis* UT26.

sekvence (ve formátu FASTA)

```
>1D07 : A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE
MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPILFQHGNTSSYLWRNIMPHCAGLGR
LIACDLIGMGDSKLDPSGPERY
AYAHRDYL DALWEALDLGDRVVLVVDWGSALGF DWARRHRRVQGIAYMEAIAMP
IEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGE
ELVLQDNVFEQVLPGLILRPLSEAEEMAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTP
ADVVAIARDYAGWLSESP I PKLF
INAEPGALTTGRMRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGAAIAAFVRRLRPA
```



Postup:

1) hledání pomocí nástroje FASTA, identifikace PDB identifikátorů

Accession	EID	Source	Length	Identity	Similarity	Overl	EID
1	E1E1107_A	mol protein length 296 HALOALKANE DEHALOGE	296	100.0	100.0	296	3.5e-129
2	E1E1107_A	mol protein length 296 1,3,4,6-TETRACHLORO	296	100.0	100.0	296	3.5e-129
3	E1E1107_A	mol protein length 296 HALOALKANE DEHAL	296	100.0	100.0	296	3.5e-129
4	E1E1107_A	mol protein length 296 HALOALKANE DEHALOGE	296	100.0	100.0	296	3.5e-129
5	E1E1107_A	mol protein length 296 1,3,4,6-TETRACHLORO	296	100.0	100.0	296	3.5e-129
6	E1E1107_A	mol protein length 296 1,3,4,6-TETRACHLORO	296	100.0	100.0	296	3.5e-129
7	E1E1107_A	mol protein length 302 1,3,4,6-tetrachloro	302	100.0	100.0	296	3.5e-129
8	E1E1107_A	mol protein length 296 HALOALKANE DEHALOGE	296	100.0	100.0	296	1e-127
9	E1E1107_A	mol protein length 296 1,3,4,6-tetrachloro	296	100.0	100.0	296	1e-127
10	E1E1107_A	mol protein length 296 HALOALKANE DEHALOGE	296	100.0	100.0	296	1e-127
11	E1E1107_A	mol protein length 296 1,3,4,6-tetrachloro	296	100.0	100.0	296	1e-127
12	E1E1107_A	mol protein length 296 HALOALKANE DEHALOGE	296	100.0	100.0	296	1e-127
13	E1E1107_A	mol protein length 297 Halobakane dehaloge	297	99.5	97.5	295	5.3e-92
14	E1E1107_A	mol protein length 297 Halobakane dehaloge	297	99.5	97.5	295	5.3e-92
15	E1E1107_A	mol protein length 303 Halobakane dehaloge	303	99.5	97.5	295	5.3e-92
16	E1E1107_A	mol protein length 303 Halobakane dehaloge	303	99.5	97.5	295	5.3e-92
17	E1E1107_A	mol protein length 294 HALOALKANE DEHALOGE	294	92.5	72.9	287	8.5e-53
18	E1E1107_A	mol protein length 294 HALOALKANE DEHALOGE	294	92.5	72.9	287	8.5e-53
19	E1E1107_A	mol protein length 295 HALOALKANE DEHALOGE	295	92.5	72.9	287	8.5e-53
20	E1E1107_A	mol protein length 299 Halobakane dehaloge	299	49.3	72.4	285	2.9e-52
21	E1E1107_A	mol protein length 299 Halobakane dehaloge	299	49.3	72.4	285	2.9e-52
22	E1E1107_A	mol protein length 299 Halobakane dehaloge	299	49.3	72.4	285	3.4e-52
23	E1E1107_A	mol protein length 304 HALOALKANE DEHALOGE	304	49.7	71.1	293	5.5e-52
24	E1E1107_B	mol protein length 310 Halobakane 2	310	41.9	69.1	289	5.9e-45

2) stažení souborů obsahujících úplnou informaci o polohách atomů z databáze PDB

RCSB PDB : Structure Summary for 1D07 - Hydrolytic haloalkane dehalogenase lmb from sphingo...

1D07

Hydrolytic haloalkane dehalogenase lmb from sphingomonas paucimobilis UT26 with 1,3-propanediol, a product of debromination of dibromopropane, at 2.0Å resolution

DOI: 10.2210/pdb1d07/pdb

Crystal structure of the haloalkane dehalogenase from Sphingomonas paucimobilis UT26

Marek, J., Vevodova, J., Smatanova, L., Nagata, Y., Svensson, L.A., Newman, J., Takagi, M., Dambarsky, J.

Journal: (2000) Biochemistry 39: 14002-14005

PubMed: 11087355 Search Related Articles in PubMed

PubMed Abstract: The haloalkane dehalogenase from Sphingomonas paucimobilis UT26 (LrB) is the enzyme involved in the degradation of the important environmental pollutant gamma-hexachlorocyclohexane. The enzyme hydrolyzes a broad range of halogenated cyclic and aliphatic compounds. Here, we present the 3.56 Å crystal structure of LrB and the 2.0 Å structure of LrB with 1,3-propanediol, a product of debromination of 1,3-dibromopropane, in the active site of the enzyme. The enzyme belongs to the alpha/beta hydrolase family and contains a catalytic triad (Asp108, His272, and Ser132) in the active-site topological arrangement previously proposed from mutagenesis experiments. The LrB structure was compared with the structures of haloalkane dehalogenase from Xanthobacter autotrophicus D2 and from Rhodococcus sp. and the structural features involved in the adaptation toward xenobiotic substrates were identified. The arrangement and composition of the alpha-helices in the cap domain results in the differences in the size and shape of the active-site cavity and the entrance tunnel. This is the major determinant of the substrate specificity of this haloalkane dehalogenase.

Keywords: Binding Sites, Bromine, Computer Simulation, Crystallization, Crystallography, X-Ray, Hydrolases, Models, Molecular, Rhodococcus, Sphingomonas, Substrate Specificity, Xanthobacter

Related Structures: Primary Citation of: 1CV2 1D07 Also Cited by: 2BFN

Organizational Affiliation:

Biological Assembly:

Deposition Summary:

Authors: Marek, J., Vevodova, J., Dambarsky, J., Smatanova, L., Svensson, L.A., Newman, J., Nagata, Y., Takagi, M.

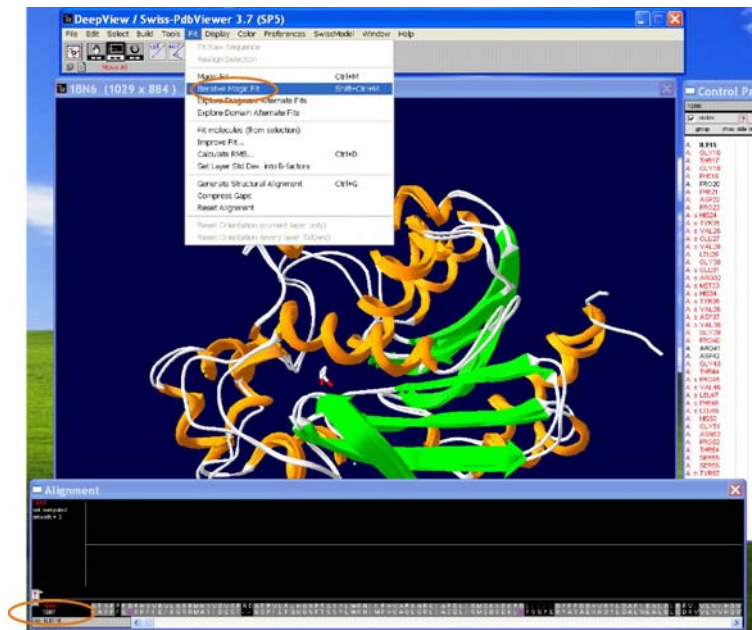
Deposition: 1999-09-29

Release: 2000-09-11

Last Modified (REVDAT): 2009-02-24

Experimental Details:

3) Vizualizace PDB souborů a pozorování (+interpretace) strukturálních rozdílů - např. s nástrojem Swiss Pdb Viewer



II. TECHNOLOGIE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

Nedostupnost dostatečných množství homogenních preparátů biologicky významných eukaryontních proteinů byla jedním ze základních omezení jejich studia. Tento limitující faktor byl odstraněn rozvojem molekulárně biologických technik, umožňujících produkci studovaných eukaryontních proteinů v dostatečném množství. Důležitým předpokladem bylo vypracování technik jejich produkce v heterologních, převážně bakteriálních expresních systémech. Protože prokaryontní transkripční aparát nedokáže odstranit nekódující oblasti eukaryontních genů, je nezbytné získat nejprve DNA komplementární k mRNA genu pro daný protein (cDNA) metodami založenými na reverzní transkripci mRNA. Pro účely nadprodukce rekombinantních proteinů lze využít řadu expresních plazmidů se silnými promotory pro kmeny *Escherichia coli*. Inzerce cDNA do vektoru je usnadněna přítomností mnohočetného klonovacího místa za promotorem, který má být použit k řízení exprese cDNA.

A) Příprava bakteriální kultury pro izolaci plazmidové DNA

Do bakteriální zkumavky obsahující 5 ml sterilního LB media s ampicilinem (100 mg/l) inokulujte pomocí bakteriální kličky expresní kulturu (kmen BL21 (DE3) pLys nesoucí expresní konstrukt pRSETA::*Zm-p60.r*) a nechte inkubovat přes noc při 37°C za stálého třepání.

Izolace plazmidové DNA z obou bakteriálních kultur pomocí QIAprep Miniprep kitu

RNDr. Eliška Nejedlá, CSc.

1. centrifugujeme 3 ml (2 x 1,5 ml) narostlé bakteriální kultury 5 min 4500 rpm
2. pelet resuspendujeme ve 250 μ l činidla P₁
3. přidáme 250 μ l činidla P₂ a jemným překlápěním (4- 6 x) zamícháme do zprůhlednění roztoku (nenechat déle než 5 minut)
4. přidáme 350 μ l činidla N₃
5. centrifugujeme 10 min (14000rpm/4°C)
6. supernatant přeneseme opatrně do kolonky a centrifugujeme 30 s při 14000 rpm
7. kolonku po odstranění roztoku promyjeme 500 μ l činidla PB a opět centrifugujeme 30s
8. kolonku promyjeme 750 μ l činidla PE a opět centrifugujeme
9. opakovanou centrifugací (viz. bod 8) odstraníme zbytky PE
10. po přidání 50 μ l deionizované sterilní vody necháme stát 1 min na stole
11. eluci plazmidové DNA provedeme centrifugací při 14000 rpm (1 min)
12. změříme koncentraci plazmidové DNA spektrofotometricky při $\lambda = 260\text{nm}$.

SEKVENAČNÍ ANALÝZA DNA

Martina Váľková

Cílem práce je ověřit čtecí rámeček klonovaného genu Zm-p60.1 v expresním vektoru pRSET A. Informace o používaném plazmidu pRSET A jsou dostupné na stránkách www.invitrogen.com. Pro sekvenování se použije univerzální sekvenační primer T7. S využitím dat o klonovacích místech plazmidu se určí, které restriktázy byly využity pro subklonování genu Zm-p60.1 a ověří se čtecí rámeček.

Teoretický úvod

Sekvenační analýza bude provedena metodou značených terminátorů za použití Genetického analyzátoru ABI PRISM 310, který pracuje na bázi kapilární elektroforézy. V praxi to znamená, že se nejprve s daným plazmidem, neznačeným primerem a sekvenačním kitem provede sekvenační reakce (cycle sequencing). Používaný kit (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) obsahuje enzym AmpliTaq polymerázu FS, směs nukleotidtrifosfátů a fluorescenčně značených terminátorů. Každý ze čtyř terminátorů (ddNTPs-dideoxynukleotidtrifosfátů) přítomných v reakci nese jinou fluorescenční značku. Při sekvenační reakci jsou tyto terminátory do rostoucích řetězců průběžně inkorporovány, řetězec je ukončen a zároveň označen značkou příslušnou k dané bázi.

Vzniklé fragmenty jsou rozděleny kapilární elektroforézou. CCD kamera analyzátoru pak snímá fluorescenci excitovanou laserovým paprskem ze všech čtyř použitých značek současně (protože emisní maxima jsou při rozdílných vlnových délkách, je možné analyzovat všechny fragmenty současně).

Příprava sekvenační reakce

Na sekvenační reakci napipetujeme pro každý zkoumaný plazmid do PCR zkumavky:

plazmidovou DNA (do reakce celkem 1100ng)	4 μ l*
deio voda	1 μ l*
primer (konc. 10 pmol/ μ l)	0.5 μ l
BD kit	4,2 μ l
5X BD sekvenační pufr	2,1 μ l*

** údaj je orientační, závisí na koncentraci plazmidové DNA. Pokud je koncentrace nižší než 100 ng/ μ l, je potřeba vzorek zahustit.*

Obsah protřepeme, centrifugujeme a vložíme do PCR cyklieru.

Sekvenační reakce

Na PCR cyklieru nastavíme následující program:

Teplotní rampa na 96°C
Cyklus 35x: 96°C 10s
50°C 5s

60°C 4 min
Teplotní rampa na 4°C, výdrž.
Celková doba je asi 3 hodiny.

Přečištění produktů sekvenační reakce

Do eppendorfky 1,5 ml napipetujeme:

3M octan sodný	2 µl
95% ethanol (ledový -20°C)	50 µl
celý obsah PCR zkumavky	

Protřepeme na Vortexu a necháme DNA 15 minut na ledu vysrážet.
Centrifugujeme 30 min při maximální rychlosti (14000 rpm).
Opatrně pipetou odsajeme ethanolovou vrstvu, aniž bychom poškodili pelet (pozor, pelet není vidět!!)
Pelet opláchneme 250 µl 70% ethanolu, protřepeme v ruce.
Krátce (5 minut) centrifugujeme při maximální rychlosti (14000 rpm).
Odsajeme ethanol.
Sraženinu krátce dosušíme (2-3 minuty) ve vakuové centrifuze nebo 20 sec v termobloku na 95 °C.

Příprava vzorku pro automatický sekvenátor

Vzorek pro sekvenátor připravíme následovně:

- Pelet v eppendorfce rozpustíme ve 20 µl TSR reagentu (Template Suppression Reagent).
- Důkladně protřepeme na Vortexu a krátce centrifugujeme.
- Denaturujeme 3 minuty při 95°C v termobloku.
- Rychle zchladíme na ledu.
- Znovu protřepeme a centrifugujeme.
- Celý obsah opatrně přeneseme do vialky (0,5 ml) určené pro automatický dávkovač sekvenátoru.
- Uzavřeme septem.

Elektroforéza na ABI PRISM 310

- Zkumavky se vzorky vložíme do automatického dávkovače analyzátoru.
- Otevřeme program pro sběr dat (Data Collection).
- Podle pokynů vyplníme příslušné informace o vzorku (Sample sheet) – název vzorku, typ kitu a matrice.
- Vyplníme informace o pořadí a způsobu nástřiku (Injection list).
- Spustíme automatickou analýzu (přibližně 2.5 hodiny na jeden vzorek).

Vyhodnocení dat

Otevřeme program pro analýzu sekvenačních dat (Sequence Analysis).
Vyhledáme příslušný vzorek a data vložíme ke zpracování (Sample Manager).
Prohlédneme získanou sekvenci, případně korigujeme podmínky analýzy (upřesníme počátek a případně i konec).
Výsledky vytiskneme a vyhodnotíme požadované informace.

Vyhodnocení sekvencí v programu Work Bench

RNDr. Eliška Nejedlá, CSc.

Proč vlastně sekvenovat?

Při práci s rekombinantními proteiny je naprosto nezbytné mít klon, který je zcela bez chyby – tedy konkrétněji – bez mutací a ve správném čtecím rámci. Názornou ukázkou, co může způsobit záměna JEDNÉ aminokyseliny, uvidíte sami v praktiku.

Proto je nutné každý klon, se kterým pracujete, **ověřit – tj. osekvenovat a sekvence zkontrolovat**. Obzvláště pak v případech, kdy provádíte PCR (chyba polymerasy) nebo vzorek od někoho dostanete. Praktická rada: nevěřte nikomu!

K ověření lze využít programy volně dostupné na internetu, jako je např. program Workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>). V praktiku si ukážeme, jak sekvence pomocí tohoto programu kontrolovat. Sekvence lze sice kontrolovat i manuálně, ale tento způsob rozhodně nelze doporučit: nemůžete vyloučit chybu a je to pracné a zdlouhavé.

Obecný postup při ověřování správnosti vzorku:

vzorek → izolace DNA → sekvenace → sekvence → Workbench: srovnání se známou, BEZCHYBNOU sekvencí → vyhodnocení.

Výstup z programu Workbench může vypadat například takto:

(při srovnání se vzorovou sekvencí zcela jasně vidíte, zda je sekvence ověřovaného vzorku v pořádku)

```
CKI_jap9wtT7      -----
GAGATATACCATGGGCAGCAGC
CKI1_dna
CAAAGGGAATCATTGCTGAGACATTCTTTTGTTCAGAGAGATCACCAAACATAAAGTC
                                         *****   * *   *
*

CKI_jap9wtT7      CATCATCATCATC--ATCACAGCAGC-
GGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGC
CKI1_dna
CAAGAAGAGGGGCAAGCTCAATGTTTAACAAAAAATTAGGTAAGAGGATAATGGCATCA
                   ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CKI_jap9wtT7
ACAGATTGAGAGAGTGAGACTAGGGTCAAGTCAGTGCCTACCGGTCGAAAGCCTATTGGG
CKI1_dna
ACAGATTGAGAGAGTGAGACTAGGGTCAAGTCAGTGCCTACCGGTCGAAAGCCTATTGGG
*****

CKI_jap9wtT7
AACCCAGAGGACGAGCAAGAGACTTCCAAGCCGAGTGACGATGAATTCTTAAGAGGAAAG
CKI1_dna
AACCCAGAGGACGAGCAAGAGACTTCCAAGCCGAGTGACGATGAATTCTTAAGAGGAAAG
```

Program Workbench lze využít nejen ke kontrole DNA sekvencí; mimo jiné tu lze srovnávat zadané sekvence proti databázím, překládat DNA sekvence do proteinových, vyhledávat primery... Dále lze Workbench použít i pro práci s proteinovými sekvencemi – taktéž srovnávání navzájem či přes databáze, zjišťovat pI, ext. koeficienty... A spousta dalších věcí, které si vlastnoručně vyzkoušíte. Vaším úkolem totiž bude zkontrolovat sekvence vzorků, se kterými budete pracovat. Výstupy z Workbenche přiložíte k protokolu. Vzhledem k časové náročnosti praktika a finanční náročnosti sekvenování nebudete ovšem sekvenovat a kontrolovat celý klon, ale pouze jeho začátek. Pro ovládnutí základů práce se sekvencemi to však bude zcela postačující.

B) EXPRESE A PURIFIKACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

Mgr. Radka Dopitová, Ph.D.

Častým průvodním jevem nadprodukce eukaryontních proteinů je vytváření nerozpustných útvarů v bakteriální cytoplazmě, složených obvykle z nekorektních konformerů rekombinantního proteinu, označovaných jako inkluzní tělíska. Důvodem jejich tvorby může být absence eukaryontních chaperonů nebo post-translačně modifikačních systémů a někdy i toxicita rekombinantních eukaryontních proteinů pro bakteriální buňky. Rozsah akumulace rozpustného rekombinantního proteinu může být pak silně negativně ovlivněn. Řadu obtíží se podařilo vyřešit translačními fúzeми rekombinantního proteinu a přirozených (obvykle bakteriálních) proteinů (např. thioredoxin, maltózu vázající protein, glutathion-S-transferasa atd.), které své pozitivní fyzikálně-chemické vlastnosti (zejména vysokou rozpustnost při zvýšených intracelulárních koncentracích) rozšiřují na celý fúzní protein. Další možností, kterou lze ovlivnit správné skládání proteinu, je změna podmínek exprese proteinu. Optimalizuje se teplota růstu buněk, teplota indukce exprese požadovaného genu, koncentrace IPTG při indukci, prodloužení doby indukce nebo růstu buněk. Lze i specificky obohacovat růstové médium.

Podmínkou pro většinu analýz rekombinantních proteinů je získání rekombinantních proteinů v homogenní formě účinnou purifikací z komplexních bakteriálních lyzátů. Purifikaci lze usnadnit řízeným směřováním syntetizovaného proteinu např. do periplazmatického nebo vnějšího prostoru *Escherichia coli* užitím specifických signálních sekvencí, ale tato technologie může být spojena s nižším výtěžkem. Proto byly vyvinuty metody purifikace, jež používají nově získané afinity fúzované domény, která může mít podobu přirozených polypeptidů nebo krátkých arteficiálních oligopeptidů, které neovlivňují profil exprese - mají pouze funkci afinitní značky (His_n , Asp_n , Phe_n atd.).

Expresе rekombinantních derivátů β -glukozidázy Zm-p60.r

Pro expresi budou použity dva druhy konstruktů pRSET A :: Zm.p60.r, z nichž jeden je WT a druhý nese záměnu jedné aminokyseliny. Studenti nebudou předem obeznámeni, zda jim byl přidělen Wt nebo mutant. Během cvičení však mohou postupně přijít na to, se kterou formou pracují.

Tyto konstrukty náhodně označíme jako X a Y.

Liché skupiny budou pracovat s proteinem X a sudé skupiny s proteinem Y.

Experiment:

- Do 1 l LB média s ampicilinem (100 mg/l) zaočkujeme bakteriální kulturu (BL21(DE3)pLysS buňky obsahující již zmíněný konstrukt pRSETA :: Zm.p60.r.) zamraženou na -80°C v 10% glycerolu. Necháme růst při 37°C do OD_{600} 0,5-0,6.
- Poté zahájíme 3 hodinovou indukci exprese rekombinantního proteinu přidávkem 0,1mM IPTG a současně snížíme teplotu na 22°C .
- Kultury sklízíme centrifugací (4000 rpm/20min). Pelety resuspendujeme v sonikačním pufru a zamrazíme na -20°C .

Roztoky: Sonikační pufr: 20 mM Tris pH 7,9
0,5 M NaCl
0,1 % Triton X-100

Purifikace proteinu

Čistota proteinových preparátů je jedním z kritérií pro přesnost výsledků při následné analýze purifikovaných proteinů, proto je nutné provést purifikaci proteinu z bakteriálních lyzátů. Použité fúzní proteiny obsahují na N-konci sekvenci šesti histidinů, které umožňují využít **metalochelatační afinitní chromatografie**.

Metoda byla poprvé využita v roce 1975 (Porath a kol.) pro frakcionaci sérových proteinů na polymerní matici s funkční skupinou chelatující ionty přechodných iontů (Cu, Ni, Zn, Co). Funkční skupinou na matici je obvykle iminodioctová (IDA) nebo nitrilotrioctová (NTA) kyselina. Interakce proteinu s maticí je zprostředkovaná neobsazenými d-orbitaly iontů přechodných kovů, které vážou volné elektronové páry převážně z dusíkového atomu imidazolových skupin histidinových zbytků v proteinu. Tohoto principu bylo využito ke konstrukci umělých oligohistidinových domén (afinitních značek) na C- nebo N-konci rekombinantního proteinu. Značky vykazují ve srovnání s izolovanými zbytky histidinu v polypeptidech vysokou afinitu k vázaným přechodným kovům. Metalochelatační afinitní chromatografie se tak stala jedním ze základních purifikačních postupů pro rekombinantní proteiny.

Optimalizovaný purifikační protokol není vždy zcela přenosný na jiné proteiny z důvodů různé fyzikálně-chemické charakteristiky proteinu a také vazebné dostupnosti oligohistidinové domény. Obecně lze navrhnout pro vazbu rekombinantního proteinu pufrů s pH = 7 – 8, zajišťující optimální interakci domény s kovovým iontem. V pufrch je vhodné použít vysoké koncentrace solí (0,5 – 1 M NaCl) a tím snížit nežádoucí elektrostatické interakce proteinů s maticí. Eluce proteinů může být provedena změnou pH do kyselé oblasti, kdy dochází k protonaci imidazolových skupin, případně použitím kompetitivních činidel (imidazol, některé aminokyseliny) nebo silných chelatorů (EDTA, EGTA). Použitím nižších koncentrací uvedených látek lze dosáhnout eluce balastních proteinů, které rovněž interagují s iontem přechodného kovu.

Experiment:

Příprava bakteriálního lyzátu pro purifikaci

- Rozmrazíme exprimované kultury
- Lyzáty sonikujeme nejméně 3 krát 1 min
- VYVÁŽÍME ZKUMAVKY S PŘESNOSTÍ NA 0,1 g a centrifugujeme 30 minut (20000 rpm/4°C)
- Pro odstranění nerozpustných zbytků se lyzát protlačí přes filtr o průměru 0,22 μm
- Přefiltrovaný supernatant použijeme na purifikaci proteinu na kolonkách.
- Zhruba 200 μl lyzátu uschováme na ledu pro následné měření koncentrace proteinů a strukturní a funkční analýzu.

Purifikace fúzních derivátů Zm-p60.1 na matici Sepharose Ni²⁺-NTA

Pro získání čistého proteinu je nutné optimalizovat podmínky vymývání balastních proteinů. Změna složení promývacích pufrů ovlivní eluci balastních proteinů interagujících s iontem kovu. Jako matrice bude použita Ni – NTA Superflow a jako promývací pufrů P1 a P2 lišící se koncentrací kompetičního činidla imidazolu.

ANALÝZA REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

Analýza kvartérní struktury rekombinantních proteinů a stupně purifikace bude provedena elektroforeticky v polyakrylamidových gelech. Obecně lze říci, že elektroforéza proteinů využívá jejich přirozeného nebo upraveného povrchového náboje v polymerních materiálech. Nejpoužívanějším separačním materiálem se stal síťovaný polyakrylamid umožňující vysokou reprodukovatelnost metody. Jistou nevýhodou polyakrylamidových gelů (PAGE) je vysoká **neurotoxicita** monomerů akrylamidu a metylenbisakrylamidu (slouží jako síťovací prvek). Při přípravě je tedy nutné pracovat v dobře větraných digestořích a v rukavicích.

K iniciaci polymerace (přípravě radikálů) lze použít riboflavin ozářený UV nebo častěji persíran amonný (APS), jako stabilizátor radikálů se používá tetramethyldiamin (TEMED).

Každá skupina si připraví jeden 10 % SDS-PAGE gel s 10 jamkami

DĚLICÍ GEL (10%)	NA 1 GEL
Acrylamid G30	1,7 ml
4x dělicí pufr	1,25 ml
dd voda	2 ml
10% SDS	50 μ l
10% APS	50 μ l
TEMED	3 μ l
KONCENTRAČNÍ GEL (5%)	
Acrylamid G30	250 μ l
4x separační pufr	400 μ l
dd voda	800 μ l
10% SDS	16 μ l
10% APS	25 μ l
TEMED	1 μ l

4x dělicí pufr (1,5 M Tris-Cl pH 8,8)

4x koncent. pufr (0,5 M Tris-Cl pH 6,8)

Polymerace dělicího gelu musí probíhat bez přístupu vzdušného kyslíku, proto je nutno polymerační směs po nalití mezi skla přelit deionizovanou vodou. Po odstranění deionizované vody nalijeme směs pro koncentrační gel, vsuneme hřebínek a necháme polymerovat.

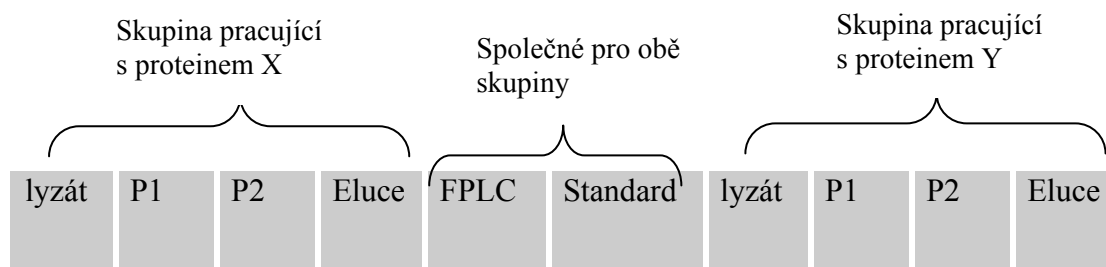
Kontrola čistoty purifikovaného proteinu

SDS-PAGE

Nejvýznamnější aplikací polyakrylamidové elektroforézy (PAGE) je diskontinuální separace v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) jako silného detergentu. SDS se váže na proteiny v konstantním poměru k jejich hmotnosti (1,4 g SDS na 1g proteinu) a umožňuje tak určit M_r proteinů s využitím hmotnostních standardů. Úplné maskování původního náboje však není zcela zachováno u silně bazických nebo kyselých proteinů, kde je k přesnému určení M_r nezbytné použít dalších technik. Diskontinuální uspořádání zahrnuje krátký koncentrační gel a dlouhý separační gel. Koncentrační gel má nižší pH (6,8), dochází zde k zakoncentrování proteinů do úzkých zón mechanismy izotachofórey (glycin zde není zcela ionizován a slouží jako terminátorový ion). V separačním gelu o pH 8,8 dochází k ionizaci glycinu, zóny proteinů se tak oddělují a proteiny se rozdělí podle molekulových hmotností. Metoda tak umožňuje detekovat v proteinovém preparátu kontaminující proteiny a slouží k testování úspěšné optimalizace purifikace proteinu z komplexních směsí. Separované proteiny lze vizualizovat některou z nespecifických technik barvení proteinů (Coomassie Brilliant Blue, barvení stříbrem), nebo lze použít specifické techniky (detekce enzymů pomocí chromogenních substrátů, Western blotting s následnou detekcí proteinu pomocí protilátek).

Experiment:

Naším cílem bude ověřit čistotu izolovaného proteinu. Na připravený denaturační gel nanese postupně frakce eluované z kolonky během purifikace :



Každá skupina pracuje s přiděleným rekombinantním proteinem X nebo Y. Jednotlivé purifikační frakce nanese na gel pouze orientačně, tzn. nebudeme měřit proteinovou koncentraci.

1. Příprava jednotlivých vzorků je znázorněna v tabulce.

označení vzorku	objem vzorku (μ l)	4 x koncentrovaný SDS nanášecí pufr (μ l)
lyzát	6 μ l	2 μ l
P1	30 μ l	10 μ l
P2	30 μ l	10 μ l
Eluce	30 μ l	10 μ l

Pozn: Vzorek proteinu purifikovaného na FPLC dostanete připravený stejně tak i hmotnostní standard.

2. Připravené vzorky povaříme (90°C/10min) a krátce stočíme na stolní centrifuze.

3. Do jamky **nanese celý objem připraveného vzorku.**

3. Elektroforézu necháme běžet při 15 – 30 mA za konstantního napětí po dobu 1-2 hod. Gel obarvíme roztokem Coomassie Brilliant Blue (Nespecifické barvení proteinů – viz. 2-D elektroforéza).

Elektroforetický pufr : 25 mM Tris-Cl, pH 8,3
192 mM glycin
0,1% SDS

4x koncentrovaný nanášecí pufr: 0,125 M Tris-Cl pH 6,8
40% SDS
20 % v/v glycerol
0,2 M DTT
Bromfenol blue

Analýza obrazu – stanovení čistoty purifikovaného proteinu

Denzitometr GS 800, Bio-Rad

Software pro analýzu 1-D gelů: Quantity One, Bio-Rad

Adobe Photoshop

Provedením samotného experimentu práce zdaleka nekončí. Získaná data je potřeba ještě správně vyhodnotit a interpretovat.

V našem případě bude vyhodnocení spočívat v určení **čistoty proteinu (eluční frakce)**.

1. Skenování gelu

- zapnout denzitometr 10 minut před vlastním měřením; restartovat počítač;
- na sklo přístroje nakapat stříčkou destilovanou vodu (skenujete-li membránu, sklo nenámáčíte);
- vložit gel, odstranit případné bubliny a zavřít přístroj.
- spustit program Quantity One;
- z nabídky vybrat **File** → **GS-800**
- v menu vybrat, jaké médium skenujete:

Select → **Gel** → **Coomassie Blue** nebo

Select → **Blot** → **AP-substrate (BCIP/NBT)**

a podle toho vybrat filtr: pro gel (skenuje se při $\lambda=520-570$ nm) se použije filtr zelený, pro blot (skenuje se při $\lambda=595-750$ nm) červený.

Filter → **Green, Red**

- **Preview scan**
- Orámovat žádanou plochu, spustit skenování ikonkou **Acquire**

2. Vyhodnocení gelu:

Sledujete zastoupení daného proteinu ve směsi ostatních proteinů bakteriálního lyzátu. Tento poměr se vyjadřuje jako *čistota vzorku*.

- v programu Quantity One otevřít příslušný soubor: **File** → **Open**
- pokud je obraz nakřivo a chcete jej narovnat, nebo pokud jej chcete otočit o libovolný úhel či ořezat, vyberte příslušný pokyn z nabídky **Image**

• **Korekce pozadí:** buď lze odstranit pozadí v rámci jednotlivých drah, nebo se ode všech drah odečítá průměrné pozadí celého gelu. Jaký typ korekce zvolit, závisí na vzhledu a druhu konkrétního gelu (gradientový gel, přebarvení, smír, nečistoty...)

Background box – pozadí se definuje tím způsobem, že se zvětší a vybere reprezentativní oblast gelu (**box**), která neobsahuje data. Průměrná hustota tohoto reprezentativního kousku gelu se potom odečítá od hodnot dat

Background strip – používá se pro gely, kde se pozadí na horním konci dráhy liší od pozadí na spodním konci dráhy. Jako reprezentativní kus pozadí se vybere pruh shora dolů přes celý gel. Průměrná intenzita horizontální řady pixelů v dráze pozadí se potom odečte z každého pixelu dat ve stejné horizontální řadě v rámci celého gelu.

Filtrace obrazu: podle vzhledu gelu zvolíme také typ filtrace:

Pepper, Salt, Gaussian, Uniform, Outlier

Pepper/Salt: šum a nečistoty jsou tmavší/světlejší než okolní pozadí. Tento druh šumu je častý u el. kamer; může být způsoben také škrábanci na negativu

Gaussian: skvrny mají gaussovský profil. Obvykle “elektronický artefakt” nebo rozptyl světla na objektech

Uniform: je-li svinčik po celém gelu (šmouhy, smíry a pod.)

Outlier: sem patří i Pepper a Salt. Jde zejména o nečistoty vnějšího původu: prach na skle skeneru, skvrny na gelu a pod.

Velikost filtru: od 3x3 do 9x9 pixelů. Nutno vybrat takovou velikost filtru, aby byla větší než průměrná velikost pozadí ale menší než průměrná velikost dat. Jednoduše řečeno, není dobré si odfiltrvat spolu s pozadím i bendy.

Ve vašem případě pravděpodobně použijete:

korekce **Pepper, Gaussian noise, Filter size 3x3 pixels**

z nabídky **Image** → **Filter Wizard**

Filtrování obrazu je nevratná operace, původní – nefiltrovaný – obraz si proto pro jistotu uložte.

• **Definování drah:**

Pro vyhodnocení zastoupení proteinu je nutné definovat jednotlivé dráhy. Pokud se srovnávají bendy vzájemně mezi dráhami, musí být linie, definující jednotlivé dráhy, stejně dlouhé; toto je *obzvláště* důležité v případě, srovnávají-li se *mobility* bendů vůči standardům.

Dráhy lze definovat buď jednotlivě nebo jako síť po celém gelu, manuálně nebo automaticky. Dráhy je vhodné nastavit o něco širší, než jsou bendy. Veškeré operace s dráhami najdete v nabídce **Lane**.

Nejrychlejší způsob, jak dráhy definovat, je automatické vyhledávání: **Lane** → **Auto Frame Lanes**; případné nedostatky lze poté napravit manuálně – např. přidat či odebrat dráhu, zakřivit dráhu podle zakřivení gelu a pod:

Lane → **Edit Frame** → **Stretch Frame**

→ **Move Frame**

→ **Rotate Frame**

→ **Resize Frame**

→ **Add/adjust Anchors...**

• **Definování bendů**

Také bendy lze vyhledat automaticky i manuálně. Každé uspořádání má své výhody i nevýhody. Opět nejrychlejší způsob je vyhledat bendy automaticky a poté manuálně přidat, upravit nebo odstranit bendy. Příkazy pro operace s bendy najdete pod nabídkou **Band**.

• Pokud je detekce bendů hotová, pro zobrazení výsledků použijete povely z nabídky **Report**. Lze zobrazit výsledky ze všech drah najednou nebo zobrazovat dráhy po jedné. Výsledky lze také exportovat do textového souboru.

Převedení obrázku z formátu tif na formát jpg:
File → **Save As** → z nabídky formátů zvolit jpg.

Popsané obrázky naskenovaného gelu budou součástí protokolu.

C) Strukturní a funkční analýza proteinů

Místně řízená mutagenese spolu s určením kinetických parametrů enzymů se stala klíčovou metodou pro studium vztahů mezi strukturou a funkcí proteinů. Pomocí tohoto přístupu lze v molekule proteinu detekovat aminokyselinové zbytky podílející se na katalýze přeměny substrátu, na rozpoznání a vazbě substrátu a také ty aminokyseliny, které hrají důležitou roli pro poskládání proteinu do správné kvartérní konformace, která je často podmínkou pro funkci proteinu. Může se však stát, že záměna jediné aminokyseliny má katastrofické důsledky, které vedou ke zborcení nativní struktury a ztrátě funkce proteinu. Často také mutace ovlivní pouze funkci enzymu (a nemusí se vždy jednat o negativní změnu), v některých případech je vliv nulový.

Analýzu struktury a funkce enzymu je možno provést již v nativních bakteriálních lyzátech, čímž se ušetří spousta experimentální práce spojené s izolací proteinu. Jedinou podmínkou je mít po ruce dostatečně specifický detekční systém pro daný protein. V této části si ukážeme, jak lze analyzovat strukturu a funkci Zm: p60.1 v bakteriálních lyzátech pomocí nativní elektroforézy a jaký dopad má záměna jedné aminokyseliny na kvartérní strukturu a následně pak i funkci proteinu.

Nativní PAGE

Tato elektroforéza se provádí v nepřítomnosti SDS a za důsledného chlazení aparatury, abychom udrželi protein v nativním a tedy aktivním stavu. K separaci proteinu nativní PAGE dochází na základě velikosti, náboje a také na tvaru proteinu. Elektrický náboj proteinu závisí na aminokyselinovém složení proteinu a jeho posttranslačních modifikacích. Celkový povrchový náboj proteinu se může měnit podle pH použitého elektroforetickém pufru. Pokud se provede nativní elektroforéza za neutrálního pH, je pak tato metoda použitelná pro studium procesů, při kterých se mění náboj (např. při chemické degradaci proteinu – deamidace) nebo pro studium konformace proteinu (oligomerizace, tvorba agregátů, rozvolnění struktur, protein-protein nebo protein-ligand interakce).

Využívá se opět diskontinuálního průběhu separace (viz SDS PAGE).

Vizualizace proteinu můžeme provést specificky např. barvení na základě aktivity enzymu pomocí chromogenních substrátů (v případě naší β -glukosidasy: 6-bromo-2-naftyl- β -D-glukopyranosid – BNGP, 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside - MUG) nebo po přenesení na membránu Western blottingem a následnou detekcí pomocí série protilátek. Lze použít také nespecifického barvení Coomassie Brilliant Blue.

Experiment:

K ověření katalytické schopnosti $(His)_6Zm.p60.rm$ (rekombinantní derivát β -glukozidázy a jeho mutantní formy) proteinů X a Y použijeme aktivní barvení na nativní PAGE s využitím substrátu 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside (MUG). V místě bendu odpovídajícímu β -glukosidase dojde ke štěpení glukosidické vazby v molekule substrátu za tvorby fluorescenčního produktu viditelného působením UV záření. Kvartérní strukturu budeme analyzovat pomocí western blotingu.

Na nativní gely nanese nativní lyzáty proteinu X a Y. Podle stanovené koncentrace proteinů v těchto lyzátech si každá skupina připraví dva vzorky. Vzorek, který bude nanesen na gel a následně použit na aktivní barvení bude obsahovat 100 μ g na jamku (viz obrázek níže gel č. 1) proteinu a

vzorek použitý pro western blotting a následnou detekci pomocí protilátek 20 µg na jamku (viz obrázek níže gel č. 2). Vzorky označte X nebo Y, podle proteinu, s kterým pracujete a číslem skupiny.

Gel č. 1 : Aktivitní barvení pomocí MUGu - substrátu beta glukosidasy – **FUNKČNÍ ANALÝZA**

X skup. č.1	Y skup. č.2	-	X skup. č.3	Y skup. č.4	-	X skup. č.5	Y skup. č.6	-	-

Gel č. 2 : specifická detekce beta-glukosidasy pomocí série dvou protilátek po přenesení na membránu (více viz. Western blotting)- **STRUKTURNÍ ANALÝZA**

X skup. č.1	Y skup. č.2	-	X skup. č.3	Y skup. č.4	-	X skup. č.5	Y skup. č.6	-	-

Elektroforézu necháme běžet při 15 – 30 mA za konstantního napětí po dobu 1-2 hod.

Elektroforetický pufr : 25 mM Tris-Cl, pH 8,3
192 mM glycin

Gel č.1: aktivitní barvení:

- Po dokončení elektroforézy ekvilibrujeme gel 2 x 30 min v 50 mM citrát/fosfátovém pufru (pH 5,5) při 4°C.
- Gel vložíme na cca 5- 15 min do barvicího roztoku
- Detekce proužků na transluminátoru, focení.

Barvicí roztok: 50 mM citrát/fosfátový pufr
0,8 mM polyvinylpyrrolidon
3 mM MUG

Gel č.2: Western blotting

Western blotting

Jednou z hojně používaných specifických technik detekce proteinů na polyakrylamidovém gelu je Western blotting. Pro některé účely (hmotnostní spektrometrie, imunoanalýza apod.) je výhodné převést separované proteiny z gelu na membránu. Mezi nejčastěji používané materiály membrán patří nitrocelulóza (má však špatné mechanické vlastnosti) a polyvinylidendifluorid (PVDF). PVDF membrány jsou mechanicky velmi odolné a vykazují vysokou vazebnou kapacitu.

Používané techniky přenosu zahrnují kapilární a elektrický transfer, pro svou časovou nenáročnost je zvláště rozšířen polosuchý (semi-dry) Western blotting.

Imunochemická detekce proteinu na membráně se provádí pomocí série dvou protilátek.

První protilátka reaguje imunochemicky s detekovaným proteinem za tvorby komplexu. Takto vytvořený komplex je rozpoznán druhou protilátkou značenou detekovatelnou sondou (např. vázaná alkalická fosfatáza, atom izotopu atd.).

- připravit membránu PVDF, 4 papíry Whatman 3MM podle rozměru gelu
- ekvilibrace ponořením PVDF do MeOH (snížení hydrofobicity membrány)
- inkubace PVDF membrány v dd H₂O (5 minut)
- ekvilibrace papírů, gelu i membrány v transferovém pufru (10 minut)
- semi-dry elektro transfer 30 min. (proudová hustota = 5 mA na 1 cm²)
- inkubace 45 min s blokačním pufrem
- 45 min inkubovat s primární protilátkou
- promývat 3x 5 min TBST
- inkubace se sekundární protilátkou (45 min)
- promývat 3x 5 min TBST
- inkubace s detekčním pufrem (10 min)
- detekce inkubací s roztokem chromogenního substrátu (max. 5min.)
- opláchnout vodou a usušit

Roztoky : **transferový pufr**

25 mM Tris-Cl, pH 8,3
150 mM glycin
10 % methanol

TBST

20 mM Tris-Cl, pH 7,6
100 mM NaCl
0,1 % Tween-20

detekční pufr

100 mM Tris-Cl, pH 9,5
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂

blokační pufr

5 % sušené mléko v TBST

barvicí roztok: 100 mM Tris-Cl, pH 9,5

100 mM NaCl
5 mM MgCl₂
100 µg.ml⁻¹ NBT
80 µg.ml⁻¹ BCIP

Primární protilátka:

Polyklonální králičí Anti-Zm.p60.1 (LMFR-VÚVEL); 10 000 x ředěno v 5% BSA v TBST

Monoklonální myší Anti Poly His (Sigma); 10 000 x ředěno v 5% mléku v TBST

Sekundární protilátka:

Kozí IgG proti králíčímú séru značená alkalickou fosfátasou; 30000 x ředěno v 5% mléku v TBST

Kozí IgG proti myším IgG značená alkalickou fosfátasou; 20 000 x ředěno v 5% mléku v TBST

Chromogenní substrát: NBT (nitrobenzentetrazolium), BCIP(5-bromo-4-chloro-3- indolylfosfát).

Schéma praktické části Technologie rekombinantních proteinů

