I. ANALÝZA PROTEOMU

A) DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA

RNDr. Hana Konečná, 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 visualizovány 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:

1.
Vzorky patatinů z hlíz brambor /*Solanum tuberosum)* byly připraveny chromatografickou separací na DEAE celulóze.

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 pufrem 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 naneseme 50 µg vzorku ředěného rehydratačním pufrem. 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 µl 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):

1. krok: odstranění nadbytečných solí
   startovní napětí: 150 V
   čas: 30 min
2. krok: zvyšování napětí
   startovní napětí: 150 V
   konečné napětí: 1500 V
   čas: 3 h
3. krok: zvyšování napětí
   startovní napětí: 1500 V
   konečné napětí: 2500 V
   čas: 1 h
4. krok: zvyšování napětí
   startovní napětí: 2500 V
   konečné napětí: 3500 V
   celkový počet volthodin: 12000 Vh

4. 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 °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 rozmražení 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 pufrem)
7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 60 mM DTT, 0.8% ampholyte, 0.003% BPB

Ekvilibrační roztoky
1. 6 M močovina, 0,375 M Tris/Cl, pH 8,8, 2% SDS, 20% glycerol, 2% (w/v) DTT
2. 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 obsahujícím Comassie Briliant Blue G-250.

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 nádobí, 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% $AgNO_3$
0,1 g $AgNO_3$/100 g roztoku.
Připravit těsně před použitím (nepřipravovat do zásoby). Uchovávat v temnu.

Vyvíjecí činidlo
3% uhličitan sodný + formaldehyd
3 g Na_2CO_3/100 g roztoku + 50 µl 37% formaldehydu

Farmerův odbarvovač
2% $K_3Fe(CN)_6$, 3,2% $Na_2S_2O_3x5H_2O$
2 g $K_3Fe(CN)_6$/100 g roztoku
3,2 g $Na_2S_2O_3x5H_2O$/100 g roztoku
Smíchat těsně před použitím

Barvení stříbrem je možno též provést komerčně dostupným kitem.

Gely uchováváme zatavené v plastové fólii nebo vysušené mezi dvěma vrstvami.celofánu.

Sušení gelů mezi celofány
• Odbarvovací roztok 2 vyměníme za 2% glycerol a gel v roztoku ponecháme aspoň 15 minut.
• Ustřihneme 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

Mgr. Ondrej Šedo, PhD.

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 dithiothreitolem redukovány disulfidické můstky mezi cysteiny a následně jsou -SH skupiny alkylovány jodacetamidem s cílem zabránit opětovnému vytvoření těchto můstků. Po alkylaci 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 elektrosprejem a iontovou pastí jako hmotnostním analyzátorem 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
   - mikrozkumavky (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 mikrozkumavek.

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 acetonitrilem 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 acetonitrilem, 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 □-kyano skořicové v 50 % acetonitrilu s 0,1 % trifluoroctovou kyselinou

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

2. **Vlastní analýza**

   Peptidy měříme v reflektronovém 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 přídavkem 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 úkolu.

Typy zdrojů informací a nástrojů

Mgr. Ondrej Šedo, Ph.D. (sedo@post.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 ENYZME (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 prohledávacího 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.

Mgr. Radka Dopitová, Ph.D.

www.expasy.ch

The ExPASy (**Ex**pert **P**rotein **A**nalysis **Sy**stem) 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 Prosit - 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 archaebacteria 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 bud 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.

C) URČENÍ KONFORMACE 3-D PODOBNÝCH PROTEINŮ

Mgr. Tomáš Klumpler, Ph.D.

Úkol: s pomocí databáze makromolekulárních struktur **určete terciární strukturu**(y) **proteinu(ů) podobnou**(é) proteinu se **zadanou sekvenci** aminokyselin, vytvořte obrázek molekulární struktury a stručně popište výsledek

Nástroje:
1) databáze proteinových struktur PDB, http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
2) hledání struktur proteinů s podobnou 3D strukturou, např. nástroj PDBeFold http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/
3) Vizualizace výsledků, vytvoření ilustrativního obrázku, pomocí např. UCSFR Chimera (https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/)

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

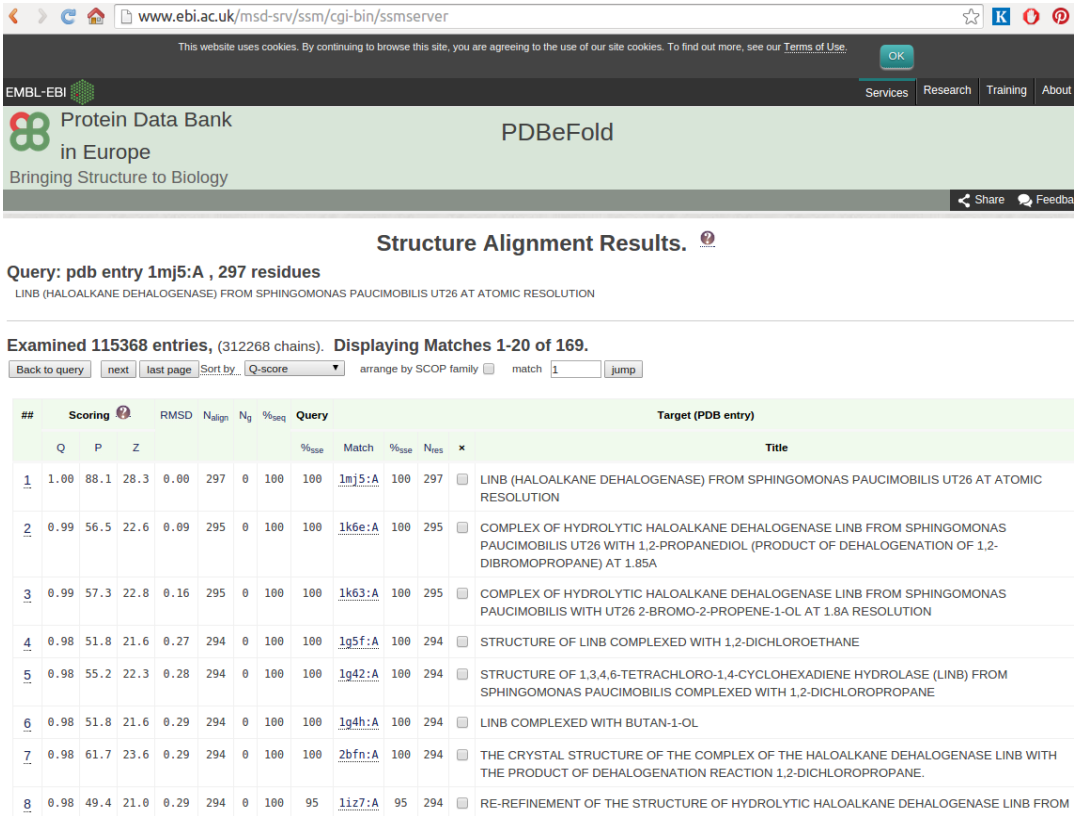
sekvence (ve formátu FASTA)

```
>1D07:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPILFQHGNPTSSYLWRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSDKLDPSGPERY
AYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVLVVHDWGSALGFDWARRHRERVQGIAYMEAIAMPIEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGE
ELVLQDNVFVEQVLPGLILRPLSEAEMAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIARDYAGWLSESPIPKLF
INAEPGALTTGRMRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGAAIAAFVRRLRPA
```

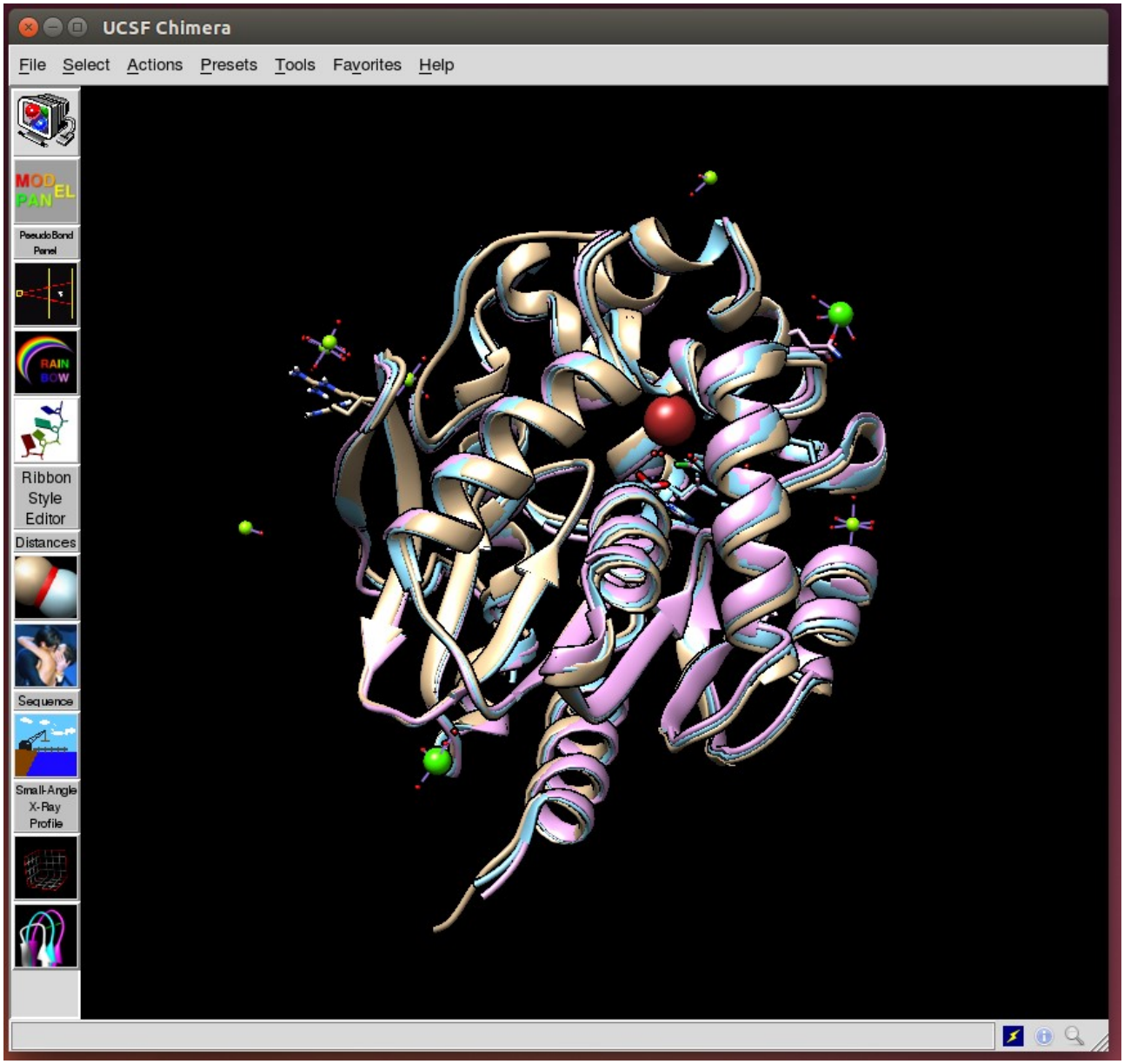
Postup:
1) vyhledání struktur s danou primární sekvencí v databázi PDB:

2) hledání strukturně podobných proteinů, pomocí např. PDBeFold

3) vizualizace a strukturní srovnaní, např. pomocí UCSF Chimera



##	Scoring			RMSD	N_{align}	N_g	$\%_{seq}$	Query	Target (PDB entry)				
	Q	P	Z					$\%_{sse}$	Match	$\%_{sse}$	N_{res}	×	Title
1	1.00	88.1	28.3	0.00	297	0	100	100	1mj5:A	100	297		LINB (HALOALKANE DEHALOGENASE) FROM SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS UT26 AT ATOMIC RESOLUTION
2	0.99	56.5	22.6	0.09	295	0	100	100	1k6e:A	100	295		COMPLEX OF HYDROLYTIC HALOALKANE DEHALOGENASE LINB FROM SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS UT26 WITH 1,2-PROPANEDIOL (PRODUCT OF DEHALOGENATION OF 1,2-DIBROMOPROPANE) AT 1.85A
3	0.99	57.3	22.8	0.16	295	0	100	100	1k63:A	100	295		COMPLEX OF HYDROLYTIC HALOALKANE DEHALOGENASE LINB FROM SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS WITH UT26 2-BROMO-2-PROPENE-1-OL AT 1.8A RESOLUTION
4	0.98	51.8	21.6	0.27	294	0	100	100	1g5f:A	100	294		STRUCTURE OF LINB COMPLEXED WITH 1,2-DICHLOROETHANE
5	0.98	55.2	22.3	0.28	294	0	100	100	1g42:A	100	294		STRUCTURE OF 1,3,4,6-TETRACHLORO-1,4-CYCLOHEXADIENE HYDROLASE (LINB) FROM SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS COMPLEXED WITH 1,2-DICHLOROPROPANE
6	0.98	51.8	21.6	0.29	294	0	100	100	1g4h:A	100	294		LINB COMPLEXED WITH BUTAN-1-OL
7	0.98	61.7	23.6	0.29	294	0	100	100	2bfn:A	100	294		THE CRYSTAL STRUCTURE OF THE COMPLEX OF THE HALOALKANE DEHALOGENASE LINB WITH THE PRODUCT OF DEHALOGENATION REACTION 1,2-DICHLOROPROPANE.
8	0.98	49.4	21.0	0.29	294	0	100	95	1iz7:A	95	294		RE-REFINEMENT OF THE STRUCTURE OF HYDROLYTIC HALOALKANE DEHALOGENASE LINB FROM


UCSF Chimera
File Select Actions Presets Tools Favorites Help
MODEL PANEL
Pseudo Bond Panel
RAIN BOW
Ribbon Style Editor
Distances
Sequence
Small-Angle X-Ray Profile

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) EXPRESE A PURIFIKACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

Mgr. Blanka Pekárová, Ph.D., MSc. Agnieszka Szmitkowska

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 fúzemi 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 směrováním 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.).

Exprese rekombinantních derivátů β-glukosidasy Zm-p60.r

Pro expresi budou použity dva druhy konstruktu 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) a 1% glukózou zaočkujeme 800 µl bakteriální kultury (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 přídavkem 0,1mM IPTG a současně sníženíme teplotu na 22 °C.
- Kultury sklízíme centrifugací (4000 rpm/20min). Pelety zamrazíme na -20°C.

Purifikace proteinu

Čistota proteinových preparátů je jedním z kriterií 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 matrici s funkční skupinou chelatující ionty přechodných iontů (Cu, Ni, Zn, Co). Funkční skupinou na matrici je obvykle iminodioctová (IDA) nebo nitrilotrioctová (NTA) kyselina. Interakce proteinu s matricí 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 pufry s pH = 7 – 8, zajišťující optimální interakci domény s kovovým iontem. V pufrech je vhodné použít vysoké koncentrace solí (0,5 – 1 M NaCl) a tím snížit nežádoucí elektrostatické interakce proteinů s matricí. 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
- Pelety resuspendujeme v sonikačním pufru (10 ml sonikačního pufru/pelet z 0,5 l 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.

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

Purifikace fúzních derivátů Zm-p60.1 na matrici Sepharose Ni^{2+}-NTA

Pro zisk 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 pufry P1 a P2 lišící se koncentrací kompetičního činidla imidazolu.

Pozn.: **Sbírame frakce po každém promytí pro následnou SDS PAGE analýzu**.

- promýt kolonku 4x3 ml vody
- promýt kolonku 1x2 ml 100 mM $NiSO_4$
  (obsazení vazebných míst nosiče kolonky Ni^{2+} ionty)
- promýt kolonku 4x3 ml vody
- promytí kolonky 4x3 ml ekvilibračního pufru (poté uzavřít spodní část kolonky)
- po nanesení lyzátu exprimovaných kultur kolonku uzavřeme, zvortexujeme a inkubujeme 30 minut při 4°C za třepání na ledu
- promýt 3x3 ml pufru P1
- eluce balastních proteinů 3x3 ml pufru P2
- eluce vlastního proteinu 4 ml pufru E obsahujícího EDTA
- frakce uschovat při 4°C pro následnou analýzu čistoty proteinu
- kolonku promýt 2 ml vody
- promýt 4 ml 20 % ethanolu (ne do sucha!)

Roztoky: Ekvilibrační pufr: 20 mM Tris pH 7,9
1 M NaCl

První promývací pufr (P1): 50 mM Tris pH 7,9
1 M NaCl
20 mM imidazol

Druhý promývací pufr (P2) : 50 mM Tris pH 7,9
1 M NaCl
50 mM imidazol

Eluční pufr (E): 20 mM Tris pH 7,9
1 M NaCl
100 mM EDTA

Demonstračně bude předvedena purifikace stejná purifikace pomocí FPLC.

Stanovení koncentrace proteinu

Koncentraci proteinů stanovíme metodou dle Bradforda při 595 nm; činidlo firmy Bio-Rad **Stanovíme koncentraci jen v nativních lyzátech !**

- 10 µl lyzátu naředíme 10 x sterilní vodou
- Připravíme tři paralerní vzorky:
  - 10 µl ředěného lyzátu doplníme sterilní vodou do celkového objemu 800 µl
  - přidáme 200 µl činidla a inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě
- změříme absorbanci při 595 nm
- z kalibrační křivky odečteme množství proteinu

B) 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 tetramethylendiamin (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 µl**
10% APS	**50 µl**
TEMED	**3 µl**
KONCENTRAČNÍ GEL (5%)	
Acrylamid G30	**250 µl**
4x separační pufr	**400 µl**
dd voda	**800 µl**
10% SDS	**16 µl**
10% APS	**25 µl**
TEMED	**1 µl**

4x dělicí pufr (1,5 M Tris-Cl pH 8,8)
4x koncentr. 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 přelít deionizovanou vodou. Po odstranění deionizované vody nalijeme směs pro koncentrační gel, vsuneme hřebínek a necháme polymerovat.

Kontrola čistoty purifikovaného proteinu

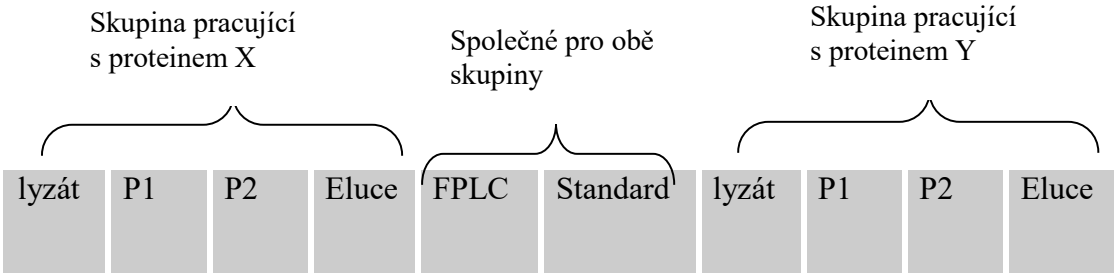
SDS-PAGE

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 Mr 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 izotachoforézy (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 bloting s následnou detekcí proteinu pomocí protilátek).

Experiment:
Našim cílem bude ověřit čistotu izolovaného proteinu. Na připravený denaturační gel naneseme postupně frakce eluované z kolonky během purifikace:



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

1. Příprava jednotlivých vzorků je znázorněna v tabulce.

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

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 **naneseme 30 µl připraveného vzorku**.

4. Elektroforézu necháme běžet při 25 mA/gel 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
Bromfenolová modř

Analýza obrazu – stanovení čistoty purifikovaného proteinu

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**

2. Vyhodnocení gelu:
Sledujete zastoupení daného proteinu ve směsi ostatních proteinů bakteriálního lyzátu. Tento poměr se vyjadřuje jako *čistota vzorku.* Čistotu budeme analyzovat v programu Gel analyzer.
Popsané obrázky naskenovaného gelu budou součástí protokolu.

Strukturní a funkční analýza proteinů

Místně řízená mutageneze 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. barvením 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 s následnou detekcí pomocí série protilátek. Lze požít také nespecifického barvení Coomassie Brilliant Blue.

Experiment:

K ověření katalytické schopnosti $(His)_6$Zm.p60.rm (rekombinantní derivát β – glukozidázy a jeho mutantní formy) proteinů X a Y použijeme aktivitní barvení na nativní PAGE s využitím substrátu 4-methylumbelliferyl-β-D-glucopyranoside (MUG). V místě bendu odpovídajícímu β–glukozidáze dojde ke štěpení glukosidické vazby v molekule substrátu za tvorby fluorescenčního produktu viditelného působením UV záření. Kvartérní strukturu budeme analyzovat pomocí imunodetekce.

Na nativní gely naneseme 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 aktivitní barvení bude obsahovat 100 µg na jamku (viz obrázek níže gel č. 1) proteinu a vzorek použitý pro přenos na membránu s následnou detekcí 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 β-glukosidasy pomocí série dvou protilátek po přenesení na membránu (více viz. Imunodetekce)- **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 v chladové místnosti při 25 mA/gel 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 ve vychlazeném 50 mM citrát/fosfátovém pufru (pH 5,5) při 4°C.
- Gel vložíme na cca 10 min do barvícího roztoku při RT
- Detekce proužků na transluminátoru, focení.

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

Gel č.2: Imunodetekce na membráně

Imunodetekce

Jednou z hojně používaných specifických technik detekce proteinů je imunodetekce. 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) přenos.

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 H_2O (5 minut)
- ekvilibrace papírů, gelu i membrány v transferovém pufru (10 minut)
- semi-dry elektro transfer 30 min. (proudová hustota = 5 mA na 1 cm^2)
- 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 $MgCl_2$

blokační pufr
5 % sušené mléko v TBST

barvící roztok: 100 mM Tris-Cl, pH 9,5
100 mM NaCl
5 mM $MgCl_2$
100 $\mu g.ml^{-1}$ NBT
80 $\mu g.ml^{-1}$ 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 králičímu séru značená alkalickou fosfatázou; 30000 x ředěno v 5% mléku v TBST
Kozí IgG proti myším IgG značená alkalickou fosfatázou; 20 000 x ředěno v 5% mléku v TBST
Chromogenní substrát: NBT (nitrobenzentetrazolium), BCIP(5-bromo-4-chloro-3- indolylfosfát).

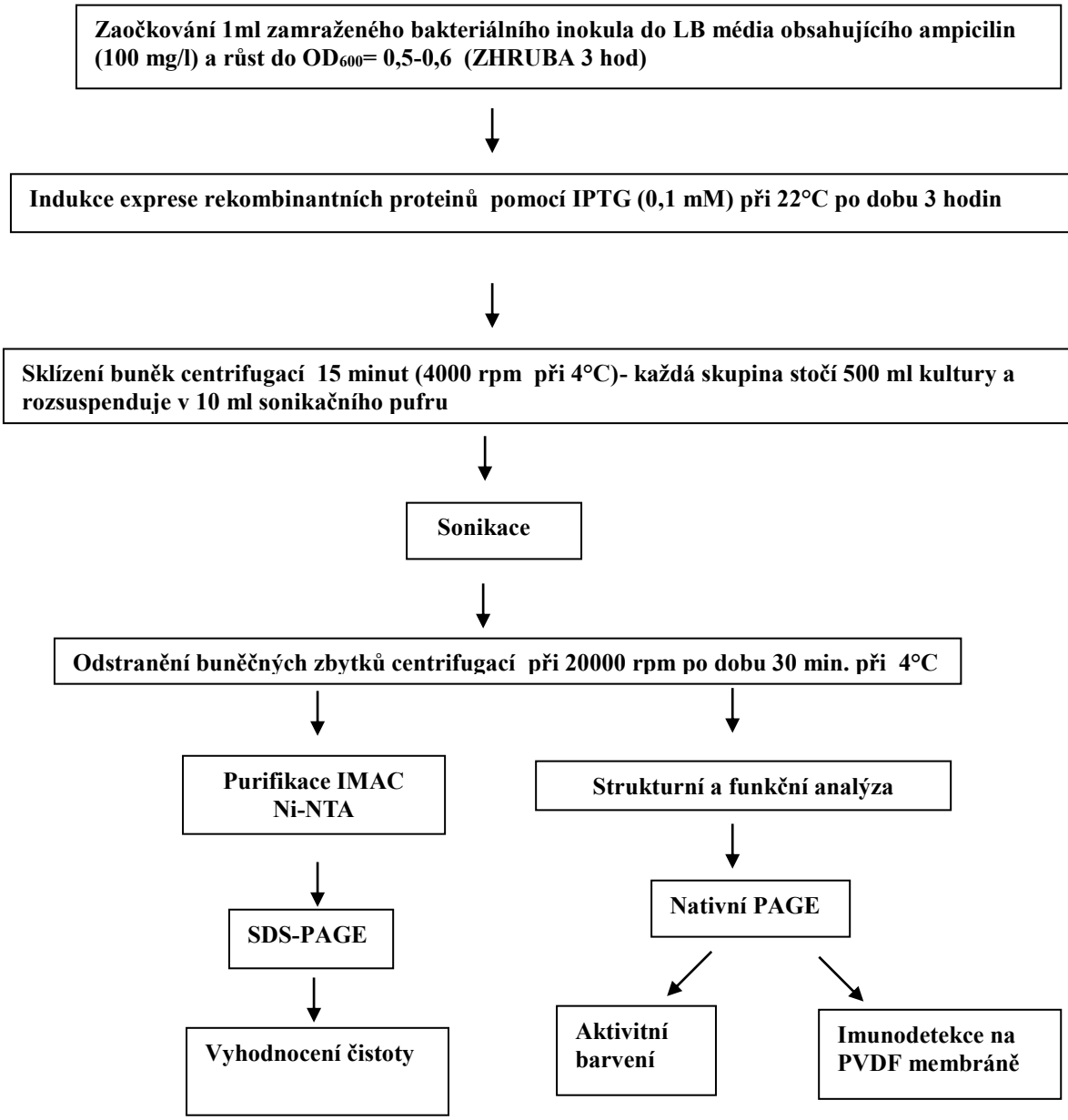



Schéma praktické části Technologie rekombinantních proteinů