

I. ANALÝZA PROTEOMU

A) PŘÍPRAVA VZORKU PRO HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII

Mgr. Gabriela Lochmanová, PhD.

1. Odstranění SDS ze vzorku proteinů metodou SP3
2. In-gel digest
3. Obohacení fosfopeptidů

Proteomický vzorek: proteiny extrahované ze zmrazeného prášku *Arabidopsis thaliana* (listy drcené v kryomlýně za přítomnosti kapalného dusíku), solubilizované v SDT pufru (4% SDS; 0,1M dithiotreitol; 0,1M Tris-HCl, pH 7,6) za teploty 95 °C po dobu 30 min.

Protokoly pro solubilizaci a denaturaci proteinů často používají velmi účinný surfaktant dodecylsulfát sodný (SDS). Přítomnost SDS v lyzačních roztocích však může vést k potlačení MS signálu a snížení aktivity proteáz při digesci. Proto je třeba v určité fázi přípravy SDS ze vzorku eliminovat. Mezi relativně nové techniky odstranění SDS z proteinového vzorku patří **SP3**.

1. SP3

Metoda **Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation (SP3)** je založena na neselektivním navázání proteinů na modifikované (např. karboxylované) paramagnetické částice (kuličky). Proteiny imobilizované na těchto částicích jsou za přítomnosti magnetu promyty a kontaminanty (např. SDS) tak odstraněny. Působením proteázy jsou proteiny specificky štěpeny na sadu peptidů. Digesce se provádí přímo na kuličkách. Trypsin štěpí protein za lysinem nebo argininem směrem k C-konci peptidu. Po separaci kuliček pomocí magnetu se MS analýza peptidů uvolněných do roztoku provádí už bez dalšího přečištění.

Zpracovávané proteomické vzorky vždy označujte číslem skupiny.

Vzorek (původní koncentrace 4,26 µg/µl) byl naředěn 1x SDT puforem na 3 µg/µl; uložen v mrazáku 117, krabička Cvičení Proteomika 2022)

Promyté mag. kuličky a SOLu-T jsou v lednici ve 117 v polystyrenovém stojánku Cvičení proteomika 2022.

Dále je připraveno:

- předchlazený Bioruptor na 4 °C
- malá vodní lázeň, plovák na 1,5ml zkumavky (z digestoře ve 116)
- 6x stojánek s pipetami a špičkami
- stojánky na 2ml a 0,5ml zkumavky
- magnetické stojánky
- 45µm PTFE filtry
- MilliQ voda
- kádinka „WASTE“ na tuhý odpad, lahvička „WASTE“ na tekutý odpad
- 100 % EtOH v 1,5ml zkumavce- v lednici pro každou skupinu připraven alikvot 100mM DTT, 100mM IAA, 50mM AB
- v lednici připraven zásobní roztok promytých paramagnetických kuliček a 0,1 µg/µl SoLu-trypsinu

vzorek	c (µg/µl)	objem pro SP3
AT	3,00	30 µl

	SP3
9:15 – 11:00	Sonikace AT lyzátu v Bioruptoru (3x 100 µl v 1,5ml zkumavkách): 5 cyklů (30 s ON / 30 s OFF) při 4 °C
	Alkylace: Ke 30 µl vzorku v 2ml zkumavce (V shape) přidat 7,5 µl 100mM jodoacetamidu (finální koncentrace 20mM IAA). Inkubace 30 min, RT, 600 rpm, tma.
	Ukončení alkylace: Přidat 2 µl 100mM DTT (finální koncentrace 5 mM)
	Ručně protřepat předem promyté magnetické kuličky ve zkumavce (ne vortex!). Ke vzorku přidat 30 µL kuliček (600 µg), propipetovat. Vazba proteinů na kuličky: přidat 70 µL 100% etanolu (finální koncentrace 50% EtOH). <u>Krátce</u> propipetovat, inkubace 24 °C, 10 min, 1 000 rpm. Odseparovat kuličky na magnetickém stojánku - 2 min, RT. Odstranit roztok.
	Promytí (odstranění kontaminant): Vyndat vzorek z magnetického stojánku, přidat 140 µl 80% etanolu. Propipetovat. Odseparovat kuličky na magnetickém stojánku - 2 min, RT. Odstranit roztok. Promytí zopakovat ještě 3x. Přidat 140 µl 80% etanolu. Propipetovat, přendat do nové 2ml zkumavky. Odseparovat kuličky na magnetickém stojánku - 2 min, RT, odstranit veškerý roztok a pokračovat s digescí.
	Digestce: Vyndat vzorek z magnetického stojánku, přidat 20 µl 0,1 µg/µl SOLu-T v 50mM AB. Přidat 40 µl 50mM AB. Nepochipetovávat! Vzorky sonikovat 30 s ve vodní lázni.
11:00 – 15:00	Inkubace 4 h, 37 °C, 1000 rpm v termomixéru.
15:00 – 15:30	Odebrání peptidů: Odseparovat kuličky na magnetickém stojánku - 2 min, RT. Odebrat roztok s peptidy do 0,5ml zkumavky. Vyndat zkumavku z magnetického stojánku, promýt kuličky 60 µl 50mM AB, propipetovat. Odseparovat kuličky na magnetickém stojánku - 2 min, RT. Roztok s peptidy přidat do 0,5ml zkumavky. Odstranit zbylé kuličky pomocí PTFE filtru (45 µm), centrifugace 600 g (minispin). Z celkového objemu vzorku (cca 120 µl) odebrat do 0.5 ml zkumavek alikvot 1/6 pro celoproteomovou analýzu – „ID“, 5/6 dát vysušit ve vakuovém koncentrátoru pro následné obohacení na fosfopeptidy – „Ph“. Následující den dokončit přípravu vzorku pro LC-MS/MS (kyselá extrakce).

2. In-gel digest

Obarvené proužky vybraných proteinů jsou nejprve vyříznuty z gelů připravených 1-D elektroforézou. Vyříznuté kousky gelu s proteiny jsou odbarveny střídavým promýváním v acetonitrilu a roztoku hydrogenuhličitanu amonného. Ke vzorkům je přidána proteáza (obvykle trypsin). Působením proteázy jsou proteiny specificky štěpeny na sadu peptidů. Soubor takto vzniklých peptidů je specifický pro daný protein (tzv. peptidová mapa). Po ukončení inkubace jsou peptidy extrahovány okyseleným vodným roztokem acetonitrilu.

Vstupní vzorek = 1D gel předem připravený technikem.

Předem připravené zásobní roztoky: MilliQ voda (MQ); 50mM hydrogenuhličitan amonný (AB); acetonitril (ACN); 50mM hydrogenuhličitan amonný/acetonitril v poměru 1:1 (AB/ACN); SoLu-T 5 ng/μl;

Dále je připraveno:

- obrázek gelu společně s molekulovým žebříčkem
- skalpel
- stojánky na 2ml a 0,5ml zkumavky
- malá vodní lázeň, vymrazovací destička na 0,5ml zkumavky (+ stojánek a víčko ze starého termomixéru)
- 6x stojánek s pipetami a špičkami
- MilliQ voda
- kádinka „WASTE“ na tuhý odpad, lahvička „WASTE“ na tekutý odpad
- 100 % ACN v 0,5ml zkumavce- v lednici pro každou skupinu připraven alikvot 50mM AB
- v lednici připraven zásobní roztok 0,1μg/μl SoLu-trypsinu

	Zkrácená in-gel digesce
11:00 – 11:30	Vyříznout proužek z gelu, přenést do 0,5ml zkumavky, promýt 100μl MQ - 2x 10min v termomixéru, RT, 750 rpm.
11:30 – 12:30	OBĚD
13:30	Proužek promýt 100 μl AB/ACN – 15 min v termomixéru, RT, 750 rpm, odsát. Proužek promýt 50 μl ACN – 5 min v termomixéru, RT, 750 rpm, odsát.
	Promytí gelu: K proužku přidat 20 μl AB, do vymrazovací destičky, sonikátor 5 min. Neodsávat! Přidat 20 μl ACN, sonikátor 5 min, odsát. Přidat 20 μl ACN, sonikátor 5 min, odsát. Vysušit ve vakuovém koncentrátoru – 5 min.
14:45	Digesce: Ke gelu přidat 25 μl 5 ng/μl SoLu-T, inkubace 4 °C, 45 min. Inkubace v termomixéru 40 °C, 2 h. Následující den dokončit přípravu vzorku pro LC-MS/MS (kyselá extrakce).

Ukončení přípravy vzorků pro LC-MS/MS

Vstupní vzorek = 1) digest z SP3 kuliček, 2) in-gel digest

Předem připravené zásobní roztoky: MilliQ voda (MQ); acetonitril (ACN); 5% kys. mravenčí (FA)

Dále je připraveno:

- stojánky na 0,5ml a 2ml zkumavky
- vymrazovací destička na 0,5ml zkumavky (+ stojánek a víčko ze starého termomixéru)- malá centrifuga
- 6x stojánek s pipetami a špičkami

	Ukončení přípravy vzorku pro LC-MS/MS
9:00	Digest z SP3 kuliček vzorek „ID“ přenést do LC-zkumavky, provést kyselou extrakci: - Zkumavku od vzorku propláchnout 25 µl 5% FA + 25 µl 100% ACN, 10 s vortex, přidat do LC-zkumavky. - Zkumavku od vzorku propláchnout 100 µl 100% ACN, 10 s vortex, přidat do LC-zkumavky. - Zakoncentrovat ve vakuovém koncentrátoru na objem <= 15 µl. Vzorek připraven pro LC-MS/MS.
	In-gel digest – odpipetovat volný roztok do 0,5ml zkumavky a ke gelu přidat extrakční roztok 25 µl 5% FA + 25 µl 100% ACN (gel musí být ponořený), 5min sonikace ve vodní lázni ve vymražené destičce. Roztok přidat do 0,5ml zkumavky. - Ke gelu přidat 100 µl 100% ACN, 10 s vortex, roztok přidat do 0,5ml zkumavky. - Zakoncentrovat ve vakuovém koncentrátoru na objem <= 30 µl. Vzorek připraven pro MALDI-TOF MS. .
9:30	Zakoncentrování vzorků.
10:30	Nanesení vzorků do autosampleru a začátek LC-MS/MS analýzy.

3. Obohacení fosfopeptidů

Afinitní obohacení fosfopeptidů z proteinové směsi bude provedeno kitem High-Select™ TiO₂ Phosphopeptide Enrichment Kit (Termofisher Scientific). Obohacení je založeno na selektivní vazbě negativně nabitých fosfátových skupin peptidů na oxid kovu. Jedná se o tzv. Metal Oxide Affinity Chromatography (MOAC). Eluce z MOAC probíhá uvolněním negativně nabitého fosfátu alkalickým pufrům.

Vstupní vzorek = přečištěná a vysušená peptidová směs získaná po SP3.

Dále je připraveno:

- stojánky na 2ml zkumavky
- malá centrifuga
- 6x stojánek s pipetami a špičkami

	Obohacení fosfopeptidů
9:30	Peptidy rozpustit ve 150 µl Binding/Equilibration buffer. Příprava sorbentu: Vložit adaptér do 2ml zkumavky, do něj TiO ₂ Spin Tip. Přidat 20 µl Wash buffer, centrifugace 3000 g, 2 min. Přidat 20 µl Binding/Equilibration buffer, centrifugace 3000 g, 2 min. Odstranit "flowthrough". Zachovat zkumavku pro pozdější promývání.
	Vazba fosfopeptidů: TiO ₂ Spin Tip s adaptérem přenést do nové 2ml zkumavky. Nanést 150 µl vzorku na sorbent. Centrifugace 1000 g, 5 min. Zopakovat nanesení vzorku na sorbent. Centrifugace 1000 g, 5 min.
	Promytí: TiO ₂ Spin Tip s adaptérem přenést do "promývací" 2ml zkumavky. Promýt sorbent 20 µl Wash buffer. Centrifugace 3000 g, 2 min. Zopakovat promytí ještě 2x. Promýt sorbent 20 µl H ₂ O. Centrifugace 3000 g, 2 min.
10:30	Eluce fosfopeptidů: Odstranit zbytkovou tekutinu z TiO ₂ Spin Tip poklepáním na ubrousek a přenést i s adaptérem do nové 2ml zkumavky. Přidat 50 µl Phosphopeptide Elution buffer. Centrifugace 1000 g, 5 min. Zopakovat 1x. Ihned vysušit eluát ve vakuovém koncentrátoru do finálního objemu 1-3 µl. Provést kyselou extrakci do LC-zkumavky (25 µl 5% FA + 25 µl 100% ACN, 10 s vortex), redukce objemu ve vakuovém koncentrátoru na 10 µl. Vzorek připraven pro LC-MS/MS.

B) HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PROTEINŮ

Mgr. Ondrej Šedo, PhD.

Po separaci 1-D elektroforézou bude pro identifikaci vybraných proteinů použita MALDI-TOF MS a MS/MS, pro identifikaci složek proteinových směsí bude využito separace peptidů kapalinovou chromatografií v on-line spojení s MS (LC-ESI-QTOF-MS/MS). Studenti se seznámí s metodou analýzy proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie a budou samostatně identifikovat vybrané proteiny na základě srovnání získaných dat s proteinovými databázemi.

Teoretický úvod

MALDI-TOF MS

Hmotnostní spektrometrie s desorpčí a ionizací za přítomnosti matrice a separací iontů v průletovém analyzátoru (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) je v současné době jednou z nejrozšířenějších metod identifikace proteinů, resp. určení jejich primární struktury. V našem případě budou použity metody založené na srovnání molekulových hmotností peptidů vzniklých proteolýzou analyzovaného proteinu (peptide mapping, peptide mass fingerprinting) a molekulových hmotností fragmentů vzniklých rozpadem získaných peptidů přímo v hmotnostním analyzátoru (MS/MS – tandem mass spectrometry, MS/MS-ion search) s proteinovými databázemi.

Extrakt peptidů získaný in-gel digescí je smíchán s MALDI matricí, nanesen na vzorkovací desku a po krystalizaci je analyzován pomocí MALDI-TOF MS. Pro analýzu bude použit přístroj Ultraflex extreme (Bruker, Brémy, Německo). Výsledkem hmotnostně spektrometrické analýzy jsou přesné molekulové relativní hmotnosti peptidů. Jejich soubor 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. Pro spolehlivou identifikaci je pak zapotřebí peptidy identifikovat poté, co je provedena jejich fragmentace v hmotnostním analyzátoru a detekovány jsou produkty jejich rozpadu. Získané signály jsou následně opět přiřazeny ke známým sekvencím teoretických proteolytických peptidů odvozených z dostupných proteinových databází.

LC- MSMS

Výhodou hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem je možnost on-line spojení 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 peptidů získaných po SP3 a fosfopeptidů po afinitním obohacení bude 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 Impact II (Bruker, Brémy, Německo). Pro identifikaci jsou pak srovnávány soubory naměřených hmotností fragmentů jednotlivých peptidů pomocí prohledávacích programů (např. Mascot, Protein Prospector) s proteinovými databázemi.

MALDI-TOF MS analýza

1. Příprava peptidového extraktu k analýze

- matrice - nasycený roztok kyseliny alfa-kyano-4-hydroxyskořicové ve směsi acetonitrilu a 5% trifluoroctové kyseliny (1:1, v/v)

Peptidový extrakt smícháme 1:4 s matricí a výsledný roztok (0,6 µl) nanese na vzorkovací desku. Po zaschnutí je vzorek připraven k analýze.

2. Vlastní analýza

Peptidy zanalyzujeme v reflektrotonovém pozitivním módu a za použití externí kalibrace na směs standardních peptidů. Vybrané ionty pak podrobíme izolaci iontovou branou a MS/MS analýzou stanovíme molekulové hmotnosti jejich fragmentů vzniklých rozpadem během průletu analyzátozem.

LC-MSMS analýza

1. LC analýza

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

2. Vlastní analýza

Ionty generované elektrosprejem jsou v opakovaných cyklech podrobovány MS analýze a vybrané ionty poté izolovány kvadrupólem, štěpeny v kolizní cele, a jejich fragmenty zanalyzovány v průletovém analyzátozem (MS/MS analýza).

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

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>)

2. Nástroje

– 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
 - 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://phospho.elm.eu.org/>)
 - hmotnostní spektra pro MALDI-TOF, 2-D gely, identifikace z gelu
 - SwissProt 2-D PAGE (<http://www.expasy.ch/ch2d/>)
 - ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu/>)
 - nomenklatura enzymů
 - SwissProt ENZYME (<http://www.expasy.ch/enzyme/>)

Vyhodnocení MS a MS/MS dat (samostatná práce)

Po seznámení s nejdůležitějšími zdroji dat a nástroji pro studium proteinů přístupných na Internetu data získaná MALDI-MS, MALDI-MS/MS a LC-MS/MS analýzou (molekulové hmotnosti peptidů a jejich fragmentů) zadáme do prohlídacího programu Mascot (Matrix Science) s příslušnými parametry a identifikujeme dominantní proteiny z bandů a směsí připravených SP3 a po izolaci fosfopeptidů.

Poznámka:

LC-MS/MS analýza bude provedena z části demonstrační formou z časových a kapacitních důvodů. Studenti obdrží seznam molekulových hmotností peptidů a jejich fragmentů pro každý analyzovaný vzorek a vlastní identifikaci proteinů si každý student provede sám.

C8302 Základy proteomiky – cvičení

PROTOKOL I.

Jméno	
UČO	
Obor, ročník	
Č. skupiny	
E-mail	
Datum	
Název úlohy	ANALÝZA PROTEOMU

A) PŘÍPRAVA VZORKU PRO HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII

- Výstup z přípravy vzorku metodou SP3:
 - 1) Vypočtete potřebný objem roztoku 0,1 µg/µl trypsinu pro štěpení 30 µl proteinové směsi o koncentraci proteinů 3,0 mg/ml, bude-li poměr enzym : substrát = 1:45.

.....µl trypsinu

2) Specifikujte použitou metodu MS analýzy:

- Výstup z in-gel digesce:
 - 1) přiložte obrázek naskenovaného gelu
 - popište žebříček proteinového standardu
 - vyznačte na skenu protein, který byl vyřezán, enzymaticky naštěpen a analyzován MS
 - odhadněte molekulovou hmotnost analyzovaného proteinu:kDa
 - 2) Specifikujte použitou metodu MS analýzy:
- Výstup z přípravy vzorku pro fosfoanalýzu:
 - 1) Specifikujte použitou metodu MS analýzy:

B) HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PROTEINŮ

- Analýza in-gel digestu

1) Identifikace dominantního proteinu peptidovým mapováním

Název proteinu	MASCOT skóre	Molekulová hmotnost (kDa)	Pokrytí sekvence (%)

Odpovídá teoretická molekulová hmotnost pozici na gelu?

2) Sekvence dominantního tryptického peptidu MS/MS

Sekvence peptidu	MASCOT skóre	Název proteinu

Odpovídá výsledek MS/MS analýzy výstupu peptidového mapování?

.....

- Analýza vzorku připraveného SP3

1) Identifikace proteinů – dominantní proteiny

Název proteinu	MASCOT skóre	Molekulová hmotnost (kDa)	Pokrytí sekvence (%)

Kolik bylo identifikováno fosfopeptidů?

.....

2) Prohledání s tolerancí chyb – pro jeden vybraný peptid z dominantního proteinu

Sekvence peptidu	Lokalizace a typ modifikace	Pravděpodobná příčina modifikace

- Analýza vzorku fosfopeptidů

1) Identifikace proteinů – dominantní proteiny

Název proteinu	MASCOT skóre	Molekulová hmotnost (kDa)	Počet fosforylací

2) Spolehlivost lokalizace fosforylace – pro jeden vybraný peptid

Sekvence peptidu	Pozice fosforylované aminokyseliny	Pravděpodobnost lokalizace (%)

Hledání v databázi proteinů.

Mgr. Radka Dopitová, Ph.D.

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 P492351
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 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 bgIB and ascB) and from Erwinia chrysanthemi (gene arbB).

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

* 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 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 databázi? 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 specifikou, podobnost s jinými proteiny, 3D strukturu.

- The ExPASy (Expert Protein Analysis System) [proteomics](#) server of the [Swiss Institute of Bioinformatics](#) (SIB) je vytvořen pro analýzu proteinové sekvence a struktury

www.expasy.ch

- Struktura proteinu, pokud byl protein krystalizován a nebo byla zjištěna sekvence pomocí NMR, tak lze nalézt na webových stránkách: <https://www.rcsb.org/>

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.

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 sekvencí** 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
MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPIILFQHGNTSSYLWRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGSDKLDPSGPERY
AYAEHRDYL DALWEALDLGDRVVLVVDWGSALGFDWARRHRERVQGIAYMEAIAMPIEWADFPEDRDLFQAFRSQAGE
ELVLQDNVFEQVLPGLILRPLSEEMAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIARDYAGWLSESPKLF
INAEFGALTTGRMRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGAAIAAFVRLRPA
```

Postup:

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

The screenshot shows the RCSB PDB website interface. The search bar at the top right contains the sequence `MSL_GAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPIILFQHGNTSS`. Below the search bar, a dropdown menu displays search results for the sequence, including options like 'Very significant (E Cut Off:0.001) to MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEG...', 'Significant (E Cut Off:0.01) to MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEG...', 'Includes Insignificant (E Cut Off:1) to MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEG...', and 'Extended Search (E Cut Off:10) to MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEG...'. The main content area features a 'Welcome' message and a 'A Structural View of Biology' section. A 3D molecular model of a protein is visible, labeled 'Lead Poisoning'. The footer includes 'Latest Entries', 'New Features', 'News', and 'Publications'.

Search Parameter:

Text Search for:
 ms1gakpfgekffieikgrmayidegtgdp1lfqhgntssylwrnimphcaigrliacdligmgsdkldpsqpery
 ayaehr dyldalwealdigdrvv1vvhdwgsalgf dwar rhrervqgiaymeaiampiewad fpeqdr dlfqaf rsqage
 elv1qdnvfveqvlpg1l1rp1seemaayrepflaagearrpt1swprqipiagtpadvvaiaardyagwlsespiklf
 inaepgalttgrmrdfcrtpwngteitvagahfiqedspeigaaiiaafvrrlrpa

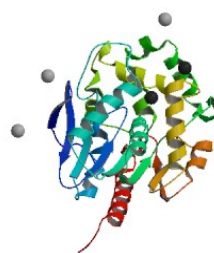
Refine Search Save Search to MyPDB

Refinements

Currently showing 1 - 1 of 1 Page: 1 of 1 Displaying 25 Results

ORGANISM	Sphingomonas paucimobilis ... (1)
UNIPROT MOLECULE NAME	Haloalkane dehalogenase (1) Refine Query
TAXONOMY	Bacteria only (1)
EXPERIMENTAL METHOD	X-ray (1)
X-RAY RESOLUTION	0.9 and more (1) Refine Query
RELEASE DATE	Aug 2003 (1) Refine Query

View: Detailed Reports: Select one... Sort: Sort by...
 Download Files



3D View

1MJ5

LINB (haloalkane dehalogenase) from sphingomonas paucimobilis UT26 at atomic resolution

[Oakley, A.J.](#), [Damborsky, J.](#), [Wilce, M.C.](#)

Crystal structure of haloalkane dehalogenase LinB from Sphingomonas paucimobilis UT26 at 0.95 Å

2) hledání strukturně podobných proteinů, pomocí např. PDBeFold

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

www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/cgi-bin/ssmsserver

This website uses cookies. By continuing to browse this site, you are agreeing to the use of our site cookies. To find out more, see our [Terms of Use](#).

EMBL-EBI Protein Data Bank in Europe PDBeFold

Bringing Structure to Biology

Share Feedback

Structure Alignment Results.

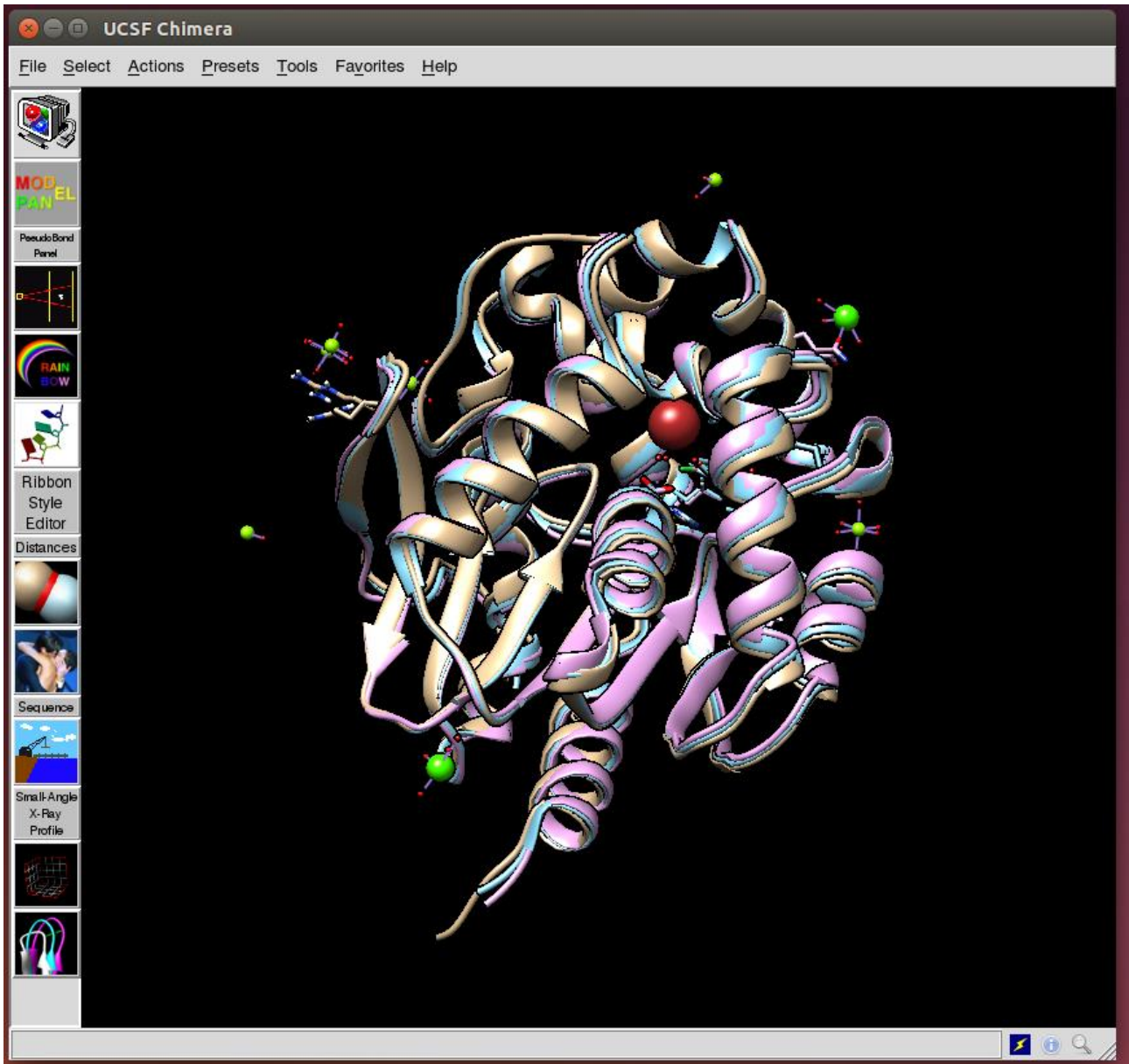
Query: pdb entry 1mj5:A , 297 residues

LINB (HALOALKANE DEHALOGENASE) FROM SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS UT26 AT ATOMIC RESOLUTION

Examined 115368 entries, (312268 chains). Displaying Matches 1-20 of 169.

Back to query next last page Sort by: Q-score arrange by SCOP family match 1 jump

##	Scoring			RMSD	N _{align}	N _g	% _{seq}	Query				Target (PDB entry)			
	Q	P	Z					% _{ssse}	Match	% _{ssse}	N _{res}	x	Title		
1	1.00	88.1	28.3	0.00	297	0	100	100	1mj5:A	100	297	<input type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/>	LINB COMPLEXED WITH BUTAN-1-OL		
7	0.98	61.7	23.6	0.29	294	0	100	100	2bfn:A	100	294	<input type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/>	RE-REFINEMENT OF THE STRUCTURE OF HYDROLYTIC HALOALKANE DEHALOGENASE LINB FROM		



II. TECHNOLOGIE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

Nedostupnost dostatečných množství homogenních preparátů biologicky významných eukaryotních proteinů byla jedním ze základních omezení jejich studia. Tento limitující faktor byl odstraněn rozvojem molekulárně biologických technik, umožňujících produkci studovaných eukaryotních proteinů v dostatečném množství. Důležitým předpokladem bylo vypracování technik jejich produkce v heterologních, převážně bakteriálních expresních systémech. Protože prokaryotní transkripční aparát nedokáže odstranit nekódující oblasti eukaryotních 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

Ing. Blanka Pekárová, Ph.D., Mgr. Lucia Baďurová, Mgr. Eliška Špačková

Častým průvodním jevem nadprodukce eukaryotních proteinů je vytváření nerozpustných útvarů v bakteriální cytoplazmě, složených obvykle z nekorektních konformerů rekombinantního proteinu, označovaných jako inkluzní tělíčka. Důvodem jejich tvorby může být absence eukaryotních chaperonů nebo post-translačně modifikačních systémů a někdy i toxicita rekombinantních eukaryotních 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 -glukosidasy Zm-p60.r

Pro expresi budou použity dva druhy konstruktů pRSET A::Zm.p60.r, z nichž jeden je divoký typ (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, 200 rpm do OD₆₀₀ 0,5-0,6.
- Poté zahájíme 3 hodinovou indukci exprese rekombinantního proteinu přidávkem 0,1mM isopropyl β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) a současně snížíme teplotu na 22 °C.
- Kultury sklízíme centrifugací (4000 rpm/20 min). Pelety zamrazíme na -20 °C.

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 chromatografii**.

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, pracujeme na ledu
- Pelety resuspendujeme v sonikačním pufru (10 ml sonikačního pufru/pelet z 0,5 l kultury)
- Lyzáty sonikujeme v plastové kádince 2 x 1 min (Amp 30, 1s ON, 2s OFF)
- 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 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 6 Superflow a jako promývací pufrů P1 a P2 lišící se koncentrací kompetičního činidla imidazolu.

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

- promýt kolonku 4x3 ml vody (objem matrice je 1 ml)
- promýt kolonku 1x2 ml 100 mM NiSO₄ (obsazení vazebných míst nosiče kolonky Ni²⁺ ionty)
- promýt kolonku 4x3 ml vody
- promýt kolonku 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 a z takto ředěného lyzátu připravíme tři paralelní 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 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 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 koncentrační 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

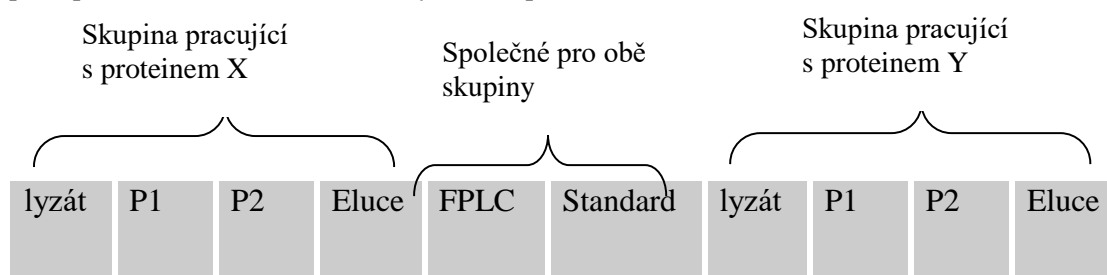
Nejvýznamnější aplikací polyakrylamidové elektroforézy (PAGE) je diskontinuální separace v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) jako silného detergentu. SDS se váže na proteiny v konstantním poměru k jejich hmotnosti (1,4 g SDS na 1 g proteinu) a umožňuje tak určit M_r proteinů s využitím hmotnostních 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 kolony 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	5 μ l +10 ul H ₂ O	5 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 (95 °C/5 min) a krátce stočíme na stolní centrifuze.
3. Do jamky **nanese**me 3 µl **připraveného lyzátu**, 15 µl **P1** a 30 µl **P2** a **E**.
4. Elektroforézu necháme běžet při 25 mA/gel po dobu 1-2 hod. Gel obarvíme roztokem Coomassie Brilliant Blue G-250 (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 mutagenéza 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 použít také nespécifického barvení Coomassie Brilliant Blue.

Experiment:

K ověření katalytické schopnosti $(\text{His})_6\text{Zm.p60.rm}$ (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 -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 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 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: Aktivní barvení pomocí MUGu - substrátu β -glukosidasy
FUNKČNÍ ANALÝZA (100 μg /jamku)

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 (20 ug/jamku)**

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 barvicího roztoku při RT, zakryjeme alobalem
- Detekce proužků na transluminátoru, focení.

Barvicí 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 přenos, 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 MetOH (snížení hydrofobicity membrány)
- inkubace PVDF membrány v dd H₂O (5 minut)
- ekvilibrace papírů, gelu i membrány v přenosovém pufru (10 minut)
- polosuchý přenos 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. 5 min.)
- opláchnout vodou a usušit

Roztoky: **přenosový pufr**

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

detekční pufr

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

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

TBST

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

blokační pufr

5 % sušené mléko/ 3 % BSA v TBST

Primární protilátka:

Polyklonální králičí Anti-Zm.p60.1 (LMFR-VÚVEL); 10 000 x ředěno v 3% 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

