

Studium změn proteomu bakterie *Paracoccus denitrificans* při přechodu z aerobních do anaerobních růstových podmínek pomocí dvourozměrné elektroforézy

TEORETICKÝ ÚVOD

Dvourozměrná elektroforéza (2-DE) patří v současné době mezi nejpoužívanější **proteomické metody**, tedy techniky umožňující komplexní a paralelní kvantifikaci velkého množství proteinů v jednom experimentu.

Energetický metabolismus bakterie *P. denitrificans*

2-DE a související techniky použijeme ke studiu exprese proteinů bakterie *Paracoccus denitrificans*. Tato bakterie je schopna běžného růstu v přítomnosti kyslíku, kdy exprimuje mj. tři různé **terminální oxidasy**. Terminální oxidasy přejímají elektrony uvolňované při oxidaci organických látek, které bakterie využívá jako energetické zdroje, a předávají je na **kyslík**, který je takto redukován převážně na vodu.

Za anaerobních podmínek je tato bakterie schopna využívat **alternativní terminální akceptory elektronů**. Jedná se například o dusičnan (NO_3^-). Pro vícekrokovou redukci dusičnanu až na molekulární dusík bakterie za anaerobních podmínek a v přítomnosti dusičnanu exprimuje enzymy **nitrátreduktasu, nitritreduktasu, NO reduktasu a N_2O reduktasu**. Tyto enzymy tvoří denitrifikační dráhu – tento termín je ostatně součástí druhového názvu bakterie.



V této úloze srovnáme pomocí dvourozměrné elektroforézy **proteínové složení bakterie *P. denitrificans* rostlé za aerobních a anaerobních podmínek**. Získané dvourozměrné proteínové mapy porovnáme pomocí softwarové obrazové analýzy. Za anaerobních podmínek (v přítomnosti dusičnanu) bychom měli být schopni identifikovat diferenciólně exprimované enzymy denitrifikační dráhy a další proteiny související s popsanou změnou energetického metabolismu.

Princip experimentu

Vstupním biologickým materiálem je bakteriální pelet: Bakteriální kultura roste (a) aerobně do zákalu $A_{600}=0,6$ a (b) anaerobně po dobu 22 hodin, zcentrifigovaná a pelet promytý pufr (50 mM Tris-HCl pH 7,3). Tento pelet obdržíte ve zmrazeném stavu. Po jeho rozmrazení provedeme desintegraci ultrazvukem v lyzačním pufru.

Ultrazvuková desintegrace pracuje na principu tzv. mikrokavitace: Ultrazvuk (jako forma mechanického vlnění) vyvolává vznik dutin v kapalině (=“bubliny vakua“), což uvnitř buněk vede k rychlým a opakovaným objemovým změnám buněk a jejich desintegraci. Pro srovnání: Kavitace je jev, který nastává např. při mechanickém otáčení lodního šroubu, kdy se rovněž tvoří „bubliny vakua“.

Lyzační pufr obsahuje

- denaturační činidla** močovinu, thiomočovinu – zajišťují denaturaci proteinů
- detergent** 3-((4-heptyl)phenyl-3-hydroxypropyl)dimethylammoniopropanesulfonát (C7BzO) zajišťuje solubilizaci proteinů obalením jejich hydrofobních částí
- redukční činidlo** dithiothreitol (DTT) redukuje disulfidické můstky mezi –SH skupinami cysteinů
- proteasové inhibitory** zabraňují činnosti proteas po desintegraci vzorku
- amfolyty** zlepšují rozpustnost proteinů

Centrifugace desintegrované buněčné směsi umožní oddělit zbylé části buněk (pelet) a solubilizovaný proteinový extrakt (supernatant)

Stanovení celkového proteinu provedeme pomocí kitu RC-DC Protein Assay (Bio-Rad). Postup využívá precipitace proteinů pomocí RC Reagentů I a II k odstranění látek interferujících s vlastním stanovením (např. detergenty a redukční činidla). Po rozpuštění precipitátu následuje stanovení modifikovanou Lowryho metodou, při níž Cu^+ ionty vzniklé oxidací peptidové vazby redukují v alkalickém prostředí Folin-Ciocalteuovo činidlo za vzniku zbarvení měřitelného při 750 nm, které je přímo úměrné koncentraci proteinu.

Precipitace proteinů acetonem umožní odstranit látky interferující s následnou isoelektrickou fokusací (zejména soli, případně další látky neproteinové povahy).

První rozměr dvourozměrné elektroforézy – isoelektrická fokusace (IEF) (separace proteinů podle isoelektrického bodu) proběhne v **imobilizovaném pH gradientu (IPG)** s nelineárním rozsahem pI 3-10. Proužek s nelineárním gradientem má rozšířenou oblast pH 5-7, kde se vyskytuje statisticky nejvíce proteinů.

Ekvilibrace IPG proužku zahrnuje obalení bílkovin dodecylsulfátem sodným (SDS), opakovanou redukcí DTT a alkylaci $-\text{SH}$ skupin cysteinů alkylačním činidlem jodacetamidem.

Druhý rozměr dvourozměrné elektroforézy – SDS-PAGE (separace proteinů podle molekulové hmotnosti) proběhne ve 12% polyakrylamidovém gelu (procento udává celkový podíl monomeru před polymerací gelu).

Fixace proteinů v gelu po dokončení elektroforézy zabrání difúzi separovaných proteinů z gelu.

Vizualizaci proteinů v gelu provedeme koloidním barvivem Coomassie Brilliant Blue. Barvivo se váže na proteiny dvěma způsoby: Jednak prostřednictvím hydrofobní interakce trifenylmethanové skupiny s hydrofobními částmi proteinů, jednak prostřednictvím iontové interakce mezi záporně nabitou sulfoskupinou a kladně nabitými (obvykle bazickými) skupinami proteinů. Popsané interakce vedou k modrému barvení proteinů. V praxi se provádí také barvení stříbrem nebo fluorescenčními barvivy SYPRO Ruby či SYPRO Orange. Tzv. diferenční gelová elektroforéza (2-D DIGE) zahrnuje označení fluorescenčními barvivy Cy2, Cy3, Cy5 ještě před provedením IEF.

Skenování gelu provedeme ve viditelné oblasti spektra.

Vizualizované obrazy gelů srovnáme pomocí software PDQUEST. Postup zahrnuje detekci proteinových skvrn (spotů), odečet pozadí, přiřazení skvrn odpovídajících témuž proteinu v rámci experimentu (matching) a kvantitativní a statistickou analýzu dat.

Orientační identifikaci diferenciálně exprimovaných proteinů provedeme srovnáním obrazu gelu s webově dostupnou anotovanou obrazovou databází *P. denitrificans*. Tento postup nám umožní vyhnout se identifikaci proteinů hmotnostní spektrometrií (MS), která je mimo rámec tohoto praktika. Pro potvrzení a vyvození biologických závěrů ve výzkumu by však bylo nutné identitu proteinů ověřit novou MS analýzou.

POSTUP PRÁCE

Příprava bakteriálního lyzátu

Zaškrtněte vzorek, se kterým pracuje vaše skupina:

- Aerobně rostlá kultura *P. denitrificans*
- Anaerobně rostlá kultura *P. denitrificans*

1. Mikrozkušavku s bakteriálním peletem označíme B+číslem skupiny (např. B1) a uložíme na ledu.
2. Přidáme 200 μl lyačního pufru „LBz“ o složení 7M močovina, 2M thiomčovina, 1% C7BzO, 70 mM DTT, 40 mM Tris, směs proteasových inhibitorů.
3. Ke směsi přidáme ještě 4 μl amfolytu Pharmalyte 3/10 (výsledná koncentrace 2%).

4. Provedeme desintegraci buněk jehlovým ultrazvukem při nastaveném výkonu 50 W 30 pulzy po 0.1 s – provádějte pod dohledem vyučujícího s použitím chráničů sluchu, vzorek ochlazujte ledem.
5. Vzorek necháme stát 60 min h při laboratorní teplotě, vortexujeme cca každých 15 min – probíhá solubilizace vzorku.
6. Směs centrifugujeme 20 min při 16000 x g při 4°C po dobu 20 minut. Supernatant (solubilizovaný bakteriální lyzát) přepipetujeme do čisté mikrozkušavky označené L+číslem skupiny (např. L1) a uložíme na ledu. Mikrozkušavku s peletem (nedesintegrované zbytky buněk) můžeme zlikvidovat.

Stanovení koncentrace proteinů (RC DC Protein Assay (kit-výrobce Bio-Rad))

7. Připravíme si tři mikrozkušavky: Do dvou napipetujeme vždy 5 ul vzorku L1 (dvě paralelní stanovení – obě označíme S+číslem skupiny, např. S1), do třetí nic (blank-označíme např. B1).
8. Se všemi třemi mikrozkušavkami pracujeme paralelně jak je popsáno dále:
9. Přidáme 125 ul RC reagentu I, zvortexujeme a inkubujeme 1 minutu při laboratorní teplotě.
10. Přidáme 125 ul RC reagentu II, zvortexujeme.
11. Centrifugujeme 16 000 x g, 4 min, 15 °C.
12. Odlijeme supernatant, mikrozkušavku pak obrátíme dnem vzhůru a zbytek supernatantu necháme vytéct.
13. K peletu (sraženina proteinů) přidáme 127 ul reagentu A', vortexujeme a inkubujeme při laboratorní teplotě 5 minut nebo déle, dokud se sraženina nerozpustí. Před dalším krokem zvortexujeme.
14. Přidáme 1 ml reagentu B, okamžitě zvortexujeme a inkubujeme 15 minut.
15. Změříme absorbanci při 750 nm proti blanku, vypočítáme průměrnou hodnotu absorbance z paralelních měření.
16. Koncentraci proteinu určíme z kalibrační závislosti (poskytne vyučující).
17. Vypočítáme objem lyzátu (např. L1) obsahující 300 ug celkového proteinu (abychom následně nanášeli stejné množství proteinu na všechny gely). Naměřené absorbance i výpočet uvedeme do protokolu.

Precipitace vzorku, nanesení na IPG strip a rehydratace

18. Do čisté mikrozkušavky napipetujeme objem lyzátu (např. L1) obsahující 300 ug celkového proteinu. Mikrozkušavku označíme P+číslo skupiny, např. P1.
19. Přidáme 7,5 násobek objemu vychlazeného (-20 °C) acetonu a zvortexujeme, pozorujeme bílý precipitát proteinů.
20. Vzorek umístíme do mrazáku na -20 °C na alespoň 1 hodinu.
21. Vzorek centrifugujeme při 16000 x g při 4°C po dobu 20 minut. Supernatant pe člivě odpipetujeme, pelet vysušíme vakuovou centrifugací (Speed Vac) po dobu 5 min.
22. K peletu přidáme 122,5 µl rehydratačního pufu „RBz“ a 2,5 µl Pharmalyte 3/10.
23. Pelet necháme resolubilizovat 1 h při laboratorní teplotě, vortexujeme cca každých 15 min.
24. Vzorek centrifugujeme při 16000 x g při 4°C po dobu 20 minut.
25. Supernatant nanese na IPG strip pomocí tzv. in-gel rehydratace – provádějte pod dohledem vyučujícího! Z IPG proužku opatrně sloupneme ochrannou fólii a položíme jej GELEM DOLŮ do vzorku.
26. Odstraníme případné bubliny mezi proužkem a dnem nádobky.
27. Zalijeme 2 ml minerálního oleje. Rehydratace IPG proužku bude probíhat přes noc. S proužky manipulujeme výhradně pinzetou a v rukavicích !!!

Isoelektrická fokusace (1. rozměr)

28. Na elektrody fokusační vaničky opatrně pinzetou položíme čtverečky speciálního filtračního papíru (tzv. „elektrodové wicksy“) a navlhčíme je 8 µl deionizované vody.
29. Z rehydratační vaničky vyjmeme proužek a necháme odkapat olej.

30. Proužek položíme do fokusační vaničky gelem dolů. JEMNĚ jej přitlačíme na elektrody. Zalijeme 2 ml minerálního oleje.
31. Po vložení všech proužků uzavřeme vaničku víkem – pozor na orientaci! – a vložíme ji do fokusačního přístroje.
32. Spustíme isoelektrickou fokusaci podle níže uvedeného programu (provede vyučující):

Podmínky fokusace (pro proužek délky 7 cm, teplota 20 °C, proudový limit 50 μ A/proužek):

1. krok: odstranění nadbytečných solí
max. dosažené napětí: 100 V
čas: odpovídá 100 Vh
2. krok: zvyšování napětí
počáteční napětí: 100 V
max. dosažené napětí: 500 V
čas: odpovídá 500 Vh
3. krok: zvyšování napětí
počáteční napětí: 500 V
max. dosažené napětí: 1000 V
čas: odpovídá 1000 Vh
4. krok: hlavní fokusační krok
počáteční napětí: 1000 V
max. dosažené napětí: 4000 V
čas: odpovídá 45000 Vh
5. krok: závěrečný udržovací krok
napětí: 500 V
čas: max. 15 hodin (míněno do rána následujícího dne)

Po ukončení fokusace proužky vyjmeme z oleje, necháme okapat a buď zamrazíme na -20 °C v hermeticky uzavřené nádobce, nebo ihned pokračujeme prvním ekvilibračním krokem.

SDS-PAGE (2. rozměr)

Základní ekvilibrační roztok: 6 M močovina, 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8, 2% SDS, 30% glycerol, bromfenolová modř

Elektroforetický pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % SDS

Agarosa: 0.5 % nízkotuhnoucí agarosa v elektroforetickém pufru, stopa bromfenolové modři

33. Rozmrazíme základní ekvilibrační roztok např. v proudu vody (pozor, nesmí se zahřát nad 37°C). Budeme potřebovat: počet gelů x 5 ml.
34. Dáme do suchého bloku rozmrazit a roztát agarosu (1 eppendorfka stačí na 3 gely. Zahříváme na 70 °C.
35. Navážíme dithiothreitol (potřebné množství=0,025 g x počet gelů), rozpustíme jej v základním ekvilibračním roztoku (potřebné množství=2,5 ml x počet gelů) a necháme míchat na míchačce do rozpuštění (=ekvilibrační roztok I).
36. Na rozmražené IEF proužky (otočené gelem nahoru!) napipetujeme na každý 2,5 ml ekvilibračního roztoku I a necháme třepat na třepačce 12 minut na nejvyšší rychlost.
37. Mezitím navážíme jodacetamid (potřebné množství=0,0625 g x počet gelů), rozpustíme jej v základním ekvilibračním roztoku (potřebné množství=2,5 ml x počet gelů) a necháme míchat na míchačce do rozpuštění (=ekvilibrační roztok II).
38. Po skončení první fáze ekvilibrace slijeme opatrně ekvilibrační roztok I tak, aby nám proužky neuplavaly a aby v misce nezůstala pokud možno žádná kapalina. Poté napipetujeme na každý proužek 2,5 ml ekvilibračního roztoku II a necháme třepat na třepačce 12 minut na nejvyšší rychlost.
39. Připravíme si deskové gely na SDS-PAGE: Opláchneme vrch každého gelu deionizovanou vodou. Těsně před skončením ekvilibrace si přineseme horkou agarosu (aby nám neztuhla).

40. Po skončení druhé fáze ekvilibrace slijeme ekvilibrační roztok II. Na vrch gelu napipetujeme 500 µl agarosu a IHNED vložíme proužek (číslice např. 3-10 musí být v levém horním rohu a nepřevrácená, tj. proužek umísťujeme gelem od sebe). Pomocí špachtličky přitlačíme proužek na vrch gelu. POZOR! Mezi proužkem a gelem nesmí zůstat ŽÁDNÁ BUBLINA! Agarosu necháme ztuhnout 5 minut, přičemž po 3 minutách znovu přitlačíme špachtličkou všechny proužky k vrchům gelů.
41. Připravíme si elektroforetické zařízení. Do elektrodových prostorů nalijeme elektroforetický pufr.
42. Spustíme elektroforézu při napětí 50 V po dobu 20 min a 100 V po zbytek běhu - sledujeme modrou čáru, kterou necháme doputovat cca 0,5 cm od spodního okraje gelu.
43. Během elektroforézy si připravíme fixační roztok: 1 l fixačního roztoku připravíme smícháním 450 ml methanolu, 10 ml kyseliny octové a 540 ml deionizované vody (bude postačovat pro všechny skupiny ve cvičení).
44. Gely přemístíme z kazety do misky s cca 80 ml fixačního roztoku a ponecháme tam nejméně 30 min.

Barvení gelu koloidní Coomassie (Bio-Rad)

45. Po skončení fixace gel barvíme v 50 ml koloidní Coomassie na třepačce přes noc.
46. Poté gel přemístíme do čisté barvicí misky se 100 ml deionizované vody na dobu 20 min. Tento odbarvovací krok ještě 1-2x opakujeme, abychom dosáhli optimálního kontrastu.

Vyhodnocení gelů a srovnání s anotovanou 2-D mapou

Rozdíly mezi gely vyhodnoťte v programu PDQuest 8.0 podle pokynů vyučujícího. Webovou adresu k anotované 2-D mapě poskytne rovněž vyučující.

ZÁVĚR:

1. Zhodnoťte výsledek 2-D elektroforézy: Zejména celkovou kvalitu gelu a počet proteinových skvrn identifikovaných programem PDQuest.
2. Pro proteiny diferencially exprimované mezi aerobně a anaerobně rostlou kulturou *P.denitrificans* uveďte do tabulky:
 - Čísla spotů (SSP) dle programu PDQuest
 - Míra kvantitativní změny - „fold change“ – na základě obrazové analýzy programem PDQuest
 - Na základě srovnání s anotovanou 2-D mapou uveďte název proteinu, přístupový kód do databáze SwissProt a číslo genu
 - Věrohodnost identifikace srovnáním s anotovanou 2-D mapou vyjádřete +/+/+/+
3. Pokuste se vysvětlit biologický význam získaných výsledků.