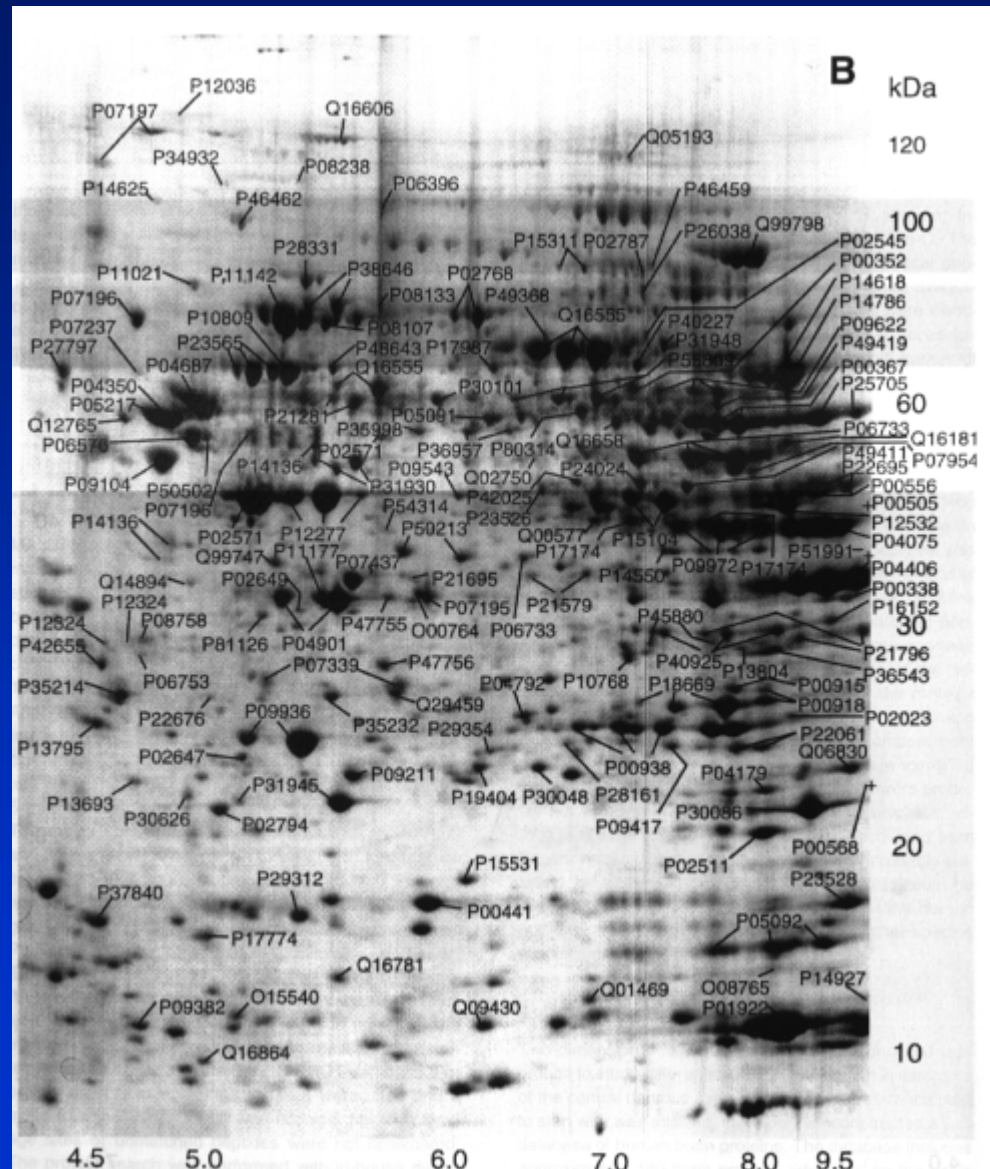


Dvourozměrná elektroforéza:
analýza hladin denitrifikačních
proteinů u bakterie *Paracoccus*
denitrificans

Pavel Bouchal

Laboratoř proteomiky
Ústav biochemie PŘF MU

2-D proteinová mapa



Langen H. *et al.*: 2-DE map of human brain proteins. *Electrophoresis* 20, 907 (1999)

Příprava vzorku pro 2-DE

Desintegrace biologických vzorků buněk, tkáně

Sonikace, French-press, osmotická či enzymatická lýze!!!!

Inhibice proteas (PMSF, Pefabloc™, Complete™)!! (rostliny!!!!)

Inhibice fosfatas (Na₂VO₃, NaF)!

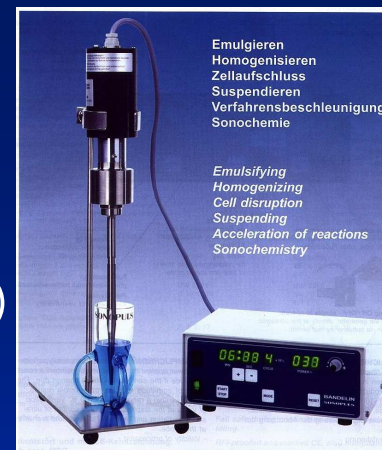
Odstranění nukleových kyselin (DNAsa I, benzonasa)!!!

Odstranění dalších interferujících látek (polysacharidy, fenolické I.) !

Nízká iontová síla (10 mM soli)!!!!

Precipitace vzorku (zakoncentrování, delipidace): aceton,
trichloroctová kyselina

Solubilizace vzorku, pak centrifugace (~16000 g, 20 min, 4°C)



Solubilizace vzorku

- **CHAOTROPNÍ ČINIDLA** omezují vodíkové vazby a elektrostatické interakce
7 M močovina, 2 M thiomočovina
- **DETERGENTY** obalují hydrofobní části bílkovin a tím zvyšují jejich rozpustnost
2-4% CHAPS nebo 1% ASB 14 nebo 1% C7BzO; 0,5-1% TRITON X-100
- **REDUKČNÍ ČINIDLA** štěpí disulfidické vazby -S-S- mezi cysteiny
50-100 mM dithiothreitol
- **AMFOLYTY** pufrují pH a také zlepšují rozpustnost proteinů
Pharmalyte, Bio-Lyte, Ampholyte (2%)

Protokol pro přípravu vzorku

- sklizení buněk 5000 g, 30 min, 4 °C
- promytí** 50 mM Tris/HCl pH 7.3, supernatant odlít
- k peletu přidat **lyzační pufr** (7M močovina, 4% thiomočovina, 1% C7BzO, 70 mM DTT, 2% Pharmalyte 3/10, proteasové a fosfatasové inhibitory)
- desintegrace** ultrazvukem 60 x 0.1 s
- solubilizace 1 h/lab T
- centrifugace 16000 g/20 min/4 °C
- stanovení bílkoviny
- 150 µg proteinu **precipitovat** 7,5 (obj.) násobkem acetonu 1,5 h / -20°C
- centrifugace 16000 g/20 min/4 °C
- resolubilizace** peletu v rehydratačním pufru (7M močovina, 2M thiomočovina, 1% C7BzO, 70 mM DTT, 2% Pharmalyte 3/10)
- nanesení na IPG strip

Bouchal P. Zdráhal Z., Helánová Š., Janiczek O., Hallberg K.B., Mandl M., Proteomics 2006, 6, 4278-4285

1. rozměr: isoelektrická fokusace (IEF)

Separace podle pl. Počítají se volthodiny (Vh)

- **IPG-IEF** (proužky s imobilizovaným pH gradientem) –
dobrá reprodukovatelnost, napětí až 10000 V, současný
standard, komerčně dostupné
pH gradient 3-10 NL
(gradienty existují v úzkém rozsahu i jedné jednotky pH)
Dávkování vzorku: in-gel rehydratace

Aparatury na IEF

CA-IEF



IPG-IEF



IPG-IEF



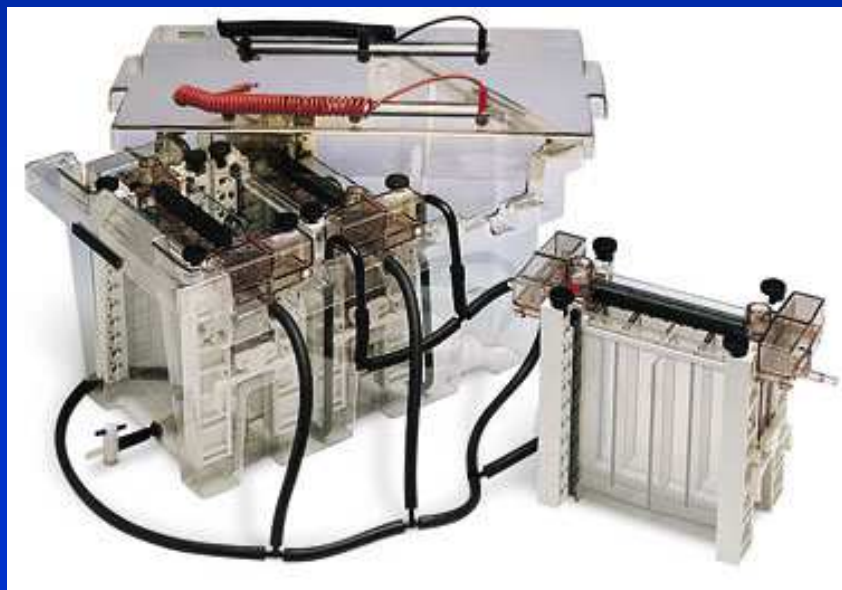
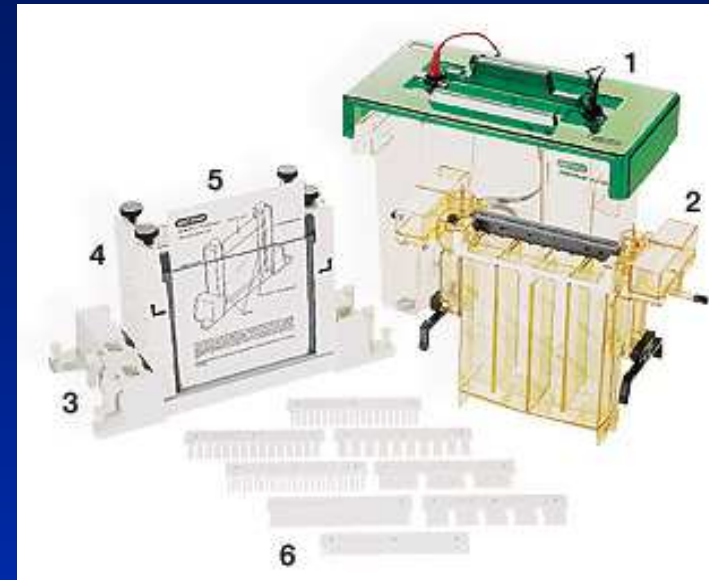
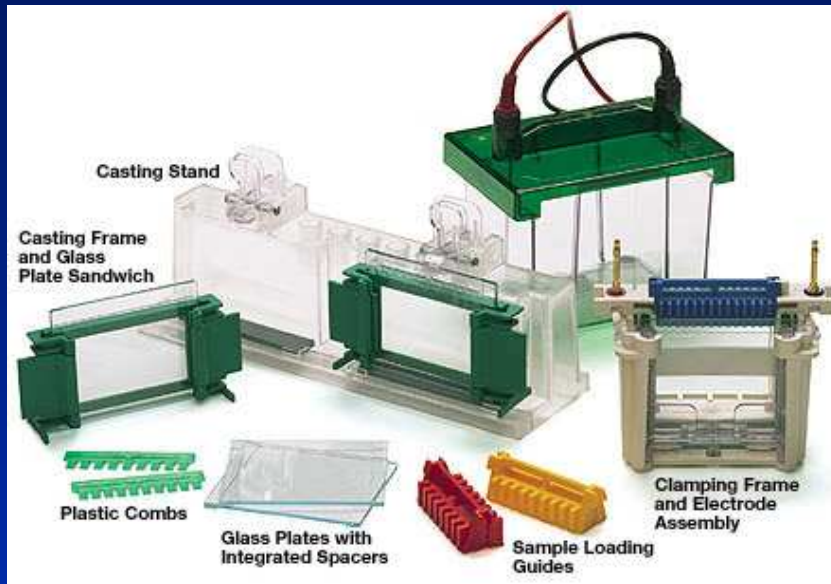
IPG-IEF



2. rozměr: SDS-PAGE

- Ekvilibrace IPG proužků před SDS-PAGE: obalení proteinů SDS – (uděluje proteinům uniformní náboj na jednotku hmotnosti),
krok 1: redukce (DTT)
krok 2: alkylace (jodacetamid)
- SDS-PAGE (malý formát)
12 % (homogenní) M_r 15000-100000
- Pufrový systém: tris-glycin-SDS (= „Laemmli“)

Aparatury na SDS-PAGE



Barvení gelů

	relat. citlivost
• Stříbrem: analytické (problémy s MS!)	+ + +
• Coomassie brilliant blue (mikropreparativní)	+
• koloidní CBB	+ +
• SYPRO Ruby/Orange – fluorescenční (analyt.+mikroprep.)	+ + (+)
• detekce na filmu – autoradiografie (analyt., inkorporace značeného izotopu během biosyntézy proteinů)	+ + +
• DIGE (diferenční gelová elektroforéza) (fluorescenční obarvení 2 vzorků před 2-DE analýzou, všechny vzorky v 1 gelu, vizualizace: 3 různé λ (jedna referenční))	+ + (+)

Obrazová analýza 2-DE gelů

- Odečtení pozadí a detekce spotů
- Manuální kontrola a korekce detekovaných spotů
- Vzájemné přiřazování odpovídajících si spotů na různých gelech v jedné sadě (matchsetu) – MATCHING
- Kvantitativní a statistická analýza dat
- Tvorba obrazových 2-D databází

PDQUEST (Bio-Rad)

IMAGE MASTER (Amersham Biosciences)

MELANIE (Geneva Bioinformatics)

PHORETIX 2-D / AIDA (Nonlinear Dynamics)

Možnosti identifikace proteinů

- Peptide mass fingerprinting (MALDI-TOF MS)
- Částečná sekvenace peptidů (MALDI-TOF MS/MS, LC-MS/MS)
 - ↳ srovnání s databází (NCBI, Swiss-Prot/TrEMBL)
- Western-blotting + imunochemická detekce (protilátky)

Webová 2-DE databáze *Paracoccus denitrificans*

http://web.mpiib-berlin.mpg.de/cgi-bin/pdbs/2d-page/extern/menu_frame.cgi?gel=20