

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 vizualizovány přímo v gelu barvením Coomassie Brilliant Blue, stříbrem, fluorescenčně, popř. autoradiograficky.

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

Praktická část:

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

1. Extrakce proteinů z listů:

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

2. Solubilizace proteinů:

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

3. Rehydratace IPG stripu se vzorkem

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

S proužky manipulujeme výhradně pinzetou a v rukavicích !!!

4. Izoelektrická fokusace (1. rozměr)

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

Podmínky fokusace (pro strip délky 7 cm):

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

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

5. SDS-PAGE (2. rozměr)

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

Roztoky pro 2D elektroforézu:

Solubilizační pufr (totožný s rehydratačním pufrem)

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

Ekvilibrační roztoky

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

Agarosa na zalití IPG stripu

0.8 % agarosa v PAGE elektroforetickém pufru

Elektroforetický pufr

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

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

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

Barvení gelů Coomassie modří (Coomassie Brilliant Blue R250)

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

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

Roztoky:

Barvicí roztok Coomassie

0,1% Coomassie Brilliant Blue R 250

10% kyselina octová

40% methanol

Odbarvovací roztok 1

7% kyselina octová

40% methanol

Odbarvovací roztok 2

10% kyselina octová

5% metanol

Barvení CB je možno též provést komerčně dostupným kitem.

Barvení gelů stříbrem

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

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

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

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

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

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

Roztoky:

0,1% AgNO₃

0,1 g AgNO₃/100 g roztoku.

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

Wyvíjecí činidlo

3% uhličitan sodný + formaldehyd

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

Farmerův odbarvovač

2% K₃Fe(CN)₆, 3,2% Na₂S₂O₃·5H₂O

2 g K₃Fe(CN)₆/100 g roztoku

3,2 g Na₂S₂O₃·5H₂O/100 g roztoku

Smíchat těsně před použitím

Barvení stříbrem je možno též provést komerčně dostupným kitem.

Gely uchováváme zatavené ve fólii nebo vysušené.

Sušení gelů mezi celofány

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

2% (w/v) glycerol

2g glycerolu doplnit na objem 100 ml destilovanou vodou

B) HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PROTEINŮ

doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.

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

Teoretický úvod

MALDI-TOF MS

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

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

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

LC-MSMS

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

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

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

Proteolytické štěpení

1. Vyříznutí proteinových skvrn z gelu

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

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

2. Odbarvení gelu

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

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

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

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

2. Vlastní analýza

Peptidy měříme v reflektromovém 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 úkolů.

Typy zdrojů informací a nástrojů

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

1. Základní data

– sekvence

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

– struktura

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

2. Nástroje

– analýza sekvence, srovnávání více sekvencí

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

– zobrazení struktury

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

– předpovídání struktury

- Swiss Model (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)

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

Vyhodnocení MS dat (samostatná práce)

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

Poznámka:

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

Hledání v databázi proteinů.

Mgr. Radka Dopitová, Ph.D.

www.expasy.ch

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

Tento server používám k práci s proteiny.

- Databases
- Tools and software packages

Jak najít námi hledaný protein v databázi.?

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

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

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

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

Potom doporučuji jít na webové stránky 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 bglB and ascB) and from Erwinia chrysanthemii (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 specifikou, podobnost s jinými proteiny, 3D strukturu.

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

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

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

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

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

CATH Protein Structure Classification

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

SCOP: Structural Classification of Proteins.

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
MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPIILFQHGNPTSSYLWRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERY
AYAHRDYLDALWEALDLGDRVVLVVDWGSALGFDWARRHRERVQGIAYMEAIAMPIEWADFPQDRDLFQAFRSQAGE
ELVLQDNVFEQVLPGLILRPLSEAEAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIARDYAGWLSSESPKLF
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 `MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPIILFQHGNPTSS`. Below the search bar, a list of search results is shown, including the following entries:

- Very significant (E Cut Off:0.001) to MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPIILFQHGNPTSS
- Significant (E Cut Off:0.01) to MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPIILFQHGNPTSS
- Includes Insignificant (E Cut Off:1) to MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPIILFQHGNPTSS
- Extended Search (E Cut Off:10) to MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPIILFQHGNPTSS

The main content area displays a 3D structure of a protein, labeled "Lead Poisoning". The structure is shown as a blue and purple surface representation. The website also features a sidebar with navigation options like "Welcome", "Deposit", "Search", "Visualize", "Analyze", "Download", and "Learn".

Search Parameter:

Text Search for:
 msigakpfgkckfiekgrmayidegtgdpilfqhgnptssylwrnimphcaglgrliacdligmgsdkldpsppery
 ayaehrdyldalwealdlgrvvlvhdwgsalqgdwarrrhrervggiaymeaiampiewadfeqdrdlfgafrsqage
 elvldnrvfveqvlpgllrplseaemaayrepflaagearrptlswprqipagtpadvvaiardiyagwisespipklf
 inaepgalttgrmrdfcrtpnqteltvagahfiqedspdeigaaiaafvrrlrpa

Refine Search Save Search to MyPDB

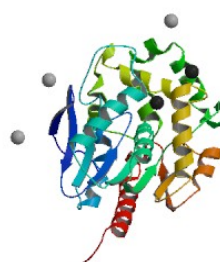
Refinements

Currently showing 1 - 1 of 1 Page: 1 of 1

Displaying 25 Results

ORGANISM	Spingomonas 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

Download File View File

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

Oakley, A.J., Damborsky, J., Wilce, M.C.

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

2) hledání strukturně podobných proteinů, pomocí např. PDBeFold

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

EMBL-EBI Protein Data Bank in Europe PDBeFold

Bringing Structure to Biology

Structure Alignment Results.

Query: pdb entry 1mj5:A , 297 residues

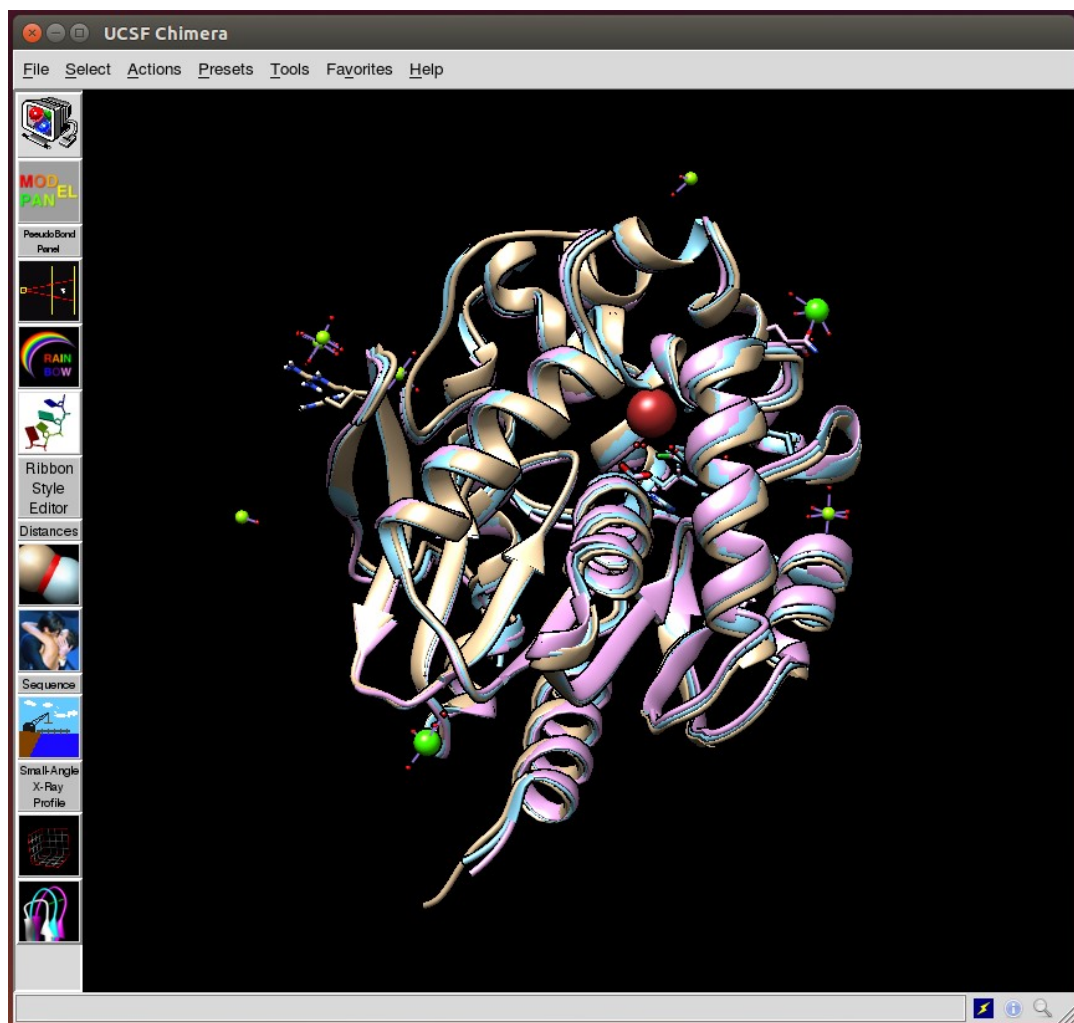
LINB (HALOALKANE DEHALOGENASE) FROM SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS UT26 AT ATOMIC RESOLUTION

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	Nalign	N _g	%seq	Query				Target (PDB entry)	Title
	Q	P	Z					%sse	Match	%sse	N _{res}		
1	1.00	88.1	28.3	0.00	297	0	100	100	100	100	297	1mj5:A	LINB (HALOALKANE DEHALOGENASE) FROM SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS UT26 AT ATOMIC RESOLUTION
2	0.99	56.5	22.6	0.09	295	0	100	100	100	100	295	1k6e:A	COMPLEX OF HYDROLYTIC HALOALKANE DEHALOGENASE LINB FROM SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS UT26 WITH 1,2-PROPANEDIOL (PRODUCT OF DEHALOGENATION OF 1,2-DIBROMOPROPANE) AT 1.85Å
3	0.99	57.3	22.8	0.16	295	0	100	100	100	100	295	1k63:A	COMPLEX OF HYDROLYTIC HALOALKANE DEHALOGENASE LINB FROM SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS WITH UT26 2-BROMO-2-PROPENE-1-OL AT 1.8Å RESOLUTION
4	0.98	51.8	21.6	0.27	294	0	100	100	100	100	294	1g5f:A	STRUCTURE OF LINB COMPLEXED WITH 1,2-DICHLOROETHANE
5	0.98	55.2	22.3	0.28	294	0	100	100	100	100	294	1g42:A	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	100	100	294	1g4h:A	LINB COMPLEXED WITH BUTAN-1-OL
7	0.98	61.7	23.6	0.29	294	0	100	100	100	100	294	2bfn:A	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	100	95	294	1iz7:A	RE-REFINEMENT OF THE STRUCTURE OF HYDROLYTIC HALOALKANE DEHALOGENASE LINB FROM

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



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) Příprava bakteriální kultury pro izolaci plazmidové DNA

Do bakteriální zkumavky obsahující 5 ml sterilního LB media s ampicilinem (100 mg/l) inokulujte pomocí bakteriální kličky expresní kulturu (kmen BL21 (DE3) pLys₂ nesoucí expresní konstrukt pRSETA::*Zm-p60.r*) a nechte inkubovat přes noc při 37°C za stálého třepání.

Izolace plazmidové DNA z obou bakteriálních kultur pomocí ZR Plasmid Miniprep kitu

Bc. Martina Válková

1. centrifugujeme 3 ml (2x 1,5 ml) narostlé bakteriální kultury 1 min při 14000 rpm; po každém stočení supernatant slijeme do odpadní kádinky
2. pelet resuspendujeme ve 200 µl činidla P₁ (červené)
3. přidáme 200 µl činidla P₂ (zelené) a jemným překlápěním (2- 4x) zamícháme (při kompletní lyzi buněk by měl roztok být čirý, fialový, vazký)
4. ihned přidáme 400 µl činidla P₃ (žluté) a opět jemným překlápěním zamícháme (roztok zežloutne)
5. inkubujeme 1 - 2 min při RT, potom centrifugujeme 2 min při 14000 rpm.
6. supernatant přeneseme opatrně do kolonky a centrifugujeme 30 s při 14000 rpm
7. kolonku po odstranění roztoku promyjeme 200 µl činidla Endo-Wash Buffer a opět centrifugujeme 30 s při 14000 rpm
8. kolonku promyjeme 400 µl činidla Plasmid Wash Buffer a centrifugujeme 1 min při 14000 rpm
9. přidáme 30 µl deionizované sterilní vody a eluci plazmidové DNA provedeme centrifugací 1 min při 14000 rpm
10. změříme absorbanci vyizolované DNA spektrofotometricky při $\lambda = 260\text{nm}$ a vypočítáme její koncentraci

Sekvenační analýza DNA

Bc. Martina Válková

Cílem práce je ověřit čtecí rámec klonovaného genu Zm-p60.1 v expresním vektoru pRSET A. Informace o používaném plazmidu pRSET A jsou dostupné na stránkách www.invitrogen.com. Pro sekvenování se použije univerzální sekvenační primer T7.

Teoretický úvod

Sekvenační analýza bude provedena metodou značených terminátorů za použití Genetického analyzátoru ABI PRISM 3130, který pracuje na bázi kapilární elektroforézy. V praxi to znamená, že se nejprve s daným plazmidem, neznačeným primerem a sekvenačním kitem provede sekvenační reakce (cycle sequencing). Používaný kit (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) obsahuje enzym AmpliTaq polymerázu FS, směs nukleotidtrifosfátů a fluorescenčně značených terminátorů. Každý ze čtyř terminátorů (ddNTPs-dideoxynukleotidtrifosfátů) přítomných v reakci nese jinou fluorescenční značku. Při sekvenační reakci jsou tyto terminátory do rostoucích řetězců průběžně inkorporovány, řetězec je ukončen a zároveň označen značkou příslušnou k dané bázi.

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

Příprava sekvenační reakce

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

plazmidová DNA (do reakce celkem 400ng)	2,0 μ l*
deio voda	3,5 μ l*
primer (konc. 10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
BD kit	2 μ l
5X BD sekvenační pufr	2 μ l

** údaj je orientační, závisí na koncentraci plazmidové DNA (uvedené hodnoty jsou pro koncentraci 200 ng/ μ l). Pokud je koncentrace nižší než 100 ng/ μ l, je potřeba vzorek zahustit, při koncentraci nad 400 ng/ μ l je naopak potřeba vzorek naředit.*

Obsah zvertexujeme, zcentrifugujeme a vložíme do PCR cykleru.

Sekvenační reakce

Na PCR cykleru nastavíme následující program:

Teplotní rampa na 96°C
Cyklus 35x: 96°C 10s
 50°C 5s
 60°C 4 min
Teplotní rampa na 4°C, výdrž

Celková doba reakce je asi 3 hodiny.

Přečištění produktů sekvenační reakce

Do eppendorfký 1,5 ml napipetujeme:

125 mM EDTA	2,5 µl
95% ethanol (ledový -20°C)	25 µl
celý obsah PCR zkumavky	

Zvortexujeme a necháme DNA 10 min vysrážet ve tmě.

Centrifugujeme 20 min při 14000 rpm.

Opatrně pipetou odsajeme ethanolovou vrstvu, aniž bychom poškodili pelet (pozor, pelet není vidět!!).

Pelet opláchneme 30 µl 70% ethanolu.

Krátce (2 min) centrifugujeme při 14000 rpm.

Opět opatrně odsajeme ethanol.

Sraženinu krátce dosušíme v termobloku na 95°C.

Příprava vzorku pro automatický sekvenátor

Vzorek pro sekvenátor připravíme následovně:

- Pelet v eppendorfci rozpustíme v 15 µl Hi - Di formamidu.
- Důkladně protřepeme na Vortexu a krátce zcentrifugujeme.
- Celý obsah opatrně přeneseme do destičky určené pro automatický dávkovač sekvenátoru.

Vyhodnocení sekvencí v programu Work Bench

Bc. Martina Válková

Proč vlastně sekvenovat?

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

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

Praktická rada: nevěřte nikomu!

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

Obecný postup při ověřování správnosti vzorku:

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

Výstup z programu Workbench může vypadat například takto:

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


```

CKI_jap9wtT7      -----
GAGATATACCATGGGCAGCAGC
CKI1_dna
CAAAGGGAATCATTGCTGAGACATTCTTTTGTTCAGAGAGATCACCAAACATAAAGTC
                                                ***** * * *
*
CKI_jap9wtT7      CATCATCATCATC--ATCACAGCAGC-
GGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGC
CKI1_dna
CAAGAAGAGGGGGCCAAGCTCAATGTTTAACAAAAAATTAGGTAAGAGGATAATGGCATCA
                    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
*
CKI_jap9wtT7
ACAGATTCAGAGAGTGAGACTAGGGTCAAGTCAGTGCGTACCGGTCGAAAGCCTATTGGG
CKI1_dna
ACAGATTCAGAGAGTGAGACTAGGGTCAAGTCAGTGCGTACCGGTCGAAAGCCTATTGGG
*****
*
CKI_jap9wtT7
AACCCAGAGGACGAGCAAGAGACTTCCAAGCCGAGTGACGATGAATTCTTAAGAGGAAAG
CKI1_dna
AACCCAGAGGACGAGCAAGAGACTTCCAAGCCGAGTGACGATGAATTCTTAAGAGGAAAG
*****

```

Program Workbench lze využít nejen ke kontrole DNA sekvencí; mimo jiné tu lze srovnávat zadané sekvence proti databázím, překládat DNA sekvence do proteinových, vyhledávat primery... Dále lze Workbench použít i pro práci s proteinovými sekvencemi – taktéž srovnávání navzájem či přes databáze, zjišťovat pI, ext. koeficienty... a spousta dalších věcí.

Vaším úkolem bude zkontrolovat sekvence vzorků, se kterými budete pracovat. Výstupy z Workbenche přiložíte k protokolu. Vzhledem k časové náročnosti praktika a finanční náročnosti sekvenování nebudete ovšem sekvenovat a kontrolovat celý klon, ale pouze jeho začátek. Pro ovládnutí základů práce se sekvencemi to však bude zcela postačující.

B) EXPRESE A PURIFIKACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

Mgr. 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 fúzeми rekombinantního proteinu a přirozených (obvykle bakteriálních) proteinů (např. thioredoxin, maltózu vázající protein, glutathion-S-transferasa atd.), které své pozitivní fyzikálně-chemické vlastnosti (zejména vysokou rozpustnost při zvýšených intracelulárních koncentracích) rozšiřují na celý fúzní protein. Další možností, kterou lze ovlivnit správné skládání proteinu, je změna podmínek exprese proteinu. Optimalizuje se teplota růstu buněk, teplota indukce exprese požadovaného genu, koncentrace IPTG při indukci, prodloužení doby indukce nebo růstu buněk. Lze i specificky obohacovat růstové médium.

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

Expresе rekombinantních derivátů β -glukozidázy Zm-p60.r

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

Tyto konstrukty náhodně označíme jako X a Y.

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

Experiment:

- Do 1 l LB média s ampicilinem (100 mg/l) a 1% glukózou zaočkujeme 800 μ l 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 přídávkem 0,1mM IPTG a současně snížíme teplotu na 22°C .
- Kultury sklízíme centrifugací (4000 rpm/20min). 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 chromatografie**.

Metoda byla poprvé využita v roce 1975 (Porath a kol.) pro frakcionaci sérových proteinů na polymerní matici s funkční skupinou chelatující ionty přechodných iontů (Cu, Ni, Zn, Co). Funkční skupinou na matici je obvykle iminodioctová (IDA) nebo nitrilotrioctová (NTA) kyselina. Interakce proteinu s maticí je zprostředkována 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 pufr s pH = 7 – 8, zajišťující optimální interakci domény s kovovým iontem. V pufru 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
- 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 matici Sepharose Ni²⁺-NTA

Pro získání čistého proteinu je nutné optimalizovat podmínky vymývání balastních proteinů. Změna složení promývacích pufrů ovlivní eluci balastních proteinů interagujících s iontem kovu. Jako matrice

bude použita Ni – NTA Superflow a jako promývací pufr 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
- promýt kolonku 1x2 ml 100 mM NiSO₄
(obsazení vazebných míst nosiče kolonky Ni²⁺ 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 Bradfordové při 595 nm; činidlo firmy Bio-Rad nebo Sigma.

Stanovíme koncentraci jen v nativních lyzátech !

- 10 µl lyzátu naředíme 10 x sterilní vodou
- 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

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 **neurotoxita** 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 koncent. pufr (0,5 M Tris-Cl pH 6,8)

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

Kontrola čistoty purifikovaného proteinu

SDS-PAGE

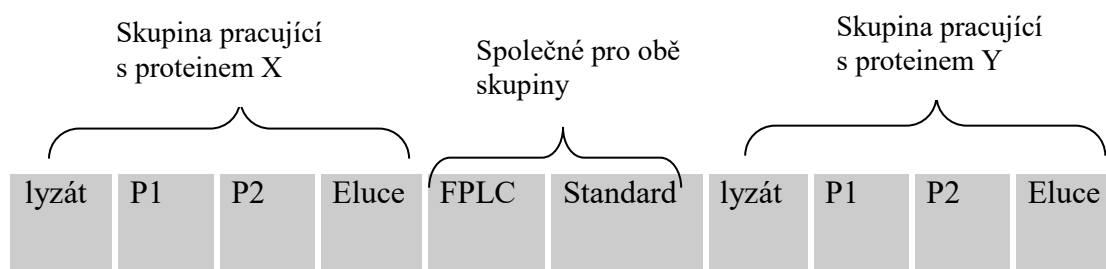
Nejvýznamnější aplikací polyakrylamidové elektroforézy (PAGE) je diskontinuální separace v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) jako silného detergentu. SDS se váže na proteiny v konstantním poměru k jejich hmotnosti (1,4 g SDS na 1g proteinu) a umožňuje tak určit M_r proteinů s využitím hmotnostních standardů. Úplné maskování původního náboje však není zcela zachováno u silně bazických nebo kyselých proteinů, kde je k přesnému určení 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 nescifických 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 (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 **nanese 30 μl připraveného vzorku.**

4. Elektroforézu necháme běžet při 25 mA/gel po dobu 1-2 hod. Gel obarvíme roztokem Coomassie Brilliant Blue (Nescifické 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

Denzitometr GS 800, Bio-Rad

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

Adobe Photoshop

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

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

1. Skenování gelu

- zapnout denzitometr 10 minut před vlastním měřením; restartovat počítač;
- na sklo přístroje nakapat stříčkou destilovanou vodu (skenujete-li membránu, sklo nenámáčíte);
- vložit gel, odstranit případné bubliny a zavřít přístroj.
- spustit program Quantity One;
- z nabídky vybrat **File** → **GS-800**
- v menu vybrat, jaké médium skenujete:
Select → **Gel** → **Coomassie Blue** nebo
Select → **Blot** → **AP-substrate (BCIP/NBT)**
a podle toho vybrat filtr: pro gel (skenuje se při $\lambda=520-570$ nm) se použije filtr zelený, pro blot (skenuje se při $\lambda=595-750$ nm) červený.
Filter → **Green, Red**
- **Preview scan**
- Orámovat žádanou plochu, spustit skenování ikonkou **Acquire**

2. Vyhodnocení gelu:

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

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

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

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

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

Filtrace obrazu: podle vzhledu gelu zvolíme také typ filtrace:

Pepper, Salt, Gaussian, Uniform, Outlier

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

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

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

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

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

Ve vašem případě pravděpodobně použijete:

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

z nabídky *Image* → *Filter Wizard*

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

• Definování drah:

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

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

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

Lane → *Edit Frame* → *Stretch Frame*

→ *Move Frame*

→ *Rotate Frame*

→ *Resize Frame*

→ *Add/adjust Anchors...*

• Definování bendů

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

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

Převedení obrázku z formátu tif na formát jpg:

File → *Save As* → z nabídky formátů zvolit jpg.

Popsané obrázky naskenovaného gelu budou součástí protokolu.

C) Strukturní a funkční analýza proteinů

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

Analýzu struktury a funkce enzymu je možno provést již v nativních bakteriálních lyzátech, čímž se ušetří spousta experimentální práce spojené s izolací proteinu. Jedinou podmínkou je mít po ruce

Gel č. 2 : specifická detekce β -glukozidázy pomocí série dvou protilátek po přenesení na membránu- **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 barvicího roztoku při RT
- 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 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 H₂O (5 minut)
- ekvilibrace papírů, gelu i membrány v transferovém pufru (10 minut)
- semi-dry elektro transfer 30 min. (proudová hustota = 5 mA na 1 cm²)
- inkubace 45 min s blokačním pufrem

- 45 min inkubovat s primární protilátkou
- promývat 3x 5 min TBST
- inkubace se sekundární protilátkou (45 min)
- promývat 3x 5 min TBST
- inkubace s detekčním pufrem (10 min)
- detekce inkubací s roztokem chromogenního substrátu (max. 5min.)
- opláchnout vodou a usušit

Roztoky : transferový pufr

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

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 v TBST

Primární protilátka:

Polyklonální králíčí Anti-Zm.p60.1 (LMFR-VÚVEL); 10 000 x ředěno v 5% BSA v TBST
Monoklonální myši Anti Poly His (Sigma); 10 000 x ředěno v 5% mléku v TBST

Sekundární protilátka:

Kozí IgG proti králíčímu 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

