

UPORABA 2D GELSKE ELEKTROFOREZE V PROTEOMIKI

MENTOR: PROF. DR. IGOR KRIŽAJ

Avtorja: Rok Štemberger in Mitja Crček

Univerza v Ljubljani
Ljubljana, 13.11.2012

Nekaj zgodovine

- ♦ V začetkih 70-ih let:
- ♦ 1) Zone elektroforeza, zelo hitro postala popularna
- ♦ 2) Denaturirano izoelektrično fokusiranje
- ♦ Združitev metod 1974 – neuspešno
- ♦ 1975 – 2D elektro. boljša resolucija, zelo hitro postala popularna, še vseeno ne popolna
- ♦ Imobiliziran pH gradient → prodor v znanosti

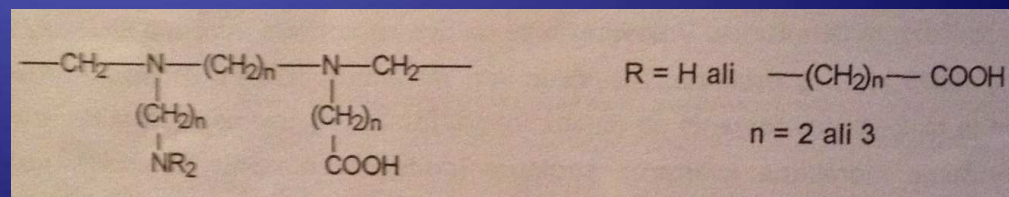
Priprava vzorca

- ♦ Ne smemo spremeniti naboja proteina
- ♦ Uporaba nevtr. detergentov in kaotropov (kombinacija) → problem membranski lipidi
- ♦ Katotropi zelo dobro topijo in denaturirajo proteine (Urea)
- ♦ Problem nastane ob povezavi protein-nukleinska kislina → rešitev je, da uporabimo močen pH ali pa trikloroocentno kislino!

- ♦ Razne polienole, hidrofozne enote in njihove povezave so lahko v vzorcu itd.
- ♦ Problem: razne artefaktne modifikacije med pripravo vzorca, npr. karbamilacija
- ♦ Splošno znano je, da naj bi bili kaotropi in protezani inhibitorji dovolj
- ♦ Vendar ne VEDNO
- ♦ Za skoraj vsak tip vzorca so pripravljene različni protokoli same priprave in čiščenje vzorca!!!!

Izoelektrično fokusiranje

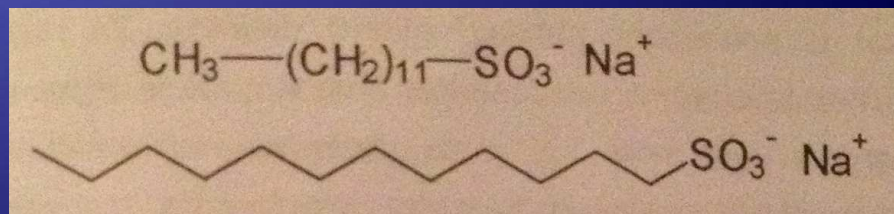
- ♦ Ločevanje na podlagi celokupnega naboja proteina
- ♦ Ohrani se nativna konformacija, proteini še vedno biološko aktivni
- ♦ Uporaba imobiliziranih pH gradientov (omogoča tudi ponovljivost eksperimentov)
- ♦ Predfokusiranje: Uporaba amfiolitov, amfioliti v gel preden polimerizira
- ♦ Sprva uporabimo majhno jakost el. polja, kasneje pa večje



- ♦ Velike napetosti pri izoelektrične fokusiranju 170V/cm, ker se naboj manjša
- ♦ Problem: tiolska ionizacija cisteinov, pri velikem pH, nad 9, potreben konstanten redoks potencial ali pa da cisteine pretvorimo v disulfidne mostičke
- ♦ Pri tej metodi vzorci ne „pobegnejo“

Ravnotežje med dimenzijo in NaDS elektroforezo

- ♦ Cilj je proteine, ki smo jih ločili z IEF, namočiti v pufru z NaDS, da postanejo mobilni v drugi dimenziji
- ♦ Proteini so nekako raztopljeni v gelu in se morajo ponovno raztopiti in postati zopet mobilni v NaDS
- ♦ NaDS Page začnemo z majhno napetostjo
- ♦ Pustimo nekaj časa in začnemo

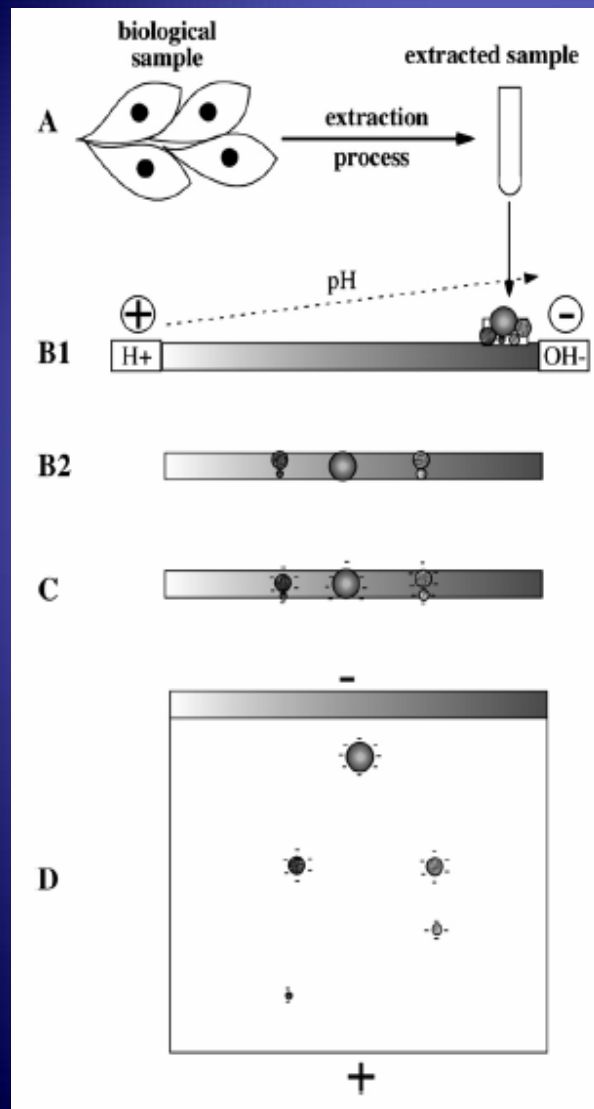


Detekcija proteinov

- ♦ Sedaj lahko vidimo že nekaj naših rezultatov
- ♦ Pomemben korak: samo kar smo detektirali, lahko analiziramo
- ♦ Izbrati moramo nekaj točk/pik, ki nas zanimajo
à moramo dobro izbrati à nadaljna analiza
- ♦ Pri detekciji je pomembna, občutljivost
linearnost, homogeni odgovor in tudi
kompatibilnost z nadaljnjimi tehnikami
detektiranja (MS)

♦ Detektiranje :

- ♦ z Organskimi barvili: Commassie modro – dober standard, občutljivost zmerna, ostalo v redu
 - ♦ z Fluorescenco – dober kompromis $\mathcal{J}$, zadošča vsem standardom (več opcij: nekovalentna in kovalentna vezava, „environment sensitive probes“ ...)
 - ♦ s Srebrovo obarvanje – malo problematično
- ## ♦ Bolje je primerjati več gelov med seboj à več paralelk ob začetku
- ♦ Dobro načrtovanje poskusa, izvedba, da se izognemo napačnemu pozitivnemu signalu



A. Ekstrakcija

B1. Vzorec naložen na pH gradient

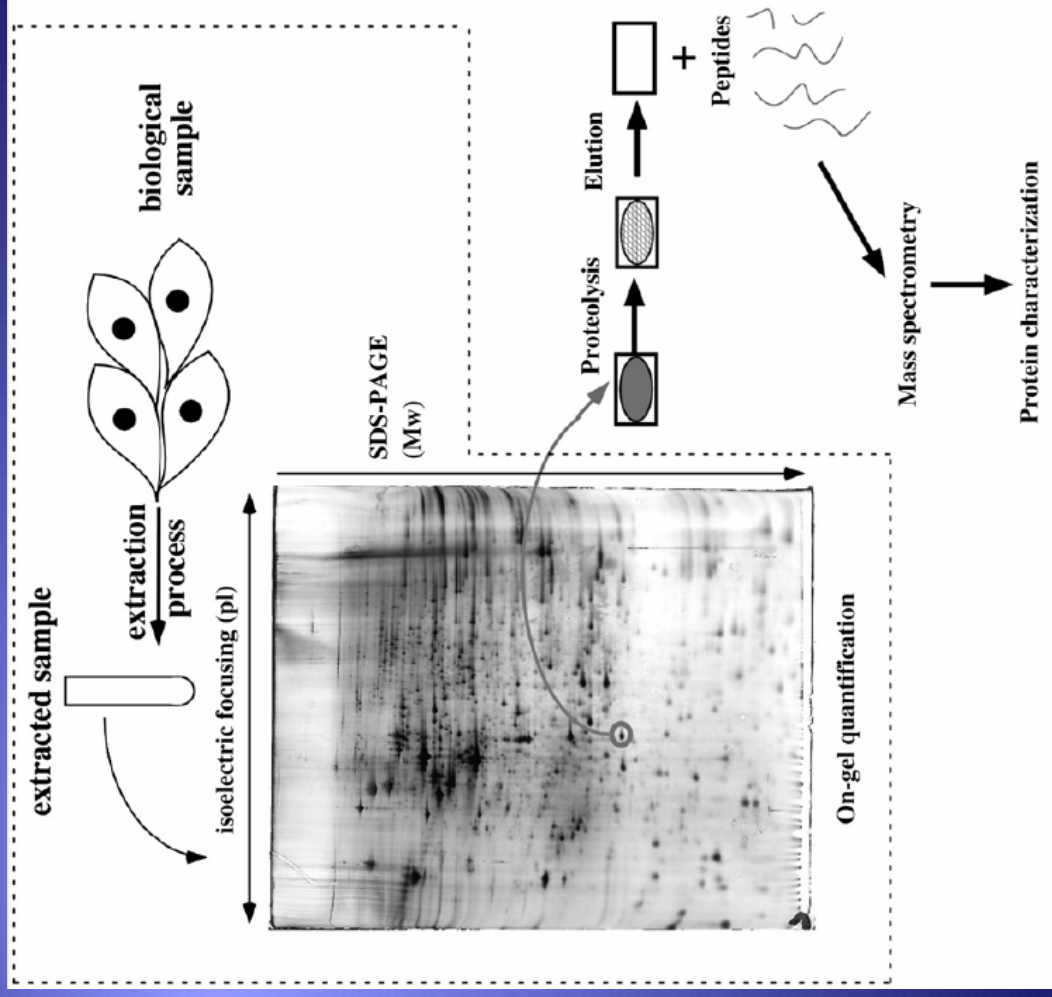
B2. Izoelektrično fokusiranje

C. „Strip“ – odrezek gela gre v pufer z NaDs

D. Ta odrezek gre nad NaDS gel, separacija samo na podlagi mase

Potem detekcija na gelu à Mitja

UPORABAV PROTEOMIKI



PREDNOSTI 2D ELEKTROFOREZE

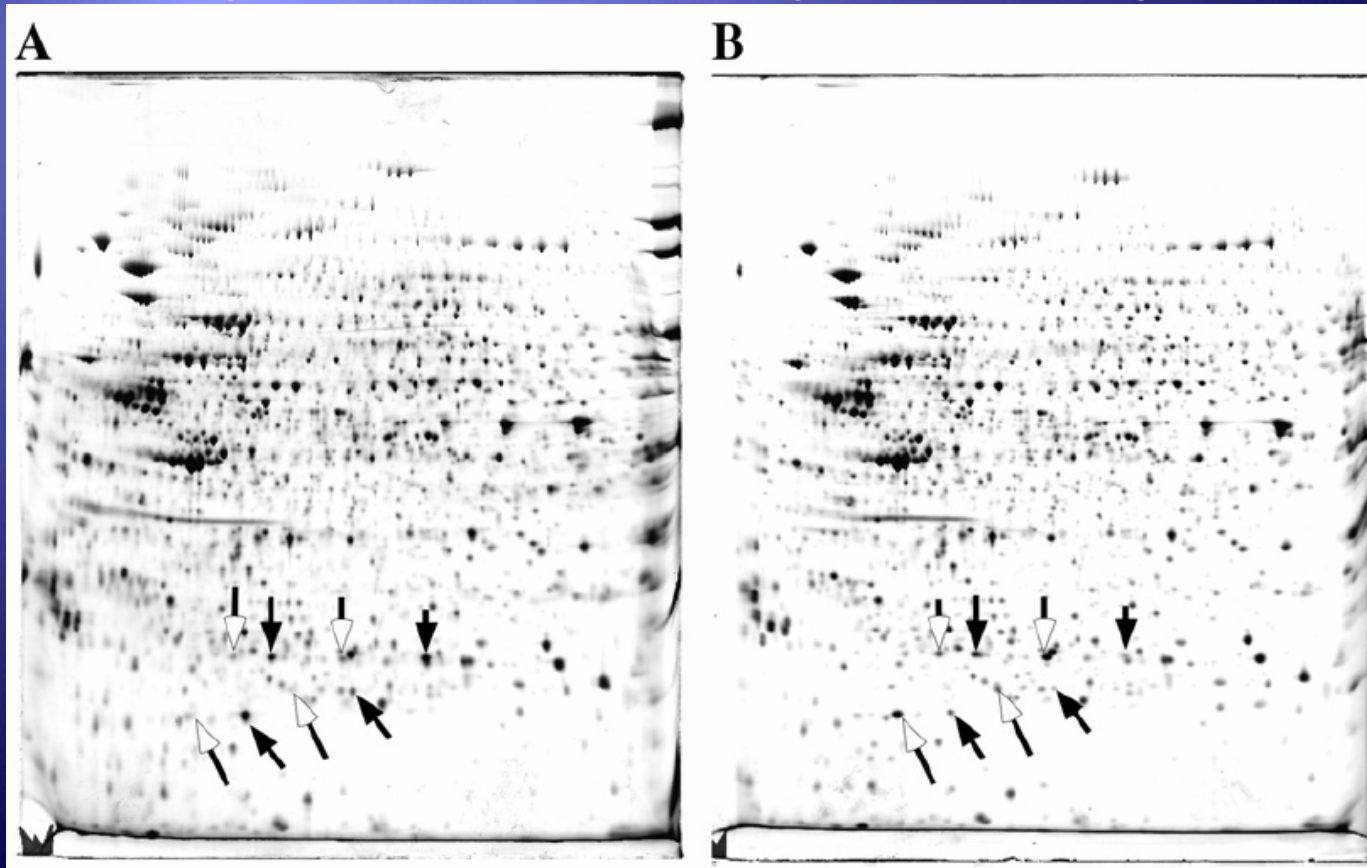
- ◆ Pogosto uporabljena metoda v proteomiki
- 1. Analizirati je mogoče (potrebno) le majhen del proteinov v vzorcu (primerjalna študija s ponovitvami)
- 2. Zaradi visoke ločljivosti 2D gela lahko za identifikacijo uporabimo zelo preproste in poceni metode masne spektrometrije

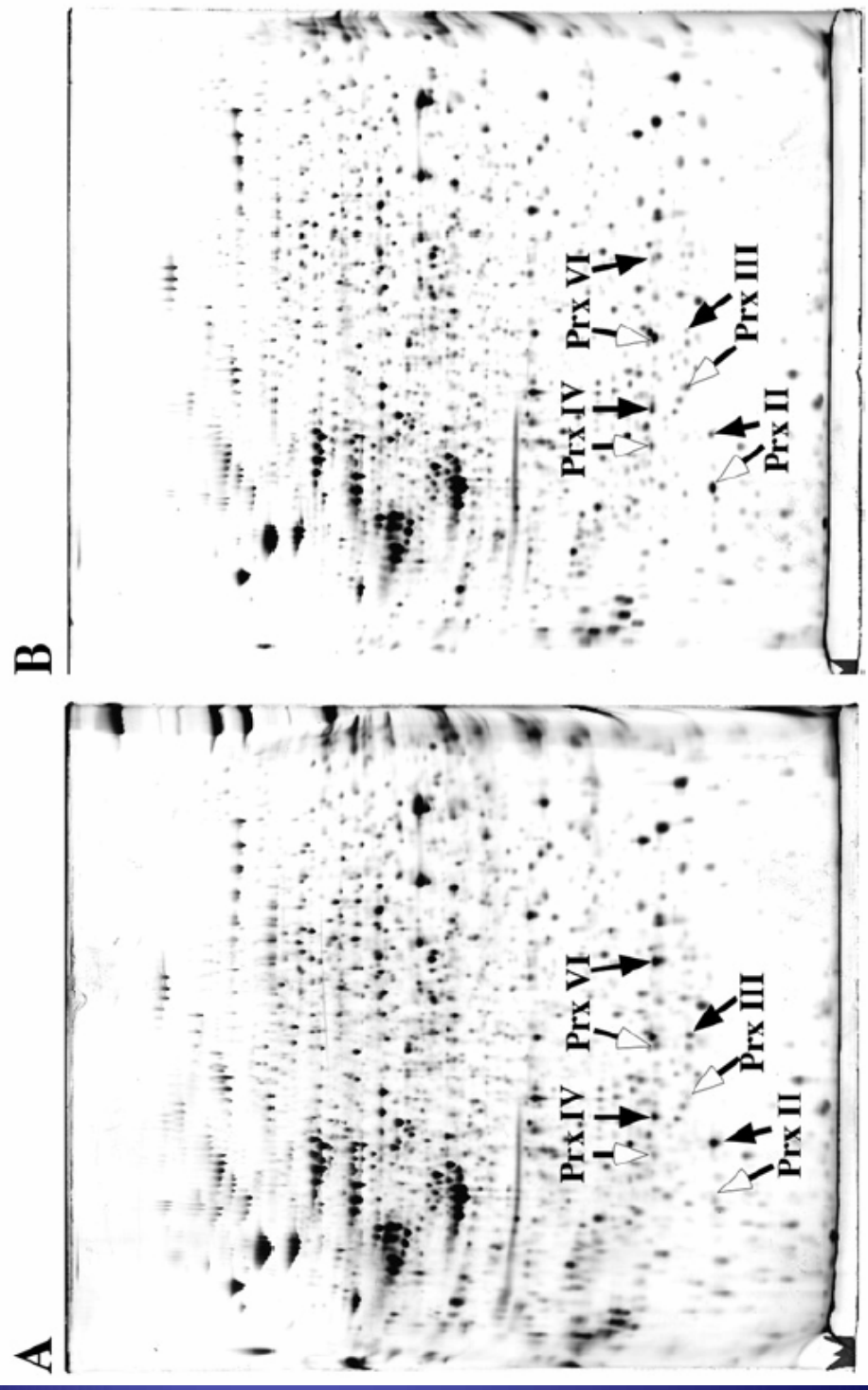
POGOSTA UPORABA

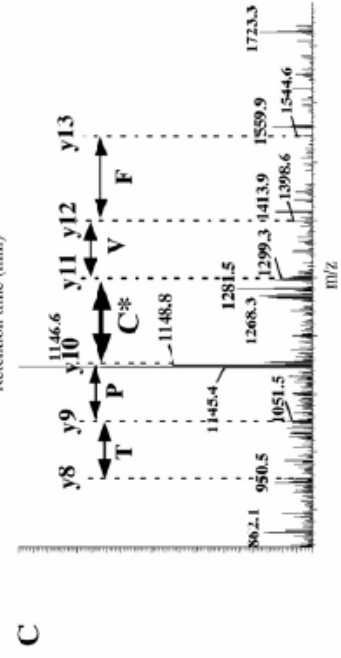
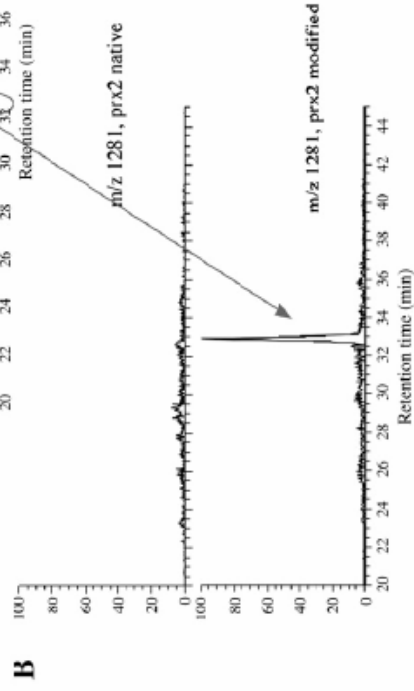
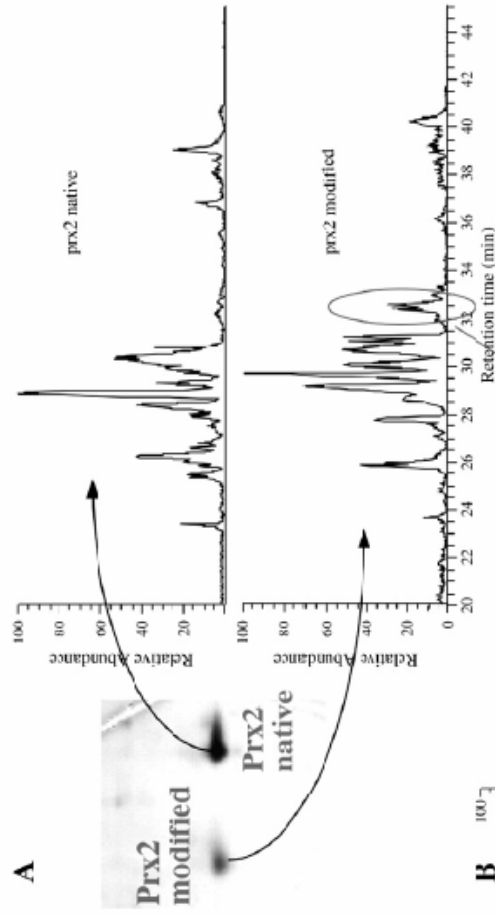
- ♦ Toksikologija
- ♦ Mikro-encimologija
- ♦ Immunoproteomika
- ♦ Odkrivanje in prepoznavanje post-translacijskih modifikacij:
 - a) Detekcija s protitelesi
 - b) Razlika v pl in/ali masi (fosforilacija, glikozilacija)

PRIMER

- ♦ OKSIDATIVNI STRES: Pričakujemo modifikacije proteinov (oksidacija, vpliv na post-translacijske modifikacije)







TRENUTNE OMEJITVE

- ♦ Problem ekspresije genov v evkariontskih celicah (npr. v kvasovki *S. cerevisiae*)
- ♦ V sesalskih celicah lahko preučujemo samo določene beljakovine: metabolne proteine, proteine, ki sodelujejo pri razgradnji in konformacijskih spremembah drugih proteinov, adaptorske proteine, proteine oskidativnega stresa

PRIHODNJE USMERITVE

- ♦ Glavni prednosti: visoka ločljivost in preprosto določanje post-translacijskih sprememb
- ♦ *C. elegans*: 1000 celic, genom vsebuje 20.000 proteinskih genov, 25.000 mRNA
- ♦ Človek: 200 celičnih tipov, 100.000 milijard celic, 22.000 genov za proteine, 50.000 mRNA

VIRI IN LITERATURA

- ♦ Thierry Rabiloud, Cecile Lelong, Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial, Journal of Proteomics 74, 12.6.2011
- ♦ http://www.learner.org/courses/biology/textbook/proteo/proteo_7.html [9.11.2012]
- ♦ <http://juang.bst.ntu.edu.tw/Protein/proteomics/files/2D%20Electrophoresis.pdf> [8.11.2012]
- ♦ <http://www.zrss.si/bzid/geni/pdf/baebler-clanek.pdf> [11.11.2012]
- ♦ <http://juang.bst.ntu.edu.tw/Protein/proteomics/files/2D%20Electrophoresis.pdf> [10.11.2012]
- ♦ <http://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE> [9.11.2012]

Hvala za Vašu pozornost