



ELEKTROFOREZA DWUWYMIAROWA 2-DE BIAŁEK

WPROWADZENIE

Dwuwymiarowa elektroforeza żelowa jest metodą znaną od lat 70-tych ubiegłego wieku. Obecnie jest powszechnie stosowaną metodą rozdzielania pozwalającą na jednoczesną separację tysięcy białek. Umożliwia detekcję białek w szerokim zakresie stężeń, z wysoką rozdzielczością. Jest źródłem informacji dotyczących zmian ekspresji pojedynczych białek badanych proteomów oraz ich modyfikacji. Analiza jest dwustopniowa. W pierwszym etapie białka są rozdzielane w zależności od punktu izoelektrycznego. W drugim etapie białka o podobnym punkcie izoelektrycznym są rozdzielane w zależności od masy cząsteczkowej w elektroforezie SDS-PAGE.

Pierwszym wymiarem w elektroforezie 2-DE jest ogniskowanie izoelektryczne (IEF). Odbywa się ono w nośniku, w którym wartość pH buforu zmienia się w sposób ciągły od wartości najwyższej przy katodzie do najniższej przy anodzie. Ustalenie się gradientu pH możliwe jest dzięki zastosowaniu specjalnych nośników pH zwanych amfolitami. Obecnie w praktyce stosuje się wynalezione przez Bjellqvista i wsp. paski do ogniskowania IPG (ang. *immobilized pH gradient*), na których cząsteczki amfolitów są przyłączone do akrylamidu tworząc stabilny gradient. Proteiny wprowadzone do unieruchomionego żelu poliakrylamidowego o zróżnicowanym pH, migrują wraz z przyłożeniem prądu i zatrzymują się, gdy dotrą do charakterystycznego dla siebie punktu izoelektrycznego. Uzyskuje się w ten sposób separację białek zgodnie z ich wartościami pI, jednocześnie umożliwia to precyzyjne określenie pI poszczególnych białek z próbki.

Paski IPG dostępne komercyjnie występują w różnych długościach i mają różne zakresy gradientu pH, od szerokiego: 2,5-13,0 do bardzo wąskiego (np. 4,5-5,5). Dla uzyskania większej rozdzielczości zalecane jest stosowanie pasków o mniejszym zakresie zachodzącym na siebie. Detergenty stosowane w badaniach IEF muszą być obojętne elektrycznie (niejonowe lub tzw. obojnacze). Najczęściej stosowanymi surfaktantami są NP-40, Triton-X100, CHAPS. Jonowe detergenty, takie jak SDS mogą być jednak użyte do przygotowania próbki w celu lepszego rozpuszczenia i ułatwienia usunięcia składników



wchodzących w reakcję w dalszej części eksperymentu. Małe ilości SDS mogą być tolerowane pod warunkiem dostarczenia dużych ilości mocznika i niejonowych lub obojnaczych detergentów. Próbkę do żelu można wprowadzać trzema różnymi sposobami. Jedną z możliwości jest wymieszanie preparatu do nawadniania paska z próbką i nasączenie taką mieszaniną suchego paska. Pozostałe metody wymagają wcześniejszego nasączenia paska IPG specjalnym przeznaczonym do tego środkiem. Do nasączonego paska próbkę można wprowadzić za pomocą pojemnika umieszczonego blisko jednego z końców paska. Po wprowadzeniu do pojemnika próby włącza się prąd, stąd próbka wprowadzana jest do żelu paska elektroforetycznie. Ostatni ze stosowanych sposobów pozwala na wprowadzenie do paska o długości 18 cm lub większych ilości próbki do 5 mg białka. Pomiędzy jedną z elektrod a paskiem żelowym umieszcza się papierowy pasek nasączony próbką. Duża ilość próbki wymaga położenia pomiędzy katodą a paskiem IPG sporego fragmentu papieru do pochłaniania nadmiaru wody. Następnie podłącza się elektrody umieszczone na nawilżonych wodą destylowaną filtrach papierowych. Po podłączeniu prądu następuje aktywne wprowadzenie próbki do żelu. Ilość nakładanej próbki zależy od długości stosowanego paska i wynosi od 20-100 μ l. Zaleca się nakładanie jak największej dopuszczalnej objętości próbki, w której stężenie białka powinno wynosić do 10 mg/ml.

Rozdzielone ze względu na różne pI białka w drugim wymiarze elektroforezy separuje się ze względu na ich masę cząsteczkową. Do rozdziału niezbędne jest zapewnienie hydrofobowym białkom środowiska, które będzie pozbawione wody, dzięki czemu białka zostaną rozproszone i przestaną tworzyć skupiska. Aby możliwe było ich rozdzielanie w zależności od masy cząsteczkowej białkom tym należy nadać ładunek, np. poprzez zastosowanie SDS. Różnice pomiędzy jednowymiarową SDS-PAGE a dwuwymiarową związana jest ze sposobem przenoszenia próbki. Podczas elektroforezy 1-DE próbki nakładają się do kieszonek, natomiast w elektroforezie 2-DE próbka rozdzielana znajduje się w pasku IPG. Paski są przytwierdzane do płytki żelowej. Gdy wszystko jest przygotowane, włączenie prądu rozpoczyna separację białek.

Najczęściej do barwienia białek uzyskanych w wyniku rozdziału 2-DE używa się barwienia srebrem bądź barwnikiem Coomassie Brilliant Blue. Po przeprowadzeniu rozdziału i wybarwieniu, żele należy zapisać w postaci cyfrowej ze względu na szybko zmieniające się



właściwości żeli. Następnie należy przeprowadzić komputerową analizę dwuwymiarowych obrazów żeli. W jej rezultacie, po zastosowaniu specjalistycznego oprogramowania (SameSpots Progenesis, ImageMaster 2D, PDQuest, czy GELLAB II), powinno się wskazać grupę plamek na żelu różnicującą dwie analizowane próbki. Analiza obrazów żeli z pomocą oprogramowania składa się z kilku etapów: otrzymanie cyfrowego obrazu żelu, korekcja różnic w położeniu plamek przez znalezienie regionów odpowiadających sobie, stworzenie mapy proteomu, wykrycie i opisanie plamek, zastosowanie wzoru rozmieszczenia plamek w celu znalezienia i powiązania odpowiadających sobie plamek na żelach, analiza profilu ekspresji danego białka na poszczególnych żelach i wskazanie plamek różnicujących żele do dalszej identyfikacji. Po zakończeniu komputerowej analizy obrazów żeli kolejnym etapem badań jest wycięcie białka z płytki żelowej i jego analiza na GC/MS.

WYKONANIE

A. Przygotowanie surowej frakcji enzymatycznej do elektroforezy 2-DE

- 48 godziną bulionową hodowlę bakteryjną zwirować przy 5000 rpm przez 30 minut w temperaturze 4°C.
- **UWAGA! We frakcji należy wykonać oznaczenie aktywności 1,2-dioksygenazy katecholowej oraz stężenia białka metodą Bradford’a.**
- Uzyskany osad rozpuścić w buforze fosforanowym o pH 7,2 i sonikować z częstotliwością 20 kHz, w temperaturze 4°C, 6 razy po 15 sekund w odstępach 30 sekundowych z użyciem dezintegratora ultradźwiękowego Vibre Cell.
- **UWAGA! Wszystkie operacje po rozbiciu komórek należy wykonywać w łaźni lodowej.**
- Dla oddzielenia nie rozbitych komórek, zawiesinę zwirować przy 9500 rpm przez 20 minut. Uzyskany supernatant stanowi mieszaninę błon, peryplazmy i cytoplazmy (**Fracja A1**). Do frakcji A1 dodać PMSF.



- Kolejne czynności należy wykonać zarówno dla frakcji A1, jak również dla frakcji F1 przechowywanej w lodówce.
- Frakcje wytrząsać z uwodnionym fenolem (objętościowo 1:1) przez 10 minut, a następnie zwirować przy 5000 rpm, przez 10 minut.
- Zebrać fazę fenolową, a następnie wytrząsać fazę fenolową z 1% roztworem DTE (objętościowo 1:1) przez 5 minut. Zwirować przy 5000 rpm, przez 5 minut.
- Zebrać fazę fenolową, a następnie precypitować białka z fazy fenolowej 0,1 M octanem amonu (objętościowo 1:4) w temperaturze -20°C w czasie 24 godzin.
- Próby zwirować przy 15 000 rpm przez 3 minuty, a następnie przenieść do koncentratora i wirować pod próżnią przez 40 minut.
- Rozpuścić w buforze do przygotowywania próbek 2-DE w temperaturze pokojowej (około 1 godziny). Określić stężenie białka metodą Bradforda korzystając z krzywej kalibracyjnej sporządzonej w obecności buforu do przygotowywania próbek 2-DE. Jeżeli stężenie białka w próbce przekracza stężenie 10 mg/ml, próbę należy odpowiednio rozcieńczyć.

B. Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford’a

- W celu oznaczenie stężenia białka w badanym materiale biologicznym pobrać 200 µl próby, dodać 1 ml odczynnika Bradford’a i starannie wymieszać. Oznaczyć ekstynkcję przy długości 595 nm.

C. Rehydratacja pasków IPG

- Nanieść odpowiednią ilość buforu do próbek 2-DE wzdłuż kanalika tacki hydratacyjnej (340 µl buforu starcza na 1 pasek IPG).
- Używając pincety delikatnie usunąć warstwę ochronną z paska IPG. Zanurzyć jeden koniec paska w buforze zawierającym próbkę, tak aby żel na pasku pozostał w kontakcie z buforem, a napis na pasku czytelny. Rozprowadzić bufor równo po pasku,



aby był całkowicie mokry i nie zawierał bąbelków powietrza. Pasek powinien pływać po powierzchni cieczy i nie może przylegać do dna rynienki.

- Po nasiąknięciu buforu (5-10 minut), należy powlec pasek 2-3 ml oleju silikonowego, aby uniknąć jego wysuszenia podczas całonocnej rehydratacji w temperaturze pokojowej.

D. Izoogniskowanie białek przy użyciu pasków IPG

- Włożyć płytę chłodzącą do aparatu IEF-SYS i ustawić temperaturę chłodzenia na 20°C przynajmniej 10 minut przed użyciem aparatu.
- Nasączone wodą kartki papieru o rozmiarze szklanej ramki na elektrody nałożyć na płytę chłodzącą.
- Nałożyć szklaną ramkę na papier w taki sposób, aby dobrze przylegała. Nałożyć cienką warstwę oleju silikonowego na szklaną płytkę.
- Umieścić paski IPG na szkle żelem do góry, zostawiając przynajmniej 3 mm odstępu między paskami., upewniając się, że koniec z plusem zorientowany jest do anody, a niebieski koniec do katody.
- Zmoczyć 2 elektrodowe tekturowe paski w destylowanej wodzie i umieścić je na końcach żeli.
- Przypiąć elektrody do ramki, upewniając się, że platynowe druciki na całej długości równomiernie przylegają na całej długości do końców pasków IPG. Pokryć każdy pasek olejem silikonowym, aby uniknąć krystalizacji mocznika.
- Umieścić szklaną płytę na elektrodach, aby uniemożliwić ich przesuwanie w trakcie całego procesu. Przeprowadzić izoelektroogniskowanie przy natężeniu prądu 3 mA przez 15 godzin.
- Wyłączyć urządzenie, usunąć pokrywę aparatu i odłączyć elektrody.

E. Przygotowanie pasków do drugiego kierunku SDS-PAGE i rozdział elektroforetyczny



- Przenieść paski IPG z aparatu IEF-SYS do osobnych rynienek czystej tacki rehydracyjnej żelem do góry.
- Pokryć każdy z pasków 7 ml buforu równoważącego I i inkubować przez 10 minut, delikatnie wytrząsając na kołysce.
- Ostrożnie usunąć z tacki rehydracyjnej bufor równoważący I, tak aby nie usunąć pasków.
- Dodać 7 ml buforu równoważącego II do każdej z rynienek tacki i inkubować przez 10 minut delikatnie wytrząsając na kołysce.
- Usunąć paski z tacki i zamoczyć na krótko w buforze Laemmli (o składzie: 4% SDS, 20% glicerol, 120 mM Tris-HCl pH 6,4, 0,05% bromofenol blue), a następnie używając pincety nałożyć pasek na szczyt gotowego żelu poliakrylamidowego, upewniając się, że pomiędzy nimi nie ma bąbelków powietrza.
- Pokryć pasek 0,5% agarozą rozpuszczoną w buforze elektrodowym, aby przytwierdzić go w odpowiedniej pozycji żelu. Po spolimeryzowaniu agarozy żel jest gotowy do drugiego kierunku elektroforezy 2-DE.
- Komorę podłączyć do zasilacza i prowadzić rozdział elektroforetyczny w temperaturze 4°C przy napięciu 60 V dopóki próba znajduje się w żelu zagęszczającym, a następnie przy napięciu 120 do momentu, gdy marker migracji białek osiągnie odległość 1 cm od końca żelu rozdzielającego. Po zakończeniu elektroforezy rozmontować zestaw i pozostawić żel do wybarwienia.

F. Wywoływanie białek w żelu poliakrylamidowym metodą z Coomassie Brilliant Blue

- Żel zanurzyć w roztworze A (130 ml wody destylowanej, 30 ml etanolu i 20 ml kwasu octowego) i wytrząsać w temperaturze 37°C przez 2 godziny. Następnie żel przenieść do roztworu B (130 ml wody destylowanej, 50 ml etanolu, 20 ml kwasu octowego, 0,04 g Coomassie Brilliant Blue R-250) i wytrząsać w temperaturze 37°C przez 20-30 minut. Po inkubacji w roztworze barwnika żel przenieść do roztworu C (160 ml wody



destylowanej, 20 ml etanolu i 20 ml kwasu octowego) i wytrząsać w temperaturze 37°C aż do odbarwienia.

LITERATURA

- Dmitrzak-Węglarz M., Hauser J. Wykorzystanie badań proteomicznych w poszukiwaniu markerów biologicznych dla chorób psychicznych. *Psychiatria* 3, 118-127 (2006).
- Kossowska B., Dudka I., Gancarz R., Antonowicz-Juchiewicz A. Analiza proteomiczna profili białkowych w niektórych stanach patologicznych ludzkiego organizmu. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 63, 549-563 (2009).
- Kraj A., Drabik A., Silberring J. Proteomika i metabolomika. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2010.
- Suchwałko A., Podbielska H. Dwuwymiarowa elektroforeza żelowa: od eksperymentu po profile ekspresji. Część pierwsza- eksperyment. *Acta Bio-Optica et Inform. Med.* 16, 285-292 (2010).
- Suchwałko A., Podbielska H. Dwuwymiarowa elektroforeza żelowa: od eksperymentu po profile ekspresji. Część druga- analiza obrazu. *Acta Bio-Optica et Inform. Med.* 16, 372-380 (2010).
- Walkowiak B., Kochmańska V. Elektroforeza – przykłady zastosowań. Manual firmy Amersham Bioscience.

OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW

- Wykonać zdjęcie żeli z dołączonym opisem.
- Przeprowadzić komputerową analizę dwuwymiarowych obrazów żeli, wskazując grupę plamek na żelu różnicującą dwie analizowane próbki.
- Zaproponuj modyfikację rozdziału w celu uzyskania poprawy rozdzielczości użytej techniki.
- Wymień artefakty, które mogą utrudniać komputerową analizę obrazów żeli.