

Praktická úloha č. 1

**Téma: Molekulárna biológia – vlastnosti proteínov**

Pri štúdiu funkcie jednotlivých proteínov je často veľmi užitočným nástrojom pozmenenie génov, ktoré ich kódujú. Môže ísť o vnesenie mutácie do génu, ktorá znefunkční výsledný proteín alebo inak zmení jeho funkciu. Častou úpravou génu je aj vnesenie značky, tzv. „tagu“, do kódovacej sekvencie génu. Tag – zvyčajne krátky peptid – je potom exprimovaný v spojení so študovaným proteínom a môže nám pomôcť identifikovať jeho umiestnenie v bunke alebo nám môže umožniť takto označený proteín izolovať (purifikovať) z celkového proteínového extraktu z buniek (práve o tomto využití tagu sa viac dozviete v dnešnej úlohe).

Kvasinky sú vynikajúcim modelovým organizmom v molekulárnej biológii okrem iného preto, že umožňujú jednoduchú expresiu tagovaných génov, pre jednoduchosť ich kultivácie a následnej izolácie proteínov.

Vašou úlohou dnes bude izolovať proteíny z kvasinkovej kultúry a separovať takto izolované proteíny prostredníctvom elektroforézy na denaturačnom géli. Dostanete k dispozícii kvasinkovú kultúru a pomocou alkalickej lýzy oslabíte kvasinkové bunkové steny natoľko, že ich potom bude jednoduché rozbiť. V takto pripravených bunkových lyzátach ďalej pomocou silného iónového detergentu denaturujete proteíny a vzorku naniesiete na polyakrylamidový gél, ktorý bude následne umiestnený do elektrického poľa (PAGE = polyakrylamidová gélová elektroforéza). Výsledkom bude, že zistíte efektivitu extrakcie (podľa intenzity proteínového signálu na géli po zafarbení) a budete separovať izolované proteíny podľa veľkosti (čím menší proteín, tým rýchlejšie sa bude pohybovať v géli).

Tento praktický experiment je súčasťou väčšieho projektu, v ktorom bude vaším cieľom overiť produkciu označeného proteínu v kvasinkách, izolovať ho a zistiť, aká by mohla byť jeho funkcia. Okrem praktickej úlohy (v ktorej budeme hodnotiť, ako efektívne sa vám podarilo izolovať kvasinkové proteíny a ako šikovne ste ich naniesli na gél) vás teda čakajú aj doplňujúce teoretické otázky. V tých môže byť vždy správnych viac odpovedí, pokiaľ nie je pri konkrétnej úlohe uvedené, že správna je iba jedna.

**1. úloha: Extrakcia kvasinkových proteínov a separácia na SDS-PAGE**

Pomôcky: rukavice, fixka, kultivačná skúmavka s kvasinkovou kultúrou kmeňa *Saccharomyces cerevisiae* W303, prázdne 1,5 ml skúmavky, skúmavka s extrakčným pufrom (označená EP), mikropipety a zodpovedajúce špičky, nádoby na pevný a tekutý odpad, nádoba s ľadom, hodiny na stene

Spoločné prístroje: centrifúga, termoblok, vortex, PAGE aparátúra s géloom

1. Pripravenú kvasinkovú kultúru pretrepte a odpipetujte 1 ml do 1,5 ml skúmavky.
2. Pripravenú skúmavku centrifugujte 2 minúty na 9000 rpm. (Centrifúga musí byť vyvážená; toto vám pomôže skontrolovať vedúci úlohy.)
3. Odpipetujte supernatant a vyhodte ho do tekutého odpadu. Buďte opatrní, aby ste sa pritom nedotkli peletu a nenasali ho do špičky. Špičku tiež vyhodte.
4. Skúmavku s peletom zaneste vedúcemu úlohy, ktorý vám ho rozsuspenduje v 100 µl 0,2 M NaOH.
5. Vzorku inkubujte 15 minút na ľade, zatiaľ sa venujete riešeniu teoretických úloh.
6. Po inkubácii vzorku centrifugujte 2 minúty na 9000 rpm.
7. Opatrne odpipetujte supernatant a vyhodte ho do odpadu.
8. Resuspendujte pelet v 100 µl extrakčného pufru pipetovaním hore-dolu. Buďte pritom opatrní, aby ste zmes nenasali do pipety.
9. Suspenziu umiestnite do termobloku a inkubujte 5 minút na 95°C. Vzorku z termobloku po inkubácii vyberajte opatrne, aby sa skúmavka neotvorila.
10. Vzorku zvortexujte a centrifugujte 5 minút na 10 000 rpm.
11. 25 µl zo vzorky naneste na PAGE gél do dráhy za pomoci vedúceho úlohy, zvyšok vzorky označte svojím súťažným číslom a odovzdajte vedúcemu úlohy.

Zloženie extrakčného pufru:

20 mM Tris/Cl pH 6,8

10 % glycerol

0,8 % dodecylsírán sodný (SDS)

0,04 % brómfenolová modrá

## 2. úloha: Označte, akú úlohu majú jednotlivé kroky v protokole a použité chemikálie:

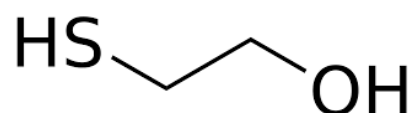
a) Ktorá z použitých látok je iónový detergent?

---

b) Úlohou glycerolu v extrakčnom pufri je:

- A. napomôcť vzorke efektívne sedimentovať v jamke na géli, keďže ide o polysacharid s vysokou molekulovou hmotnosťou
- B. denaturovať proteíny vo vzorke
- C. degradovať nukleové kyseliny vo vzorke
- D. naviazať ostatné bunkové štruktúry okrem proteínov

c) Niekedy môže byť súčasťou nanášacieho pufru aj 2-merkaptóetanol (vzorec nižšie). Aká je jeho úloha?



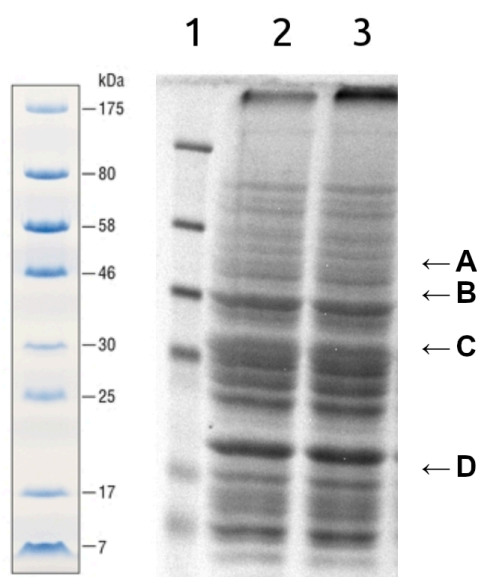
- A. redukovať disulfidové mostíky v proteínoch
- B. redukovať vodíkové mostíky v proteínoch
- C. oxidovať kovalentné väzby v proteínoch
- D. oxidovať peptidové väzby v proteínoch

### 3. úloha: Vyhodnotenie výsledkov SDS-PAGE experimentu.

Na obrázku nižšie vidíte výsledok PAGE gélu potom, ako bol gél po separácii zafarbený farbivom Coomassie Brilliant Blue R-250, ktorá farbí proteíny na modro (aj keď obrázok nižšie je čiernobiely). V tomto prípade však na gél boli okrem vzorky proteínov z kmeňa *S.cerevisiae* W303 nanesené aj dve ďalšie vzorky v tomto poradí:

1. dráha: veľkostný marker
2. dráha: proteínový extrakt z *S. cerevisiae* W303 (*wt* = štandardný typ)
3. dráha: proteínový extrakt z *S. cerevisiae* W303 *6xHis-GBP2* (nesie mutovanú verziu génu *GBP2* spojenú so 6 opakovaniami histidínu, ktoré tvoria spolu tzv. His tag)

Veľkosť proteínu Gbp2 v *S. cerevisiae* je 48 kDa, jedno opakovanie sekvencie His má 0.1 kDa. Naľavo od fotky PAGE je teoretická mapa proteínového veľkostného markera – pri interpretácii výsledkov si všimnite, že na skutočnom PAGE géli v dráhe 1 boli proteíny veľkostného markera separované viac ako na teoretickom obrázku (toto môže okrem iného spôsobiť, že najmenšie proteíny z markera na géli nevidíte, pretože už vymigrovali von z gélu).



a) Ktorá zo šípok správne označuje približnú pozíciu na géli, kde by ste očakávali proteín Gbp2 v štandardnom kmeni?

- A. A
- B. B
- C. C
- D. D
- E. žiadna z vyššie uvedených

b) Dá sa na tomto géli rozlíšiť, ktorý pásik (*band*) zodpovedá štandardnej verzii Gbp2 a ktorý zodpovedá tagovanej verzii?

- A. Áno (v takomto prípade zakrúžkujte na obrázku pásiky (*bandy*), ktoré zodpovedajú štandardnej a tagovanej verzii proteínu Gbp2).
- B. Nie, okrem iného preto, že tagovaná verzia je prítomná v oboch použitých vzorkách.
- C. Nie, okrem iného preto, že na tomto géli je prítomných mnoho iných proteínov, a ich signál pravdepodobne prekryva signál Gbp2.
- D. Nie, okrem iného preto, že na géli je prítomných príliš veľa izoformiem skúmaného proteínu, čo nám neumožňuje spoľahlivo určiť, ktorý pásik (*band*) zodpovedá požadovanej izoforme.

c) Na ktorej strane zobrazeného gélu sa počas separácie nachádzala anóda? (Pozn.: proteíny majú vďaka väzbe SDS záporný náboj.)

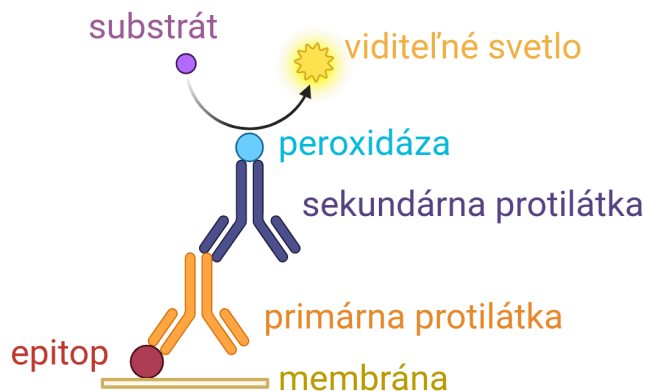
- A. hore
- B. dole
- C. vpravo
- D. vľavo

#### 4. úloha: Western blotting

Na štúdium expresie špecifických proteínov sa často používa Western blot. Ide o metódu, ktorá pozostáva z nasledujúcich krokov:

1. proteíny z PAGE gélu sa prostredníctvom elektrického prúdu **prenesú na membránu** vyrobenú z materiálu, ktorý dobre viaže proteíny. Proteíny na membráne budú na rovnakom mieste, ako boli v géli.
2. membrána s proteínmi je inkubovaná s roztokom **primárnej protilátky**, ktorá sa v ideálnom prípade špecificky naviaže iba na jeden konkrétny epitop (to môže byť buď proteín, ktorý študujeme, ak voči nemu existujú protilátky, alebo tag)
3. membrána je inkubovaná s roztokom so **sekundárnymi protilátkami**, ktoré sa špecificky viažu na primárne protilátky a zároveň sú viazané na nejaký typ látky, ktorá umožňuje vizualizáciu. Najjednoduchší princíp fungovania majú sekundárne protilátky viazané na fluorescenčné farbivá – tieto je možné priamo detegovať v prístroji, ktorý zachytáva fluorescenciu. Častejšie sa používajú sekundárne protilátky viazané na enzým **peroxidázu**. Prítomnosť peroxidázy potom zabezpečí, že iba na mieste, kde sa sekundárna protilátka naviazala na membránu, prebehne enzymatická reakcia, pri ktorej sa používa taký substrát, aby bola výsledkom enzymatickej reakcie produkcia svetla.

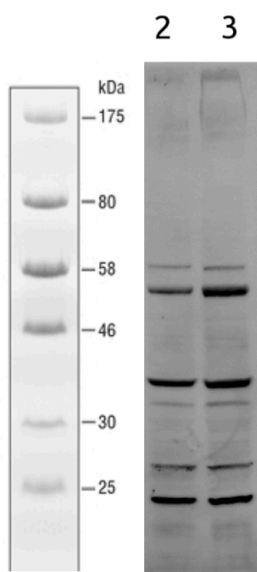
Princíp fungovania detekcie signálu jedného spomenutého typu Western blotu zobrazuje aj táto schéma:



a) Ktoré tvrdenia platia o detekcii signálu vo Western blote, kde sú sekundárne protilátky viazané na peroxidázu?

- A. Výsledný signál je možné detegovať ako tmavý prúžok na bielej membráne.
- B. Výsledný signál je fluorescenčné svetlo.
- C. Emitované svetlo má vlnovú dĺžku spravidla okolo 240 – 260 nm.
- D. Spôsob detekcie signálu závisí od typu primárnej protilátky.
- E. Výsledný signál je potrebné snímať v tme, bez osvetlenia membrány.

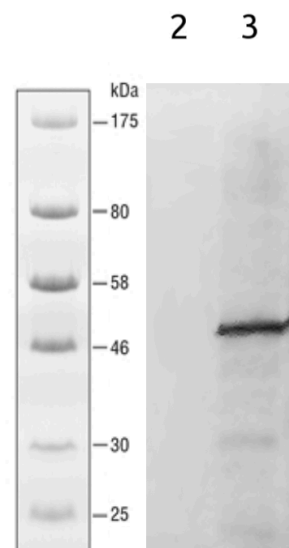
b) Na obrázku je výsledok Western blotu, na ktorý sa použili tie isté proteínové extrakty, ako na PAGE gél z úlohy 3 (zobrazené sú iba dráhy 2 a 3, zodpovedajú dráham 2 a 3 na PAGE géli). Na detekciu proteínu Gbp2 ste použili experimentálnu protilátku voči tomuto proteínu, ktorú ste dostali na otestovanie od biotechnologickej firmy. Ktoré tvrdenia platia o tejto protilátke na základe výsledkov Western blotu? (Na všetkých nasledujúcich Western blotoch poloha pásov na veľkostnom markeri zodpovedá veľkosti proteínov na rovnakom mieste na géli.)



- A. Špecificky sa viaže na Gbp2.
- B. Viaže sa iba na tagovanú verziu Gbp2.
- C. Ide o primárnu protilátku produkovanú v myši.
- D. Táto protilátka má veľkosť približne 58 kDa.
- E. Protilátka sa počas inkubácie s membránou rozpadla na menšie peptidy.
- F. Ide pravdepodobne o polyklonálnu protilátku.

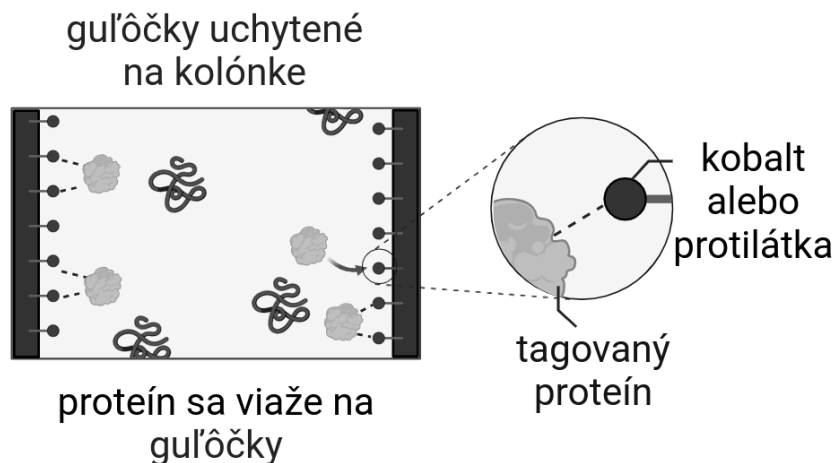
c) V ďalšom pokuse detegovať proteín Gbp2 prostredníctvom Western blotu ste použili protilátku voči His tagu, membránu ste pripravili rovnako ako v predchádzajúcej úlohe. Ako by ste vyhodnotili výsledok experimentu (na obrázku vpravo)?

- A. Expresiu tagovanej verzie Gbp2 sa podarilo potvrdiť.
- B. Gbp2 v štandardnom kmeni má pravdepodobne inú veľkosť, než očakávame, preto ho na tejto membráne nevidno.
- C. Použitá protilátka odhalila aj iné proteíny ako Gbp2.
- D. Použitá protilátka je špecifická.



### 5. úloha: Purifikácia proteínu pomocou afinitnej chromatografie

Prítomnosť tagu na proteíne umožňuje daný proteín izolovať z bunkového lyzátu pomocou tzv. afinitnej chromatografie. Ide o metódu, ktorej princípom je využitie mikroskopických guľôčok, ktoré špecificky viažu daný epitop – môže to byť vďaka prítomnosti špecifickej protilátky na guľôčkách, ale môže ísť aj o iný princíp. guľôčky sú potom inkubované s bunkovým lyzátom, ktorý obsahuje tagovaný proteín. V ideálnom prípade sa tagovaný proteín počas inkubácie na guľôčky naviaže (viď obrázok nižšie). guľôčky sú následne premyté, aby sa odstránili všetky zložky bunkového extraktu, ktoré nie sú naviazané na guľôčky, a potom je študovaný proteín z guľôčok uvoľnený metódou, ktorá zodpovedá typu guľôčok a typu epitopu.



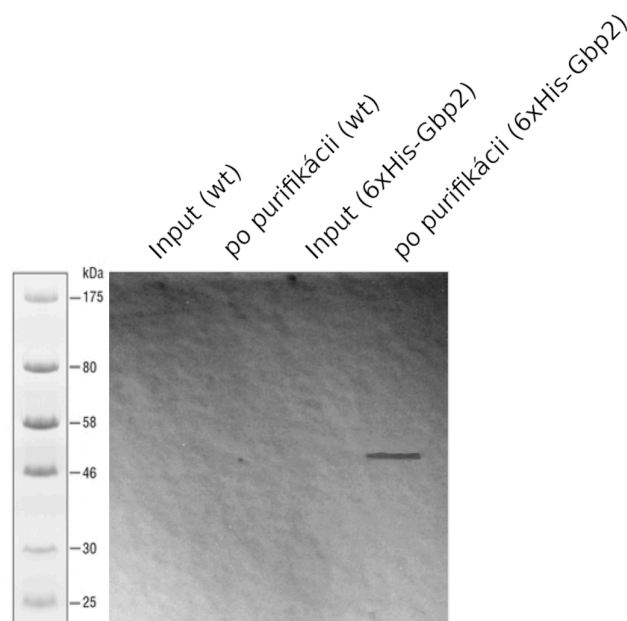
Na afinitnú chromatografiu s His tagom sa používajú kobaltové guľôčky bez akejkoľvek protilátky, pretože  $\text{Co}^{2+}$  efektívne viaže histidín. Proteíny s His tagom je potom možné z kobaltových guľôčok uvoľniť roztokom obsahujúcim imidazol, ktorý má podobnú štruktúru ako histidín a vytláča ho z väzby na  $\text{Co}^{2+}$  guľôčky.

a) Vyberte, ktoré z nasledujúcich možností zodpovedajú krokom 1 – 6 v protokole purifikácie proteínu Gbp2 označeného His tagom. (Pozor, možností je viac ako krokov v protokole.)

- A. Inkubácia guľôčok s roztokom s obsahom 250 mM imidazolu.
- B. SDS PAGE a Western blot na overenie prítomnosti DNA a RNA kontaminantov.
- C. Lýza kvasinkových buniek a inkubácia s proteinázou K.
- D. Inkubácia proteínového extraktu s kobaltovými guľôčkami.
- E. Enzymatické odštiepenie protilátky s naviazaným proteínom z  $\text{Co}^{2+}$  guľôčok.
- F. Rast kvasinkovej kultúry do koncentrácie  $5 \times 10^7$  buniek/ml.
- G. Naviazanie protilátky voči Gbp2 na kobaltové guľôčky.
- H. Premytie guľôčok roztokom bez obsahu imidazolu.
- I. Lýza kvasinkových buniek a extrakcia proteínov z bunkového lyzátu.
- J. Elúcia (uvoľnenie a zozbieranie) roztoku proteínu z  $\text{Co}^{2+}$  guľôčok.
- K. Premytie guľôčok roztokom z obsahom  $\text{Co}^{2+}$ .

1                      2                      3                      4                      5                      6

b) Na obrázku nižšie vidíte výsledok Western blotu, pri ktorom boli použité primárne protilátky voči His tagu, a na ktorý boli nanesené vzorky z proteínových extraktov pred purifikáciou (Input) a po purifikácii afinitnou chromatografiou s kobaltovými guľôčkami z dvoch kmeňov použitých aj v predchádzajúcich experimentoch. Čo platí o výsledkoch tohto experimentu?



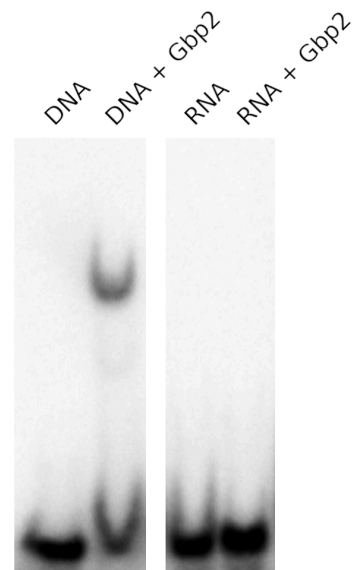
- A. Napriek očakávaniu sa nepodarilo potvrdiť prítomnosť tagovaného proteínu v štandardnom kmeni (wt).
- B. Purifikácia proteínu Gbp2 prostredníctvom afinitnej chromatografie bola úspešná.
- C. Vo vzorke "Input" z kmeňa, v ktorom bol proteín Gbp2 označený His tagom, je proteín Gbp2 prítomný, ale jeho hladina bola príliš nízka na to, aby bol detegovaný prostredníctvom Western blotu.
- D. Na Western blote bol detegovaný iný signál, ako sme očakávali.

## 6. úloha: Testovanie väzobných vlastností proteínu Gbp2

Podľa vašej bioinformatickej analýzy je proteín Gbp2 potenciálnym transkripčným faktorom, teda proteínom, ktorý pomáha navádzať RNA polymerázu II na templát. Aby ste otestovali jeho schopnosť viazať nukleové kyseliny, rozhodli ste sa využiť metódu *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA). Princípom EMSA je zmena rýchlosti pohybu nukleovej kyseliny počas behu elektroforézy. Kontrolná vzorka obsahuje iba študovanú nukleovú kyselinu a v testovacej vzorke sú zmiešané nukleová kyselina a študovaný proteín. Ak sa proteín na nukleovú kyselinu viaže, toto ju pri pohybe v elektrickom poli spomalí, a výsledkom je pozorovateľný rozdiel medzi pozíciou pásika zodpovedajúceho čistej nukleovej kyseline a pásika zodpovedajúceho nukleovej kyseline s naviazaným proteínom.

a) Na obrázku nižšie vidíte výsledok experimentu EMSA, v ktorom boli ako nukleové kyseliny použité RNA a DNA rovnakej sekvencie, a proteín Gbp2. (Vizualizácia signálu bola urobená vďaka tomu, že nukleové kyseliny použité v experimente boli rádioaktívne – všetky viditeľné pásiky na géli teda obsahujú nejakú nukleovú kyselinu. Vzorky migrovali v smere zhora nadol.) Čo z tohto experimentu vyplýva?

- A. Gbp2 sa neviaže na testované nukleové kyseliny.
- B. Gbp2 sa viaže na DNA silnejšie než na RNA.
- C. Gbp2 sa viaže na DNA, ale nie na RNA – nemôže teda fungovať ako transkripčný faktor.
- D. Pri zvýšení koncentrácie proteínu Gbp2 v tomto experimente by sme očakávali, že v dráhe "DNA + Gbp2" (kde bola vzorka zmiešanej DNA a proteínu) bude so stúpajúcou koncentráciou Gbp2 miznúť signál z horného pásika a pribúdať signál v spodnom pásiku.



Táto úloha bola poslednou v tejto praktickej úlohe.



**Priestor pre spätnú väzbu:**

Zdala sa vám úloha ťažká? Čo sa vám na nej páčilo/nepáčilo?