

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 9

Issue 3

Különszám/Special Issue

Gödöllő
2013



MINTA-ELŐKÉSZÍTÉSI ÉS FRAKCIONÁLÁSI LEHETŐSÉGEK A TOJÁS PROTEOMIKAI VIZSGÁLATA SORÁN

Gulyás Gabriella, Radócz Tünde, Jávor András, Czeglédi Levente

Debreceni Egyetem, Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Állattudományi,
Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Állattenyésztési Tanszék
4032 Debrecen, Böszörményi út 138.
gulyas@agr.unideb.hu

Összefoglalás

Az állattenyésztésben jelenleg fiziológiai, szaporodásbiológiai, immunológiai, hús- és tejtermelés biológiai kísérletekben használnak proteomikai vizsgálatokat, bár ezek felhasználási területei még korlátozottak. Más módszerekkel ellentétben, melyek egy időben mindössze néhány fehérje meghatározását végzik, a proteomikai vizsgálatokkal lehetőség nyílik egy mérésen belül több ezer fehérje meghatározására, így nyomon követhetjük a sejtek válaszait a kísérleti beállítások hatására bekövetkező változásokra. A tojás proteomjának poliakrilamid gél alapú analízise még nem kiforrt, a nemzetközi irodalomban kevés számú részletesen közölt protokoll található, így a mintatisztítás és frakcionálás lépései igen hosszú optimalizálást igényelnek. Ezek mellett a tojásfehérje minták fehérjefrakciójának 77%-át három nagy gyakoriságú fehérje teszi ki: a nagy arányban előforduló fehérjék a géleképeken elfedhetik a számunkra nagyobb jelentőséggel bíró kisebb gyakoriságú proteineket, ezért a tojásfehérje mintáknál nagy kihívást jelent, hogy csökkentjük ezek gyakoriságát. Munkánk során több minta-előkészítési és frakcionálási módszert teszteltünk: különböző összetételű lízispufferekkel szolubilizáltuk a fehérjéket, molekulásúly szerint frakcionáltunk szeparáló oszlopok segítségével. A nagy gyakoriságú fehérjék számának csökkentését egy fehérje-specifikus peptid-ligand kötődésen alapuló rendszerrel végeztük. Egy optimalizált eljárás kidolgozásával megnő annak a valószínűsége, hogy az adott kezelésre reagáló fehérje-biomarkereket azonosítsuk.

Kulcsszavak: tojás, proteomika, poliakrilamid gélelektroforézis

Possibilities of sample preparation and fractionation in egg proteomics

Abstract

The application of proteomics is relevant to physiology, reproduction, immunology, muscle and lactation biology in animal science, although its use is still limited. Thousands of proteins can be analysed using proteomics in an experiment, while other methods analyse just a few proteins at a time. Consequently, the cell response to the altered environment can be thoroughly monitored by proteomic tools. There is a lack in the knowledge of gel-based proteomic methods of egg as only a limited number of protocols can be found in the literature, thus sample purification and fractionation require a time consuming optimisation procedure. In addition, three high-abundance proteins represent 77% of egg white proteins. These proteins make the detection of low-abundance proteins very difficult, so the dynamic range of protein concentrations should be reduced. The aim of this study was to test different sample preparation and fractionation methods. Egg proteins were solubilized with different lysis buffers and separated based on molecular



weight of proteins with ultrafiltration. A highly diverse bead-based library of combinatorial peptide ligands was used to reduce the high-abundance proteins in egg samples. Development of an optimised method can increase the chance of identification of protein biomarkers.

Keywords: egg, proteomics, polyacrylamide gel electrophoresis

Irodalmi áttekintés

Más módszerekkel ellentétben, melyek egy időben mindössze néhány fehérje meghatározását végzik, a proteomikai vizsgálatokkal lehetőség nyílik egy mérésen belül több ezer fehérje meghatározására (*Lippolis és mtsai*, 2008). A proteomikai vizsgálatok számos bonyolult módszert kombinálnak a fehérjék azonosítására és mennyiségi meghatározására (*Dutt és mtsai*, 2000). Leggyakrabban használt eljárás az egy- és kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel (1D és 2D PAGE) szeparált fehérjék enzimes hidrolízis utáni tömegspektrometriás meghatározása. Az állattenyésztésben jelenleg fiziológiai, szaporodásbiológiai, immunológiai, hús- és tejtermelés biológiai kísérletekben használnak proteomikai vizsgálatokat, bár ezek felhasználási területei még korlátozottak (*Bendixen és mtsai*, 2011).

A tojás kétdimenziós poliakrilamid gél alapú analízisének metodikája még nem kiforrt, a nemzetközi irodalomban kevés számú részletesen közölt protokoll található, így a mintakezelés, tisztítás, frakcionálás lépései igen hosszú optimalizálási munkát igényelnek. Ezek mellett a tojásfehérje minták fehérjefrakciójának 77%-át három, nagy gyakoriságú fehérje teszi ki: 54% ovalbumin, 12% ovotranszferrin, 11% ovomucoid (*Boschetti és Righetti*, 2008), a tojás sárgájában is megtalálható számos nagy gyakoriságú fehérje. Ezek a nagy számban előforduló fehérjék a gélképeken elfedhetik a számunkra nagyobb jelentőséggel bíró kisebb gyakoriságú proteineket (*Farinazzo és mtsai*, 2009), ezért nagy kihívást jelent, hogy csökkentsük ezeknek a fehérjéknek a gyakoriságát. A 2D gél alapú vizsgálatok sikerességét nagymértékben befolyásolja a minta előkészítése (*Molloy*, 2000). Figyelembe kell vennünk a vizsgált fehérjék oldhatóságát, méretét, töltését, izoelektromos pontját, melyek alapján különböző fehérjefrakciókat hozhatunk létre.

Jelen tanulmányban célul tűztük ki, hogy különböző minta-előkészítési és frakcionálási lehetőségeket teszteljünk tojásfehérje és tojásárgája mintákon, melyek segítségével a későbbiekben a tojásminták proteomikai elemzésének hatékonysága javulhat.

Anyag és módszer

Mintagyűjtés

Friss tojást gyűjtöttünk ketreces tartástechnológiában tartott tyúkoktól. A tojásfehérjét és -sárgáját elválasztottuk egymástól, majd a tojásfehérjét mágneses keverővel homogenizáltuk, hogy csökkentsük a viszkozitását (*Qiu és mtsai*, 2012). A mintákat a további felhasználásig cryocsövekben, -80°C-on tároltuk.

Mintatisztítás és frakcionálás

A -80°C-on tárolt mintákból, a tojásfehérje és -sárgája esetében is, 30µl-t homogenizáltunk 500µl lízispufferben. Két különböző lízispuffert teszteltünk: 1. puffer: 2M thiourea, 8,5M urea, 4% CHAPS, 60mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte, 2. puffer: 8,5M urea, 2% CHAPS, 50mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte. Egy órát jégen inkubáltuk a



mintákat gyakori vortexelés mellett, ezt követően 15000g-n 45 percig centrifugáltuk. A felülúszót használtuk a későbbi vizsgálatokhoz.

További kezelésként a felülúszó egy részét 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) segítségével is tisztítottuk. A kit megszabadítja a mintát a detergensektől, sóktól, nukleinsavaktól és lipidektől, valamint koncentrálja a fehérjéket. A tisztítás sikerességét egy- és kétdimenziós gélelektroforézissel ellenőriztük.

A méret szerinti frakcionálás szeparáló szűrők segítségével történt: három különböző mérettartományú filtert használtunk: 100kD, 50kD és 30kD. 1 ml (1mg/ml) mintát vittünk fel a 100kD-os centrifugális szűrőre, melyet 700g-n 30 percig centrifugáltunk. Az átfolyó fehérje oldatot az 50 és a 30kD-os fehérje szeparáló szűrőre vittük tovább, majd 10000g-n 30 percig centrifugáltuk (Greening és Simpson, 2010). A frakcionálás hatékonyságát egydimenziós gélelektroforézissel vizsgáltuk.

A nagy gyakoriságú fehérjék számának csökkentése ProteoMiner Kittel (Bio-Rad) történt (a gyártó által javasolt protokollt követve). A kit fehérje-specifikus elválasztást tesz lehetővé, mely peptid-ligand kötődésen alapul. Az elválasztás sikerességét egydimenziós gélelektroforézissel ellenőriztük.

Egy- és kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis

Az egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézist megelőzően a mintákat SDS tartalmú pufferben forraltuk 5 percig. 30 μ g fehérjét vittünk fel a 4-12%-os gradiens gélekre, majd 170V feszültséggel futtattuk, míg a jelző festék el nem érte a gél alját.

A kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézishez a különböző módon előkészített minták mindegyikéből 200 μ g fehérjét vittünk fel a 7cm-es pH 3-10-es és pH 5-8-as IPG stripekre. A rehidratáló oldat összetétele: 2M thiourea, 8M urea, 2% CHAPS, 15mg/ml DeStreak reagens, 0,2% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, 0,002% Bromphenol Blue. A pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban. Az izoelektromos fókuszálás lépései: 1. lépés 250V 20min Linear Ramp; 2. lépés 4000V 2,5h Linear Ramp; 3. lépés 4000V 10000Vh Rapid Ramp, 20°C-on 50 μ A/strip. A fókuszált stripeket az SDS-PAGE előtt equilibráltuk. 10 percig inkubáltuk az equilibráló I. oldatban (6M urea, 2% SDS, 0,05M Tris/HCl pH 8,8, 20% glycerol, 2% DTT), majd 10 percig az equilibráló II. oldatban (6M urea, 2% SDS, 0,05 M Tris/HCl pH 8,8, 20% glycerol, 2,5% iodoacetamide). Második dimenzióban 12%-os géleken történ a fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztása. A futtató puffer 1X Tris-Glycin-SDS oldat volt. A poliakrilamid géleken lévő fehérjefoltok láthatóvá tételére Colloidal Coomassie G-250 festéket használtunk (Dyballa és Metzger, 2009).

Eredmények és értékelés

Számos tesztelő futtatást követően kiválasztottuk a nagyobb hatékonyságú lízispuffert, melynek összetétele a következő volt: 2M thiourea, 8,5M urea, 4% CHAPS, 60mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte. A tojássárgája és a tojásfehérje minták esetén is ezt a puffert alkalmaztuk a további vizsgálatoknál. Az 1. és 2. ábrán látható a tojásfehérje és tojássárgája poliakrilamid gélképe a kétdimenziós elválasztást követően. 2-D Cleanup Kit (BioRad) segítségével tisztítottuk tovább a felülúszókat, majd egy- és kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el a fehérjéket. A tojássárgája minták esetén a 2D gélképeken a Cleanup Kit 20%-kal növelte a látható fehérje spotok számát, a tojásfehérje mintáknál ezt nem tapasztaltuk. Az 1D géleken egyik mintatípusnál sem történt javulás Cleanup Kit hatására (3. ábra). Tojássárgája és -fehérje minták esetén a centrifugális szűrők segítségével végzett

szeparálással nem értük el a kívánt eredményt. Három különböző mérettartományú filtert teszteltünk (100kDa, 50kDa és 30kDa). A 100kDa-os szűrők, melyeknek a 100kDa-nál kisebb fehérjéket át kellene engedniük, szinte a teljes fehérjemennyiséget visszatartották. A 100kDa-os szűrőn történt szeparálást követően a fennmaradt fehérje frakció egydimenziós gélképe a 4. ábrán látható. Ennél a két mintánál csak a 100kDa-nál nagyobb régióban szabadna sávoknak megjelenni a gélen. Az 50 és 30kDa-os szűrőkkel sem értük el a kívánt eredményt. Ennél a két típusnál, a gyártó ajánlása alapján, a 100kDa-os szűrőn átfolyó fehérje frakciót használtuk a szeparáláshoz. Szintén a 4. ábrán látható a szeparálás eredménye; megfigyelhető, hogy az 50 és a 30 kDa-nál nagyobb régiókban is több fehérje sáv található. Azt valószínűsítjük, hogy a minta komplexitása miatt nem működtek megfelelő hatékonysággal a méret szerint szeparáló centrifugális szűrők.

A fehérje-specifikus elválasztást ProteoMiner (BioRad) kittel végeztük, mely egy peptid-ligand kötődésen alapuló rendszer. A kereskedelmi forgalomban nem kaphatók olyan peptid-ligand könyvtárak, melyek a tojásmintákban lévő nagy gyakoriságú fehérjék számát csökkentenék, de a vérplazmára optimalizált kitek esetleg működhetnek tojásminták esetében is. A 3. ábra 5. oszlopában ProteoMiner kittel tisztított tojássárgája minták láthatók. Ha összehasonlítjuk ezeket a 2. oszlopban lévő csak lizispufferrel kezelt mintával, látható, hogy a ProteoMiner használatával a 100-200kDa-os, valamint az 50-75kDa-os régióban több fehérjesáv vált láthatóvá. A ProteoMiner-rel tisztított tojásfehérje mintáknál az egydimenziós poliakrilamid géleken nem jelentek meg új sávok (3. ábra 6. minta) a csak lizispufferrel kezelt mintákhoz képest (3. ábra 1. oszlop), de a nagy gyakoriságú fehérjék, pl. a 45 kDa körül látható ovalbumin és a 70kDa-nál látható ovotransferrin mennyisége csökkent.

1. ábra: Tojásfehérje 2D PAGE gélképe, pH 3-10 és pH 5-8 stripek használatával

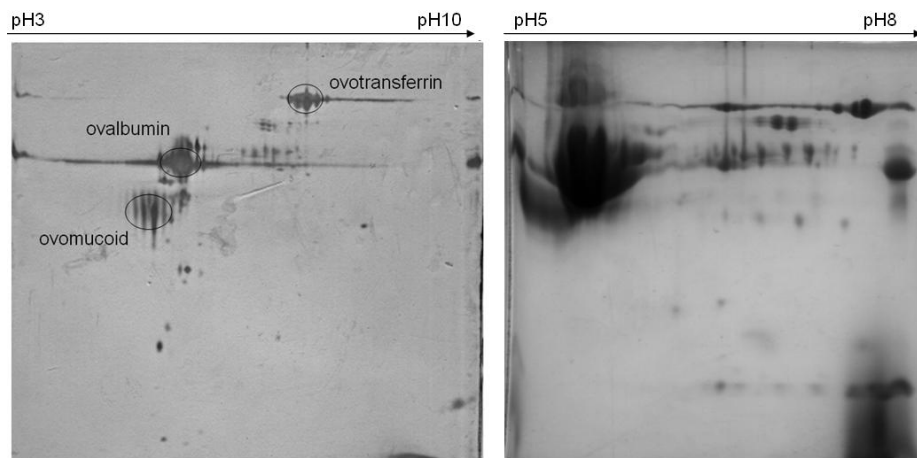


Fig. 1: Two-dimensional gelelectrophoresis of egg white, pH ranges are 3-10 (left) and 5-8 (right)

2. ábra: Tojássárgája 2D PAGE gélképe, pH 3-10 és pH 5-8 stripek használatával

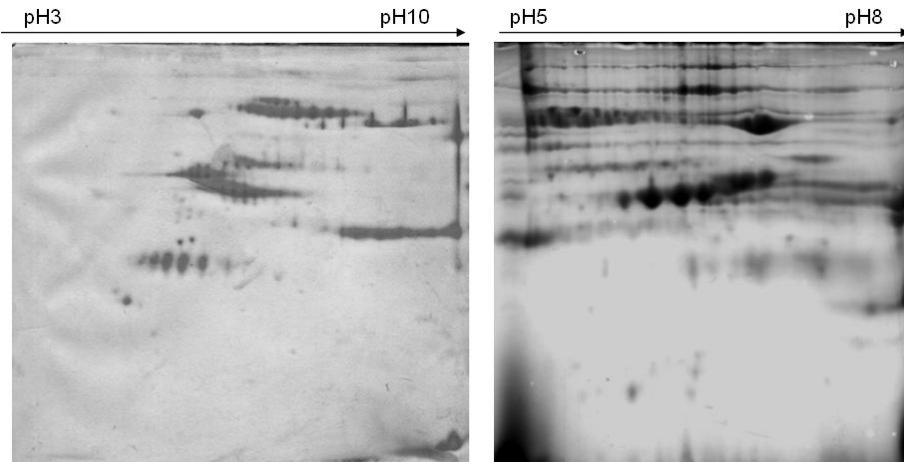


Fig. 2: Two-dimensional gelelectrophoresis of egg yolk, pH ranges are 3-10 (left) and 5-8 (right)

3. ábra: Tojásminták egydimenziós gélképe 2D-Cleanup Kit és ProteoMiner Kit használatát követően

1. tojásfehérje, 2. tojássárgája, 3. tojássárgája (2D-Cleanup Kit), 4. tojásfehérje (2D-Cleanup Kit), 5. tojássárgája (ProteoMiner), 6. tojásfehérje (ProteoMiner)

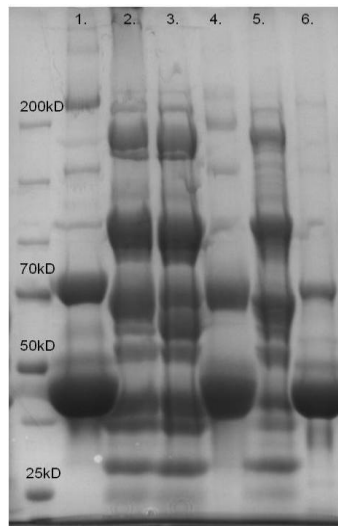


Fig. 3: One-dimensional gelelectrophoresis of egg samples using 2D-Cleanup Kit and ProteoMiner Kit

1. egg white, 2. egg yolk, 3. egg yolk using 2D-Cleanup Kit, 4. egg white using 2D-Cleanup Kit, 5. egg yolk using ProteoMiner, 6. egg white using ProteoMiner

4. ábra: Méret szerinti frakcionálás centrifugális szűrőkkel

1. tojássárgája $100\text{kDa} \geq$ fehérjék, 2. tojásfehérje $100\text{kDa} \geq$ fehérjék, 3. tojássárgája $50\text{kDa} \leq$ fehérjék, 4. tojásfehérje $50\text{kDa} \leq$ fehérjék, 5. tojássárgája $30\text{kDa} \leq$ fehérjék, 6. tojásfehérje $30\text{kDa} \leq$ fehérjék

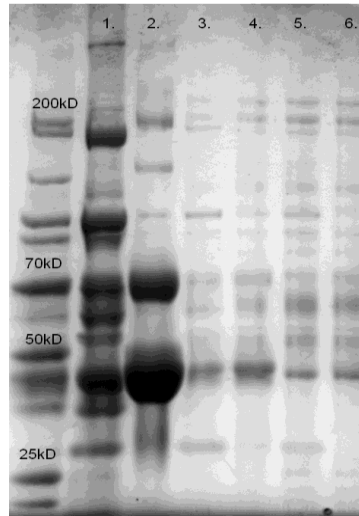


Fig. 4: Fractionation using centrifugal ultrafiltration

1. egg yolk $100\text{kDa} \geq$ proteins, 2. egg white $100\text{kDa} \geq$ proteins, 3. egg yolk $50\text{kDa} \leq$ proteins, 4. egg white $50\text{kDa} \leq$ proteins, 5. egg yolk $30\text{kDa} \leq$ proteins, 6. egg white $30\text{kDa} \leq$ proteins

Következtetések és javaslatok

A minta-előkészítés és frakcionálás során három fontos tényezőt kell szem előtt tartanunk. Az egyik a fehérjék kinyerésének hatékonysága, a másik kettő pedig az idő- és költségtakarékosság.

A megfelelő lízispuffer kiválasztása sarkallatos pontja a proteomikai vizsgálatoknak, hiszen itt dől el, hogy mennyi fehérjét tudunk oldatba vinni. Jelen esetben a magasabb koncentrációban jelen lévő kaotrópikus és redukáló ágenseket (urea, thiourea, DTT), valamint denaturáló szert (CHAPS) tartalmazó oldat bizonyult hatékonyabbnak. A pH 5-8-as stripek használatával jobb felbontást érthetünk el az adott tartományban, bár így azok a fehérjék, melyek ezen a régió kívül estek nem látszottak a gélen. A Cleanup Kit használata sok mintatípusnál elengedhetelen (pl. vérplazma), mert a magas sókoncentráció lehetetlenné teszi az izoelektromos fókuszálást. A tojássárgája minták esetén a 2D gélképeken a Cleanup Kit 20%-kal növelte a látható fehérje spotok számát. A többi esetben nem tapasztaltunk szignifikáns javulást. A ProteoMiner Kit használata az egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis alapján tojássárgája minták esetén indokolt, a tojásfehérje mintáknál nem növelte a fehérje sávok számát.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



Irodalomjegyzék

- Bendixen, E., Danielsen, M., Hollung, K., Gianazza, E., Miller, I.* (2011): Farm animal proteomics – A review. *Journal of proteomics*, 74. 282-293.
- Boschetti, E., Righetti, P.G.* (2008): The ProteoMiner in the proteomic arena: A non-depleting tool for discovering low-abundance species. *Journal of proteomics*, 71. 255-264.
- Dutt, M.J., Lee, K.H.* (2000): Proteomic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11. 176-179.
- Dyballa, N., Metzger, S.* (2009): Fast and sensitive Colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrilamide gels. *Journal of Visualised Experiments*, 30. 1431.
- Farinazzo, A., Restuccia, A., Bachi, A., Guerrier, L., Fortis, F., Boschetti, E., Fasoli, E., Citterio, A., Righetti, P.G.* (2009): Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of Chromatography A*, 1216. 1241-1252.
- Greening, D.W., Simpson, R.J.* (2010): A centrifugal ultrafiltration strategy for isolating the low-molecular weight ($\leq 25K$) component of human plasma proteome. *Journal of proteomics*, 73. 637-648.
- Lippolis, J.D., Reinhardt, T.A.* (2008): Centennial Paper: Proteomics in animal science. *Journal of Animal Science*, 86. 2430-2441.
- Molloy, M.P.* (2000): Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Analytical Biochemistry*, 280. 1-10.
- Qiu, N., Ma, M., Cai, Z., Jin, Y., Huang, X., Huang, Q., Sun, S.* (2012): Proteomic analysis of egg white proteins during the early phase of embryonic development. *Journal of proteomics*. 75. 1895-1905.