

A tojás proteomjának frakcionálása folyadék közegben az izoelektromos pont alapján

Gulyás Gabriella – Jávör András – Radócz Tünde – Simon Ádám – Czeglédi Levente

Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,

Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen

gulyas@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A proteomikai vizsgálatoknál mindig komoly problémát jelent a minták komplexitása, hiszen egy-egy szövettípus akár több ezer különböző fehérjét is tartalmazhat. Ezért is okoz nehézséget, hogy megtaláljuk azokat a fehérjéket, melyek ténylegesen reagálnak az általunk elvégzett kezelésre. A minták előkészítése során ezt az összetettséget elő-frakcionálással csökkenthetjük, ezáltal növekedhet a detektálható fehérjék száma. Számos frakcionálási módszer közül választhatunk, melyek alapjául a fehérjeminták különböző fizikai és kémiai tulajdonságai szolgálnak, ilyen módszer a folyadék közegben izoelektromos pont szerinti frakcionálás. Munkánk során célul tűztük ki, hogy tojássárgája és –fehérje minták folyadék közegben történő izoelektromos pont szerint frakcionálását elvégezzük. Ehhez optimalizáltuk a készülékre felvitt fehérjemennyiséget és ampholyte koncentrációt, teszteltük melyik az alkalmasabb mintapuffer és az elektroforézis során milyen feszültség beállításokat használunk. Tojássárgája minták esetén kiválasztottuk a frakcionálás szempontjából optimális beállításokat: fehérjemennyiség 3 mg; ampholyte koncentráció 2 v/v%; minta puffer összetétele: 7 M urea, 2 M thiourea, 2 m/v% CHAPS, glycerol 10 v/v%; elektroforézis kondíciói: 150 V–10 min, 200 V–10 min, 300 V–60 min. Tojásfehérje minták esetén nem sikerült megtalálni az optimális frakcionálási beállításokat.

Kulcsszavak: tojás, izoelektromos pont, proteomika

SUMMARY

The application of proteomics is relevant to physiology, reproduction, immunology, muscle and lactational biology in animal science, although its use is still limited. One of the greatest challenges of proteome analysis is the reproducible fractionation of the complex protein mixtures. The fractionation methods can increase the probability of biomarker protein discovery. The fractionation by liquid-phase isoelectric focusing is one of the prefractionation methods. As a result, protein fractions can be easily collected, pooled and refractionated. 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. The aim of this study was to fractionate egg yolk and white proteins by isoelectric point in liquid phase.

Keywords: egg, isoelectric point, proteomics

BEVEZETÉS

Az állattenyésztésben jelenleg élettani, szaporodás-biológiai, immunológiai, hús- és tejtermelés biológiai kísérletekben használnak proteomikai vizsgálatokat, bár ezek felhasználási területei még korlátozottak (Bendixen et al., 2011). A proteomikai vizsgálatoknál mindig komoly problémát jelent a minták komplexitása, hiszen egy-egy szövettípus akár több ezer különböző fehérjét is tartalmazhat. Ezért is okoz nehézséget, hogy megtaláljuk azokat a fehérjéket, melyek ténylegesen reagálnak az általunk elvégzett kezelésre (Molloy, 2000). A minták előkészítése során ezt az összetettséget elő-frakcionálással csökkenthetjük, ezáltal növekedhet a kimutatható fehérjék száma. Számos frakcionálási módszer közül választhatunk, melyek alapjául a fehérje molekulák különböző fizikai és kémiai tulajdonságai szolgálnak, mint például a fehérjék oldhatósága, sejten belüli elhelyezkedése, mérete, töltése, izoelektromos pontja (Matt et al., 2008).

Az izoelektromos pont (pI) az a pH érték, amelynél a pozitív és a negatív töltések kiegyenlítik egymást, azaz az aminosav neutrális viselkedést mutat elektromos térben. Az izoelektromos pont alapján történő elválasztás a kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis első dimenzióját képezi, ez az izoelektromos fókuszálás. Az izoelektromos fókuszálás során a fehérjéket egy már előre kialakított pH gradiensű vékony poli-

akrilamid gélben (strip) választjuk el az izoelektromos pontjuknak megfelelően (Rabilloud et al., 2010). Lehetőségünk van azonban folyadék közegben is elvégezni ezt az izoelektromos fókuszálást pl. az ún. MicroRotofor (BioRad) készülék segítségével. A folyadék közegben történő elválasztás eredményeként létrejövő frakciók könnyen begyűjthetők, csoportosíthatók és akár újra frakcionálhatók más módszerek segítségével. Különösen alkalmas a nem-oldható fehérjék vizsgálatára, illetve minden más olyan fehérje esetén, melyek nehezen választhatók el a gél alapú izoelektromos fókuszálással (Hey et al., 2008).

Munkánk során célul tűztük ki, hogy tojássárgája és –fehérje minták folyadék közegben történő izoelektromos pont szerint frakcionálását elvégezzük és a folyamatot optimalizáljuk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mintagyűjtés

Friss tojást gyűjtöttünk ketreces tartástechnológiában tartott tyúkoktól. A tojásfehérjét és sárgáját elválasztottuk egymástól, majd a tojásfehérjét mágneses keverővel homogenizáltuk, hogy csökkentjük a viszkozitását (Qiu et al., 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 30 µl-t homogenizáltunk 500 µl líziszpufferben, melynek összetétele: 2 M thiourea, 8,5 M urea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte. Egy órát jégen inkubáltuk a mintákat gyakori vortexelés mellett, ezt követően 15 000 G-n 45 percig centrifugáltuk. A felülúszót használtuk a későbbi vizsgálatokhoz, melynek fehérje koncentrációját Bradford módszer segítségével határoztuk meg.

A MicroRotofor készülékkel elválasztani kívánt fehérje mennyisége 2–7 mg között változott. Az elektroforézishez szükséges ion cserélő membránokat felhasználás előtt legalább egy éjszakán át egyensúlyoztuk, az anód membránt 0,1 M H₃PO₄ oldatban, míg a katód membránt 0,1 M NaOH oldatban.

Különböző mintapuffereket teszteltünk, melyek mind befolyásolják az elektroforézis sikerességét. Ezek a következők voltak: nagy tisztaságú proteáz mentes víz, rehidratáló puffer 1 (7 M urea, 2 M thiourea, 2 m/v% CHAPS, glicerol 10 v/v%), rehidratáló puffer 2 (7 M urea, 2 M thiourea, 4 m/v% CHAPS, glicerol 10 v/v%, 1 m/v% DTT). Változtattuk az ampholyte koncentrációt is, mely szerepe az általunk kiválasztott pH tartomány létrehozása (esetünkben pH 3–10), az ampholyte koncentrációt 0,5–2,5 v/v%-os tartományon belül teszteltük. Az elektroforézist minden esetben 20 °C-on végeztük. Kétféle beállítást teszteltünk az elektroforézis kondícióival kapcsolatban. Egyik esetben konstans 1 W teljesítményt alkalmaztunk maximum 500 V feszültség mellett, másik esetben egy többlépéses beállítást használtunk: 150 V–10 min, 200 V–10 min, 300 V–60 min. Az elektroforézist követően 10 frakciót különítettünk el a pH 3–10-es tartományon belül, az egymás melletti frakciókat csoportosítottuk, így végső soron 5 különböző fehérje frakció került kialakításra, melyek további szeparálását egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük el.

Egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Az egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézist megelőzően a mintákat SDS tartalmú pufferben (10% SDS, 10 mM DTT, 20% glicerol, 0,2 M pH 6,8 Tris HCl, 8 M urea) forraltuk 5 percig. 30 µg fehérjét vittünk fel az előre gyártott 4–12%-os gradiens gélekre (Lonza), majd 170 V feszültséggel futtattuk, míg a jelző festék el nem érte a gél alját. A futtató puffer 1X Tris-Glycin-SDS oldat volt. A poliakrilamid géleken lévő fehérjesávok láthatóvá tételére Colloidal Coomassie G-250 festéket használtunk (Dyballa és Metzger, 2009).

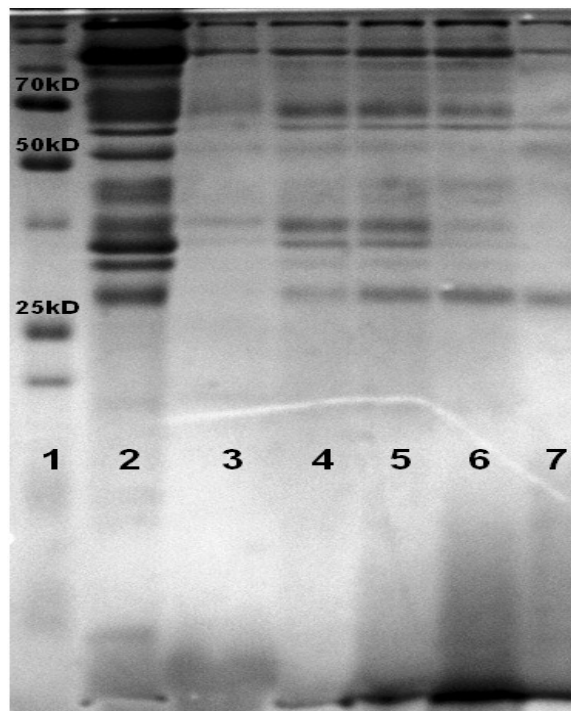
EREDMÉNYEK

A MicroRotofor készülékkel végzett pH szerinti frakcionálás során mind a tojásfehérje mind tojássárgája minták esetén teszteltük az elválasztás hatékonyságát. Optimalizáltuk a készülékre felvitt fehérje mennyiséget és ampholyte koncentrációt, teszteltük melyik az alkalmasabb minta-puffer és az elektroforézis során milyen feszültség beállításokat használjunk.

pH 3–10 tartományban összesen 10 folyadék frakciót választottunk el, az egymás melletti frakciókat csoportosítottuk, így végső soron 5 különböző fehérje frakció került kialakításra. Egydimenziós SDS poliakrilamid géleken molekulásúly szerint tovább szeparáltuk ezeket a frakciókat

Tojássárgája minták esetén kiválasztottuk a frakcionálás szempontjából optimális beállításokat: fehérje mennyiség 3 mg; ampholyte koncentráció 2 v/v%; minta puffer összetétele: 7 M urea, 2 M thiourea, 2 m/v% CHAPS, glicerol 10 v/v%; elektroforézis kondíciói: 150 V–10 min, 200 V–10 min, 300 V–60 min. Az ezekkel a beállításokkal végzett frakcionálást követő SDS gélelektroforézis során készített gélkép az 1. ábrán látható. Az eredmény értelmezése céljából az 1. ábrán látható gélképet összevethetjük a tojássárgája kétdimenziós poliakrilamid gélképével (2. ábra), ahol a teljes tojássárgája proteom látható izoelektromos pont és molekula tömeg szerint elválasztva. Teljes párhuzam nem vonható a két gélkép között (az izoelektromos pont szerinti frakcionálás különbözősége miatt), de hasonlóságok megfigyelhetők. Az erősen savas és bázikus tartományban láthatjuk a legkevesebb fehérjét mindkét gélképen. A fehérjék nagy többsége a pH 5–8-as tartományban helyezkedik el.

1. ábra: Izoelektromos pont alapján frakcionált tojássárgája proteom SDS-poliakrilamid gélképe



Megjegyzés: 1. fehérje standard; 2. teljes tojássárgája proteom; 3. pH 2,5–4-es frakció; 4. pH 4–6-os frakció; 5. pH 6–7,5-ös frakció; 6. pH 7,5–8,5-ös frakció; 7. pH 8,5–10,2-es frakció.

Figure 1: SDS-PAGE of egg yolk fractionated by isoelectric point

Note: 1. protein standard; 2. total egg yolk proteom; 3. fraction pH 2.5–4; 4. fraction pH 4–6; 5. fraction pH 6–7.5; 6. fraction pH 7.5–8.5; 7. fraction pH 8.5–10.2

2. ábra: Tojássárgája kétdimenziós poliakrilamid gélképe

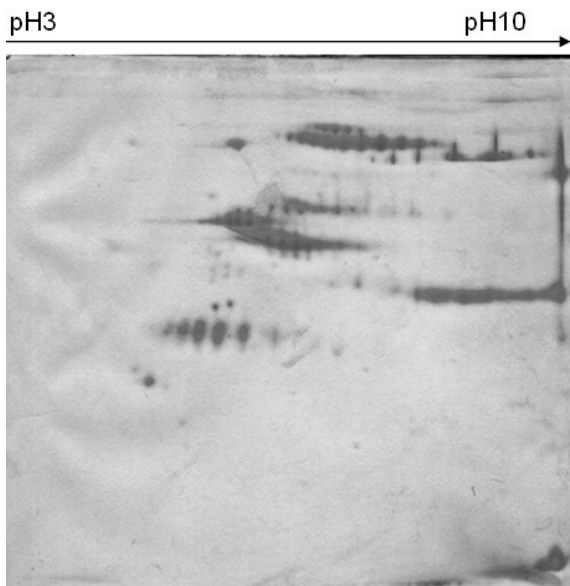


Figure 2: Two-dimensional gelelectrophoresis of egg yolk

Tojásfehérje minták esetén nem sikerült megtalálni az optimális frakcionálási beállításokat. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a tojásfehérje proteomjának 70%-át három nagy gyakoriságú fehérje teszi ki (ovotransferrin pH 6,69; ovalbumin pH 5,19; ovomucoid pH 4,82). Ezek a fehérjék nagy mennyiségükből kifolyóan, a frakcionálás ideje alatt teljes mennyiségükben nem tudnak a saját izoelektromos pontjukra vándorolni, így mindegyik pH frakcióban megjelennek. A 3. ábrán látjuk az egyes frakciók molekulásúly szerinti elválasztásának eredményét. Az ovalbumint csak a 2-es, míg az ovotransferrint csak a 3-as frakcióban kellene látnunk, ennek ellenére mindegyik frakcióban megjelennek. Ha kétdimenziós gélképen (4. ábra) vizsgáljuk ezeket a fehérjéket, akkor azon is megfigyelhető, hogy az ovalbumin és az ovotransferrin nem csak a saját izoelektromos pontján jelenik meg, hanem egy-egy vízszintes csíkként más pH tartományban is megfigyelhető.

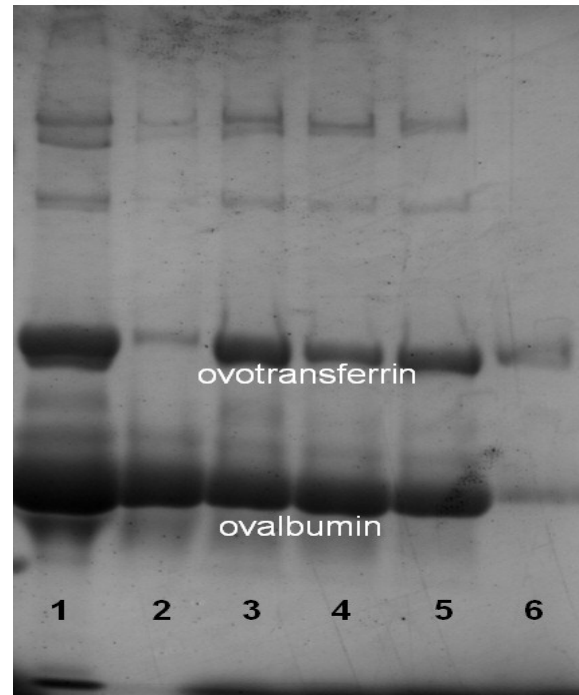
KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálatunk során azt a célt tűztük ki, hogy tojássárgája és -fehérje minták folyadék közegben történő izoelektromos pont szerinti frakcionálását elvégezzük és a folyamatot optimalizáljuk. A frakcionálási módszerekkel a fehérje minták komplexitása csökkenthető, így megnövelhető a marker fehérjék kimutatásának valószínűsége.

Megállapítottuk, hogy tojássárgája minták esetén a folyadék közegben történő izoelektromos pont szerinti frakcionálás jó hatékonysággal alkalmazható. További optimalizálással valószínűleg még tovább növelhető a frakcionálás eredményessége, Ezzel ellentétben a tojásfehérje mintáknál nem volt sikeres az optimalizálás. Ennek valószínűleg az a három nagy gyakoriságú fehérje az oka, melyek a tojásfehérje fehérje állományának több mint 70%-át alkotják és nagy mennyiségük-

ből kifolyóan nem csak a saját izoelektromos pontjukon jelennek meg.

3. ábra: Izoelektromos pont alapján frakcionált tojásfehérje proteom SDS-poliakrilamid gélképe



Megjegyzés: 1. teljes tojásfehérje proteom; 2. pH 2,5–4-es frakció; 3. pH 4–6-os frakció; 4. pH 6–7,5-ös frakció; 5. pH 7,5–8,5-ös frakció; 6. pH 8,5–10,2-es frakció

Figure 3: SDS-PAGE of egg white fractionated by isoelectric point

Note: 1. protein standard; 2. total egg white proteom; 3. fraction pH 2.5–4; 4. fraction pH 4–6; 5. fraction pH 6–7.5; 6. fraction pH 7.5–8.5; 7. fraction pH 8.5–10.2

4. ábra: Tojásfehérje kétdimenziós poliakrilamid gélképe

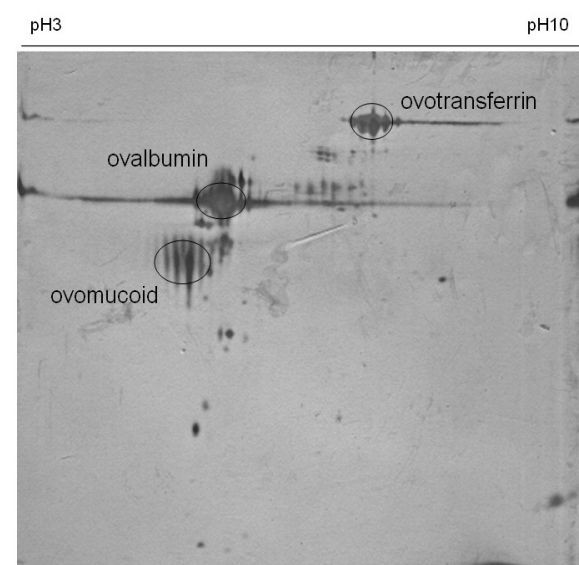


Figure 4: Two-dimensional gelelectrophoresis of egg white

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.

IRODALOM

- Bendixen, E.–Danielsen, M.–Hollung, K.–Gianazza, E.–Miller, I. (2011): Farm animal proteomics – A review. *Journal of Proteomics*. 74: 282–293.
- 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.
- Dyballa, N.–Metzger, S. (2009): Fast and sensitive Colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrilamide gels. *Journal of Visualised Experiments*. 30: 1431.
- Hey, J.–Posch, A.–Cohen, A.–Liu, N.–Harbers, A. (2008): Fractionation of complex protein mixtures by liquid – phase isoelectric focusing. 2D PAGE: Sample preparation and fractionation. 1: 225–240.
- Molloy, M. P. (2000): Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Analytical Biochemistry*. 280: 1–10.
- Matt, P.–Fu, Z.–Fu, Q.–Van Eyk, J. E (2008): Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. *Physiol Genomics*. 33: 12–17.
- Rabilloud, T.–Chevallet, M.–Luche, S.–Lelong, C. (2010): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics*. 73: 2064–2077.