

Csirkemáj proteomjának változása szelén indukció hatására – 2D PAGE optimalizálás

Gulyás Gabriella – Czeglédi Levente – Prokisch József – Jávör András

Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma,
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar
Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen
gulyas@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen tanulmányban célul tűztük ki, egy olyan kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D PAGE) metodika kidolgozását, mely segítségével a legtöbb egyedi fehérjét tudjuk azonosítani a házityúk máj proteomjában, valamint arra is kerestük a választ, hogy milyen változások történnek a csirkemáj fehérje expressziójában szelén indukció hatására. A proteomikai vizsgálatba 12 broiler csirkét vontunk be. A kontroll csoportban (6 egyed) a takarmányban lévő szelén koncentrációja 0,2 mg/kg, a kísérleti csoportnál (6 egyed) a takarmány Selenkoncentrációja 4,25 mg/kg volt. Számos tesztelő futtatást követően optimalizáltunk egy olyan 2D PAGE metodikát, mely alkalmas nagyszámú egyedi fehérje elkülönítésére. A szelén kiegészítésben részesült állatok májmintáiban átlagosan 747 fehérjepontot tudunk egymástól elkülöníteni a géleken, a kontroll csoportban 741-et. Hat olyan fehérjét találtunk, melyek csak a kísérleti csoport egyedeinél expresszálódtak. A továbbiakban tömegspektrometriával azonosítjuk ezeket a fehérjéket és összefüggéseket keresünk a szelén élettani hatásai és e fehérjék expressziója között.

Kulcsszavak: csirkemáj, proteomika, szelén, 2D-PAGE

SUMMARY

The aims of the present study were to optimize a two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis method to chicken liver proteome and to determine the changes of protein expression caused by selenium. Twelve broiler chicken were used in this experiment. The selenium intake was 0,2 mg/kg in the control group (6 chicken) and 4,25 mg/kg in the experimental group (6 chicken). Using the optimized proteomic approach, we have successfully separated 747 proteins in the experimental group and 741 proteins in the control group. We found six proteins, which expressed only in the samples of experimental group. Further investigations need to determine these six proteins with mass spectrometry (MS) and look for the correlation between the physiological effects of selenium and the expression of these proteins.

Keywords: chicken liver, proteomics, selenium, 2D-PAGE

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A szelén esszenciális szerepet játszik a biológiai folyamatokban. Elsődleges feladata a szabadgyökök semlegesítése, tehát az antioxidáns funkció, emellett részt vesz a szervezet védekezőképességének növelésében, a sejthárta stabilizálásában (Navarro-Alarcon és Cabrera-Vique, 2008). Az antioxidáns enzimek közül több is szelén-dependens, például a glutation peroxidáz (5 féle izoformája létezik), mely védi a sejteket és a membránokat az oxidatív stressztől, a hidropoxidáz redukálásával (Watanabe et al., 1997). Az ún. szelenoproteinek specifikusan szelént építenek be, ezek metabolikus funkciója még nem tisztázott (Wang és Xu, 2007).

Élettani hatása ambivalens, ugyanis hiányában betegségek alakulnak ki, túladagolása azonban mérgezéshez vezet (Gergely, 2006). Takarmányozási kísérletek során megállapították, mennyi az ajánlott és a maximum szelén koncentráció a takarmányban csirkék esetén. Az ajánlott érték 0,15 mg Se/kg (NRC, 1994), maximum érték 0,3 mg Se/kg az USA-ban (Payne et al., 2005), míg az Európai Unióban 0,5 mg Se/kg (Zoidis et al., 2010). Embereknél 40µg/nap a minimum érték, 55µg/nap az ajánlott és a 400µg/nap a még tolerálható maximum érték. Napi 300µg szelén bevitel mellett érik el a szelén-dependens enzimek a maximum expressziós szintjüket és ez az a mennyiség mely csökkenti a rák kialakulásának kockázatát (Thomson, 2004). Magyarországon különösen fontos lenne az élelmiszerek szelénszintjének emelése, hiszen talajaink és ezért élelmiszereink is szelénhiányosak. Egy szelénben gazdag étrend 30–50%-kal csökkentheti a daganatos megbetegedések előfordulását (Clark et al., 1996).

Mivel a szelén a szövetekben fehérjékkel lép kapcsolatba (Burk és Hill, 1993), ezért a proteomikai vizsgálatok megfelelőek arra, hogy nyomon követhessük a szelén hatására bekövetkező expressziós változásokat. A proteomikai kutatások az állattenyésztési tudományok területén igen kis részarányt képviselnek, ellentétben a humán kutatásokkal (Lippolis és Reinhardt, 2008). A gél alapú proteomikai vizsgálat nagyon érzékeny metodika, számos faktort változtathatunk a mintatisztítás, az első dimenzió és a második dimenzió során is, melyek mind befolyásolják az elválasztás eredményességét.

Jelen tanulmányban célul tűztük ki, egy olyan két-dimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D PAGE) metodika kidolgozását, mely segítségével a legtöbb egyedi fehérjét tudjuk azonosítani a házityúk máj proteomjában, valamint hogy megállapítsuk, milyen változások történnek a csirkemáj fehérje összetételében szelén indukció hatására.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Állatok és kezelés

A kísérletet 12 Cobb 500 broiler csirkével állítottuk be. Két vizsgálati csoportot hoztunk létre, az egyik a kontroll (6 egyed), melynek takarmánykeverékében 0,2 mg/kg Se volt. A másik a kísérleti csoport (6 egyed), ahol a takarmány Se-koncentrációja 4,25 mg/kg volt. A takarmányozás 7 héten át tartott. A szelén kiegészítés LactoMicroSel adalék hozzáadásával történt, mely baktériumokban termeltetett elemi szelént tartalmaz. A kísérleti csoport takarmánykeverékében lévő szelén mennyisége, többszöröse az Európai Unióban megengedett maximum értéknek (0,5 mg/kg), erre azért volt szükség, hogy a szelén hatására a fehérjék expressziójában esetlegesen bekövetkező változások kimutathatóságának valószínűségét növeljük.

Mintagyűjtés

A mintagyűjtés 7 hét takarmányozást követően az állatok vágásakor történt. Közvetlenül az állat kivézetése után orvosi szikével 0,5 g máj mintát gyűjtöttünk 3 ismétlésben cryocsővekbe, melyeket azonnal folyékony nitrogénbe helyeztünk, a további tárolás -80 °C-on történt. Az egyedileg tárolt mintát több pontmintából alkottuk, a mintákat a szövet felszíne alatti 1 cm-es mélységből vettük.

Mintatisztítás

A -80 °C-on tárolt mintából 500 mg-ot kimértünk, dörzsoszárban folyékony nitrogénnel porrá törtük. A fehérjék oldatba vitelére két módszert teszteltünk:

1. A homogenizált mintából 100 mg-ot kimértünk, hozzáadtunk 80 µl-t a 25×-ös protease inhibitor cocktail-ból, majd 1 ml lízis puffert (két különböző összetételű lízis puffert is teszteltünk: 1. 2M thiourea, 8M urea, 2% CHAPS, 50mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, a pH 5–8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholyte-ot használtunk 1:2 arányban mindkét lízis puffer esetében 2. 8,5M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 60mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte). Egy órát szobahőmérsékleten inkubáltuk, ezt követően 15 000 g⁻¹ 45 percig centrifugáltuk. Bradford reagens segítségével lemértük a koncentrációját.

2. A homogenizált mintából 100 mg-ot kimértünk, hozzáadtunk 80 µl-t a 25×-ös protease inhibitor cocktail-ból, majd 1 ml lízis puffert (2M thiourea, 8M urea, 2% CHAPS, 50mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, a pH 5–8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholyte-ot használtunk 1:2 arányban). Egy órát szobahőmérsékleten inkubáltuk, ezt követően 15 000 g⁻¹ 45 percig centrifugáltuk. A felülúszót ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (BioRad) segítségével tisztítottuk tovább. A kit eltávolítja a mintákból a detergenset, sókat, nukleinsavakat és lipideket, melyek zavarhatják az izoelektromos fókuszálást. A tisztított minták koncentrációját Bradford módszerrel mértük. A fehérje koncentrációkat felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D PAGE)

A mintákból 150, 200 ill. 300 µg-ot vittünk fel a 17cm-es pH 3–10-es és pH 5–8-as IPG stripekre. Két különböző rehidratáló oldatot teszteltünk:

1. normál rehidratáló oldat: 2M thiourea, 8M urea, 2% CHAPS, 50mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, 0,002% Bromphenol Blue, a pH 5–8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholyte-ot használtunk 1:2 arányban;
2. deStreak rehidratáló oldat: 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 ampholyte-ot használtunk 1:2 arányban.

Az első dimenzióknál kipróbáltuk az egy lépésben történő fókuszálást és a többlépéses is. Egy lépésben: 10 000 V–50 000 Vh Rapid Ramp. Több lépésben: 1. lépés -250 V 20min Linear Ramp 2. lépés -10 000 V 2,5 h Linear Ramp 3. lépés -10 000 V 40 000 V-h Rapid Ramp, 20 °C-on 50 µA/strip, összesen kb. 50 000 Vh. 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, 0,05M Tris/HCl pH 8,8, 20% glycerol, 2,5% iodoacetamide).

Második dimenzióban a gélek futtatása a BioRad Protean Plus Dodeca cell rendszerben történt, így egyszerre 12 gélt tudunk kezelni, ezzel próbáltuk elkerülni a nem egy időben történő futtatásokból eredő eltéréseket a gélen. A poliakrilamid gélek 12%-os koncentrációjúak voltak. A futtató puffer 1X Tris-Glycin-SDS oldat.

A poliakrilamid géleken lévő fehérje foltok láthatóvá tételére kétféle eljárást használtunk, az egyik egy ezüsfestés (Shevchenko et al., 1996), a másik pedig egy fluoreszcens jelölés (Sypro Ruby). Mindkét festék érzékenysége 1ng. Az ezüsfestés lépései: 1. fixálás: 50% metanol, 5% ecetsav 2. mosás: 50% metanol 3. érzékenyítés: 1,27 mM sodium thiosulfate pentahydrate 5. festés: 0,15% ezüst nitrát 7. előhívás: 0,04% formaldehid, 2% nátrium karbonát 8. leállítás: 5% ecetsav. A Sypro Ruby festés lépései: a géleket először egy prefixáló oldatba helyeztük, melynek összetétele: 50% metanol, 10% ecetsav. Ezt követte maga a festő oldat:

Sypro Ruby Protein Gel Stain (Lonza). Végül a postfixáló oldatba kerültek: 10% metanol, 7% ecetsav. A gélek elemzését a PDQuest (BioRad) software segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK

Számos tesztelő futtatást követően optimalizáltunk egy olyan 2 D PAGE metodikát csirkemáj mintákra, mely alkalmas nagyszámú egyedi fehérje elkülönítésére. A megfelelő lízis puffer összetétele: 8,5M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 60mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte. A tisztításnál a Cleanup Kitre nincs szükség, mert fehérjevesztést okoz. A pH 3–10-es IPG stripekre 150 µg fehérjét vittünk fel, ez az a mennyiség az, ahol a pontok nem folynak össze, de még jól láthatóak. Az 1. ábrán egy olyan gélképet mutatunk be, melynél a felvitt fehérje mennyisége 300 µg, a pH 5–10-es, 70–240 kDa-os tartományban, ahol a legtöbb fehérjét váránk, nem tudunk megkülönböztetni egyedi pontokat, mert a nagy anyagmennyiség miatt összemosódnak.

1. ábra: Túl nagy fehérjemennyiség a gélen

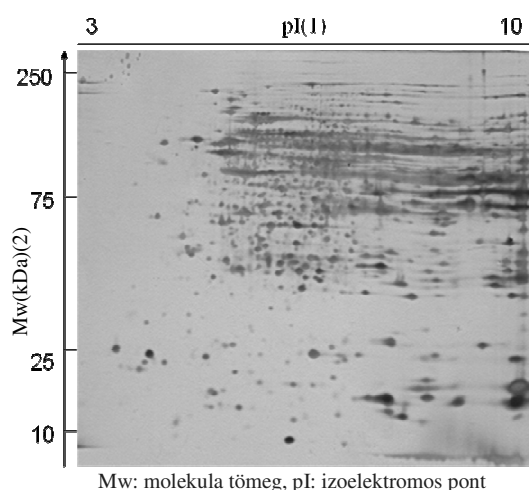


Figure 1: High sample load
Isoelectric point(1), Molecular weight(2)

A DeStreak reagenst tartalmazó rehidratáló oldat csökkentette a gélek bázikus régiójában látható vízszintes csíkozottságot, ezért ezt az oldatot használtuk a gélek rehidratálására: 2M thiourea, 8M urea, 2% CHAPS, 15mg/ml DeStreak reagens, 0,2% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, 0,002% Bromphenol Blue. Az izoelektromos fókuszálásnál a több lépéses módszernél jobb eredményeket értünk el, mint az egylépésesnél. A 2. ábra az egylépéses fókuszálás hibáját mutatja. Az egész gélen vízszintes csíkozottság látható, melyet valószínűleg a kezdeti nagy feszültség okoz.

2. ábra: Egy lépéses izoelektromos fókuszálás

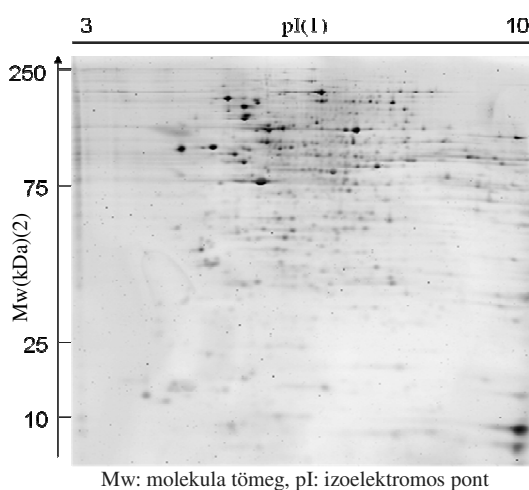


Figure 2: One step isoelectric focusing
Isoelectric point(1), Molecular weight(2)

A gélek festésére teszteléskor ezüst-nitrátot használtunk. Nagy mintaszám esetén azonban ez a festési mód nem a legmegfelelőbb, mivel az ismételhetősége nem tökéletes. Ezért nagyszámú gél egyidejű festésére Sypro Ruby Protein Stain (Lonza) festéket használtunk, melynek érzékenysége az ezüst-nitrát festékével megegyező (1ng). Az 3. ábrán láthatjuk azt a gélképet, melyet e kondíciók használatával készítettünk.

3. ábra: Csirkemáj proteomjának gélképe

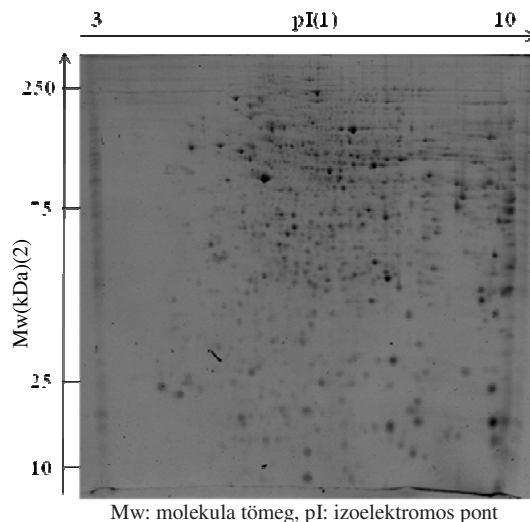


Figure 3: Chicken liver proteome
Isoelectric point(1), Molecular weight(2)

A szelén kiegészítésben részesült állatok májmintáiban átlagosan 747 fehérjepontot tudtunk egymástól elkülöníteni a géleken, a kontroll csoportban 741-et. Hat olyan fehérjét találtunk, melyek csak a kísérleti csoport egyedeinek gélképein detektálhatók (4. ábra), ebből három a semleges kémhatású régióban található, kettő az enyhén bázikus, egy pedig az erősen bázikus tartományban.

4. ábra: A kontroll és a kísérleti csoport fehérje expressziójában mutatkozó különbségek

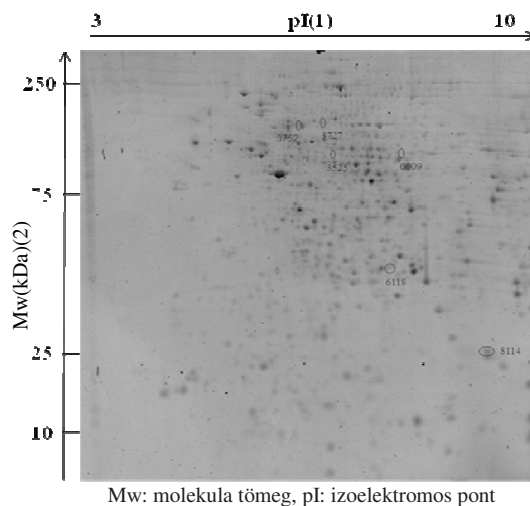


Figure 4: The differences between liver proteome of control and experimental group
Isoelectric point(1), Molecular weight(2)

KÖVETKEZTETÉSEK

A továbbiakban tömegspektrometriával azonosítjuk ezeket a fehérjéket és összefüggéseket keresünk a szelén élettani hatásai és e fehérjék expressziója között. Többféle fehérje adatbázis létezik, melyekkel összevethetjük a tömegspektrometriás adatainkat, pl.: Uniprot, SWISS-2D-PAGE, World-2DPAGE, PIR. A hat fehérje azonosítása,

abból a szempontból lesz nehézkes, hogy mindegyik csak kis mértékben expresszáldott, nehéz feladat ezeket a kis pontokat kivágni a gélből. A pontok méretét növelhetjük, ha nagyobb mennyiségű fehérjét viszünk fel az első dimenzióban az IPG stripekre, ez azonban együtt járhat azzal, hogy a fehérjepontok összeolvadnak, és így nem tudjuk újra detektálni ezt a hat fehérjét.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

IRODALOM

- Burk, R. F.–Hill, K. E. (1993): Regulation of selenoproteins. *Annual. Review Nutrition.* 13: 65–81.
- Clark, L. C.–Combs, G. F.–Turnbull, B. W.–Slate, E. H.–Chalker, D. K.–Chow, J.–Davis, L. S.–Glover, R. A.–Graham, G. F.–Gross, E. G.–Krongrad, A.–Leshner, J. L.–Park, K.–Sanders, B. B.–Smith, C. L.–Taylor, R. (1996): Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. *Journal of the American Medical Association.* 276: 1957–1985.
- Gergely V. (2006): Fehérje-elválasztási módszerek bevezetése a szelén módosulat-analitikába. Budapesti Corvinus Egyetem. Alkalmazott Kémia Tanszék. Doktori értekezés.
- Lippolis, J. D.–Reinhardt, T. A. (2008): Centennial Paper: Proteomics in animal science. *Journal of Animal Science.* 86: 2430–2441.
- National Research Council (1994): *Nutrient Requirements of Poultry*, 9th rev. ed. National Academy Press. Washington. DC.
- Navarro-Alarcon, M.–Cabrera-Vique, C. (2008): Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment.* 400: 115–141.
- Payne, R. L.–Laverigne, T. K.–Southern, L. L. (2005): Effect of inorganic versus organic selenium on hen production and egg selenium concentration. *Poultry Science.* 84: 232–237.
- Shevchenko, A.–Wilm, M.–Vorm, O.–Mann, M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry.* 68. 5: 850–858
- Thomson, C D. (2004): Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *European Journal of Clinical Nutrition.* 58: 391–402.
- Wang, Y-B.–Xu, B-H. (2007): Effect of different selenium source (sodium selenite and selenium yeast) on broiler chickens. *Animal Feed Science Technology.* 144: 306–314.
- Watanabe, T.–Kiron, V.–Sato, S. (1997): Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture.* 151: 185–207.
- Zoidis, E.–Pappas, A. C.–Georgiou, C. A.–Komaitis, E.–Feggeros, K. (2010): Selenium affects the expression of GPx4 and catalase in the liver of chicken. *Comparative. Biochemistry and Physiology. Part B. Biochemistry and Molecular Biology.* 155. 3: 294–300.