

VYUŽITÍ KOMERČNÍ METODY IMUNOCHEMICKÉHO ODSTRANĚNÍ RUBISCO V ANALÝZE ROSTLINNÉHO PROTEOMU

MARTIN ČERNÝ, JAN SKALÁK, BARBORA
KURKOVÁ, ELENA BABULIAKOVÁ
a BŘETISLAV BRZOBOHATÝ

Laboratoř molekulární biologie rostlin, MENDELU &
BFÚ AV ČR, Zemědělská 1, 613 00 Brno
martincerny83@gmail.com

Došlo 16.2.11, přijato 15.6.11.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby
urychleného publikování.

Klíčová slova: rostlinná proteomika; Rubisco; 2D elektro-
foréza; obohacování proteomu

Úvod

Narůstající počet organismů se známou sekvencí celého genomu se pozitivně projevuje i v rostlinných vědách. Kromě rostlin zajímavých spíše z vědeckého hlediska, jako je huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), máme dnes k dispozici například anotované sekvence genomu rýže, kukuřice, ale i révy, jabloně či jahody. Bohužel samotná znalost genů a jejich uspořádání není pro pochopení všech aspektů živého organismu dostatečná. Ani sledování hladin transkriptů není zcela bez nedostatků. Některé odhady dokonce uvádějí, že množství proteinů v buňce je pouze z 20–40 % určeno množstvím odpovídající mRNA¹. Nejedná se pouze o případy, jako jsou suchá semena, kdy lze očekávat, že celkový obraz proteinů je na hladinách mRNA nezávislý, ale výrazné rozdíly jsou způsobeny i odlišnými rychlostmi syntézy a degradace proteinů. Navíc samotná přítomnost proteinů ještě neznamená, že jsou ve své funkční formě. Mnoho proteinů může být efektivně regulováno pomocí post-translačních modifikací, jako je např. fosforylace. Taková modifikace může aktivovat nebo inhibovat až inaktivovat enzymy, aniž by bylo potřeba je nově syntetizovat, či degradovat². Skutečné hladiny proteinů a jejich post-translační modifikace mají klíčový význam i v přenosu signálu a okamžité odpovědi, která nemůže být brzděna čekáním na efekt nových transkriptů, ale naopak přepis nové mRNA moduluje. Je tedy patrné, že proteomické studie jsou logickým pokračováním genomických analýz. Hlavním nedostatkem proteomiky je pokrytí sledovaného proteomu. Doposud zřejmě nejobsáhlejší proteomická analýza modelové rostliny huseníčku nalezla 13 029 různých proteinů, což pro představu množstvím zhruba odpovídá polovině množství známých genů této

rostliny³. Běžné proteomické práce s limitovaným množstvím materiálu se však pohybují mnohem níže a nepostihnou většinou více jak 1000–1500 různých proteinů.

Jedním z faktorů snižujícím možnosti analýzy proteomu je přítomnost vysokoabundantních proteinů. Zatímco v živočišných buňkách je na prvním místě kolagen, v rostlinách tuto „rolí“ plní hlavní fotosyntetický enzym ribulosabisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco, EC 4.1.1.39). Skládá se z 8 velkých a 8 malých podjednotek, jeho obsah může dosáhnout i 60 % veškerých proteinů v buňce a představuje také jeden z nejčastěji identifikovaných proteinů v analýzách proteomu pomocí 2D elektroforézy^{4,5}.

Experimentální část

Rostlinný materiál a extrakce proteinů

Pro experimenty byly použity týdenní semenáčky a listy růžice měsíc staré rostliny huseníčku (*Arabidopsis thaliana*, ekotyp Col-0), kultivované na standardním Murashige-Skoogovu (MS) mediu v režimu dlouhého dne (16 h den, intenzita světla $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 21 °C; 8 h noc, 19 °C). Vzorky byly rozdrčeny v tekutém dusíku (160 až 180 mg) a extrahovány pomocí 0,5 ml TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) s přidávkou inhibitorů proteas (Qiagen) a PVPP (Sigma-Aldrich). Nesolubilní část byla odstraněna centrifugací. Supernatant byl v množství přibližně 800 μg proteinů nanesen na kolonu Seppro IgY-Rubisco Spin Column (Sigma-Aldrich) a zpracován dle instrukcí výrobce. Vzorky po afinitním očištění o Rubisco byly slity, zakoncentrovány pomocí Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit a přečištěny běžnou aceton/TCA (kys. trichloroctová) extrakcí a solubilizovány (7 M močovina, 2 M thiomočovina, 2% (w/v) CHAPS, 90 mM dithiothreitol)⁶.

Elektroforéza a vyhodnocení obrazu

Kvalita afinitního oddělení Rubisco byla ověřena (i) elektroforetický běžnou SDS-PAGE (11% polyakrylamid, $U_{\text{konst}} = 150 \text{ V}$); a (ii) isoelektrickou fokusací (3-10NL IPG strip, 7 cm, Bio-Rad) a následnou SDS-PAGE (8–20% polyakrylamid)⁶. Gely byly obarveny koloidní Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad) a digitalizovány pomocí kalibrovaného denzitometru Bio-Rad GS-800 (700 dpi). Získané obrazy byly analyzovány softwarem Decodon Delta 2D (<http://www.decodon.com>). Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno v souladu se Skalák a spol.⁷.

Výsledky a diskuse

Odstranění Rubisco, či snížení jeho množství ve vzorku, lze dosáhnout různými způsoby. Velmi efektivní je metoda imunochemického odstranění, na které je založena

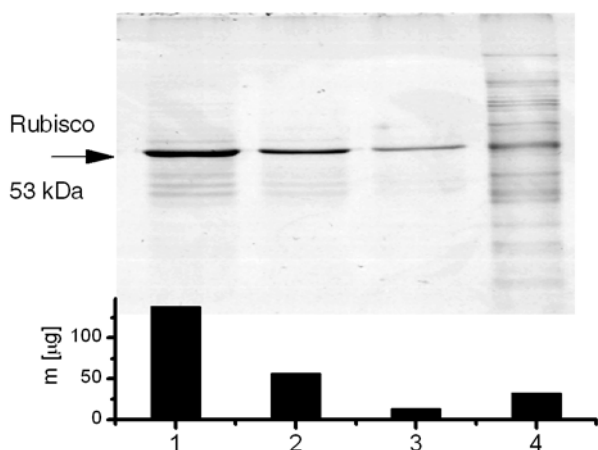
i Seppro IgY-Rubisco Spin Column. I když je tato metoda dostupná již několik let, její použití v proteomických analýzách bylo doposud vzácné a názory na její kvalitu nejsou jednotné⁸. Abychom mohli zhodnotit vhodnost použití této metody, aplikovali jsme na kolonu materiál s různým obsahem Rubisco a provedli 2D elektroforetické rozdělení vzorků a následnou analýzu obrazu.

Ověření metody

Účinnost separace jsme ověřili kvantitativně stanovením množství proteinů v zachycené frakci a kvalitativně elektroforeticky (obr. 1). Množství zachycených proteinů v jednotlivých experimentech se pohybovalo okolo 300 μg . Kvantifikace proužků na gelu ukázala, že zhruba 80 % zachycených proteinů patří velké podjednotce Rubisco, což zhruba odpovídá deklarované kapacitě kolony. Poslední eluční frakce (4) vykazuje množství proužků neodpovídajících molekulovou hmotností Rubisco. Lze očekávat, že i při dodržení doporučené maximální délky trvání eluce 20 min se na kolonu negativně projevuje vliv kyselého prostředí elučního pufru (100 mM glycin, pH 2,5) a zřejmě tak životnost kolony nepřekročí garantovaných 100 použití. Nicméně během 100 použití se eluční profil zachycené frakce výrazně neměnil, při dalších 10 cyklech jsme pouze přidali za každý třetí separovaný vzorek jeden čistící krok inkubace s elučním pufrům, protože nedocházelo ke kompletnímu vymytí navázaného Rubisco.

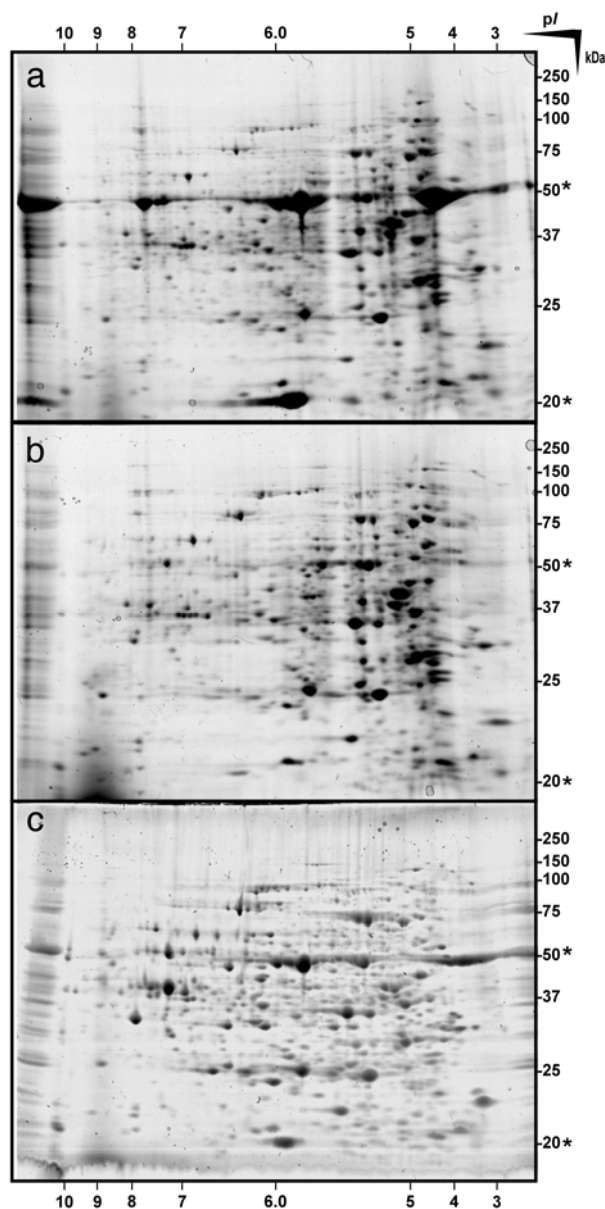
Porovnání 2D proteinových map vzorků s různým obsahem Rubisco

Aby byl výsledek 2D proteomické analýzy statisticky signifikantní, je běžně vyžadováno použití triplicátů v dvou opakováních. Metoda, která neposkytuje dostatečný materiál pro 3 paralelní gely, by tak příliš vítána neby-

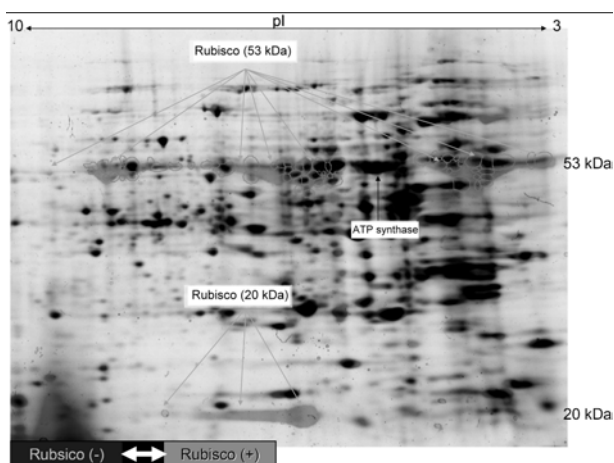


Obr. 1. Ukázka proteinového profilu čtyř následných elučních frakcí se zachyceným Rubisco. SDS-PAGE dokumentující postupnou eluci velké podjednotky Rubisco a její kvantifikace v celkovém objemu na základě kalibrace obrazu

la. Ve všech případech jsme proto nanесли na kolonu přibližně 800 μg proteinového extraktu, aby po imunochémickém odstranění Rubisco bylo množství vzorku sráženého aceton/TCA extrakcí minimálně 500 μg , což je i při drobných ztrátách během této extrakce dostatečné množství proteinů pro separaci na 3 malé gely barvené koloidní Coomassie G-250, či 3 velké gely barvené stříbrem. Proteom týdenních semenáčků huseníčku (obr. 2a) obsahoval přibližně 25 % Rubisco (vypočteno na základě objemu



Obr. 2. Obraz proteomu huseníčku s různým stupněm ochuzení Rubisco. Na gelu bylo rozděleno 150 μg proteinu ze semenáčků s původním obsahem Rubisco (a), semenáčků (b) a listů (c) po afinitním oddělení Rubisco; (*) molekulová hmotnost podjednotek Rubisco 53 kDa a 20 kDa



Obr. 3. Překryv 2D map z obr. 2 (a, b). Znárodnění efektu odstranění Rubisco na vzhled 2D mapy proteomu a zvýrazněné skvrny odkryté po depleci velké podjednotky Rubisco. Barevná verze obrázku je umístěna v suplementu (obr. S1)

proteinových skvrn podjednotek Rubisco) a použitím imunochemického odstranění (b) se podařilo množství Rubisco snížit pod detekční limit koloidní Bio-Safe Coomassie G-250 (8 ng). List z růžice měsíc staré rostliny huseníčku obsahoval přes 34 % Rubisco a jeho odstranění v tomto případě nebylo kompletní. Podíl Rubisco se však snížil na pouhých 9–10 % (c). Ve všech sledovaných experimentech snížení obsahu Rubisco vedlo k zvýšení počtu dobře rozdělených skvrn a to až o 25 %. Průměrný počet skvrn v 60 gelech (20 použití kolony) byl 750, což je obdobné množství, jaké je možné detekovat Bio-Safe Coomassie na velkých gelech (18 cm), kde je ale zapotřebí 3× větší množství proteinů⁹. Jen na samotné ploše překryté velkou podjednotkou Rubisco bylo v případě úplného odstranění možné nově rozlišit přes 60 proteinových skvrn (obr. 3 a jeho barevná verze obr. S1 na webových stránkách <http://www.chemicke-listy.cz>).

Závěr

Provedli jsme důkladné otestování komerčně dostupné metody pro imunochemické odstranění Rubisco. Během 20 použití kolony, což je 20 % garantované životnosti, jsme nepozorovali výraznější pokles její kapacity. Rostlinný materiál s obsahem Rubisco do 25 % byl po 20 min imunochemického odstraňování zcela zbaven Rubisco a v dostatečném množství pro aplikaci na 3 paralelní gely. Jediná srovnatelná metoda snížení obsahu Rubisco je pomocí frakcionace polyethylenglykolem (PEG)⁸, která však vyžaduje mnohem větší počáteční množství proteinů a je tak pro experimenty limitované množstvím materiálu nevhodná. Celkově považujeme testovanou metodu odstranění Rubisco za velmi slibnou a očekáváme její rychlé rozšíření na poli rostlinné proteomiky.

Tato práce vznikla za podpory grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky LC06034 a 1M06030.

Internetová verze této práce obsahuje navíc doplňující část. Pro vyhledání plné verze článku včetně příslušného suplementu je třeba otevřít aktuální webovou stránku Chemických Listů http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_640-642.pdf.

LITERATURA

1. Brockmann R., Beyer A., Heinisch J. J., Wilhelm T.: *PLoS Comput. Biol.* 3, e57 (2007).
2. Černý M., Doubnerová V., Müller K., Ryšlavá H.: *Biochimie* 92, 1362 (2010).
3. Baerenfaller K., Grossmann J., Grobei M. A., Hull R., Hirsch-Hoffmann M., Yalovsky S., Zimmermann P., Grossniklaus U., Gruissem W., Baginsky S.: *Science* 320, 938 (2008).
4. Ryšlavá H., Doubnerová V.: *Chem. Listy* 104, 1175 (2010).
5. Cellar N. A., Kuppannan K., Langhorst M. L., Ni W., Xu P., Young S. A.: *J. Chromatogr., B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 861, 29 (2008).
6. Černý M., Dyčka F., Bobál'ová J., Brzobohatý B.: *J. Exp. Bot.* 62, 921 (2011).
7. Skalák J., Černý M., Mitošinková I., Brzobohatý B.: *Chem. Listy* 104, s49 (2010).
8. Widjaja I., Naumann K., Roth U., Wolf N., Mackey D., Dangl J. L., Scheel D., Lee J.: *Proteomics* 9, 138 (2009).
9. Hradilová J., Řehulka P., Řehulková H., Vrbová M., Griga M., Brzobohatý B.: *Electrophoresis* 31, 421 (2010).

M. Černý, J. Skalák, B. Kurková, E. Babuliaková, and B. Brzobohatý (*Laboratory of Molecular Plant Biology, Mendel University in Brno and Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno*): **Using a Commercial Method for Rubisco Immunodepletion in Analysis of Plant Proteom**

Rubisco immunodepletion was tested using a Seppro IgY-Rubisco spin column in 2D-PAGE-based proteomic analysis. The column yield was analyzed in 20 consecutive runs and the depletion from tissues with higher and lower Rubisco contents was evaluated. An increase in the number of detected protein spots of up to 25 % was found. This procedure allows to follow the profiling of a similar number of protein spots in Rubisco-depleted proteom resolved on small gels as is usual with standard total protein extracts resolved on large gels. We found this procedure especially suitable for experiments with a limited amount of the starting material.

Doplněk k práci Využití komerční metody imunochemického odstranění Rubisco v analýze rostlinného proteomu

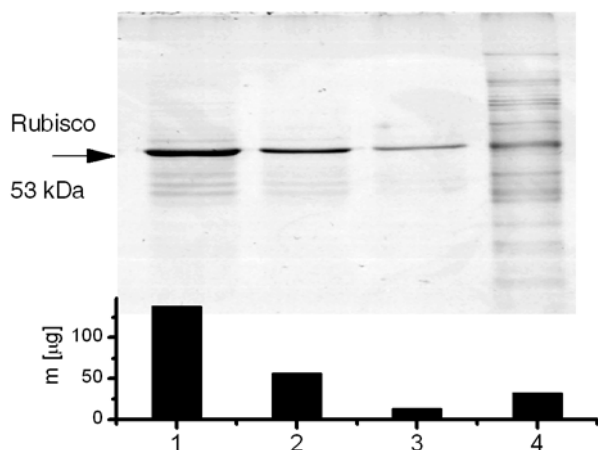


Fig. 1. Protein elution profiles of four subsequent fractions containing Rubisco. The qualitative analysis by SDS-PAGE and the quantitation of Rubisco large subunit

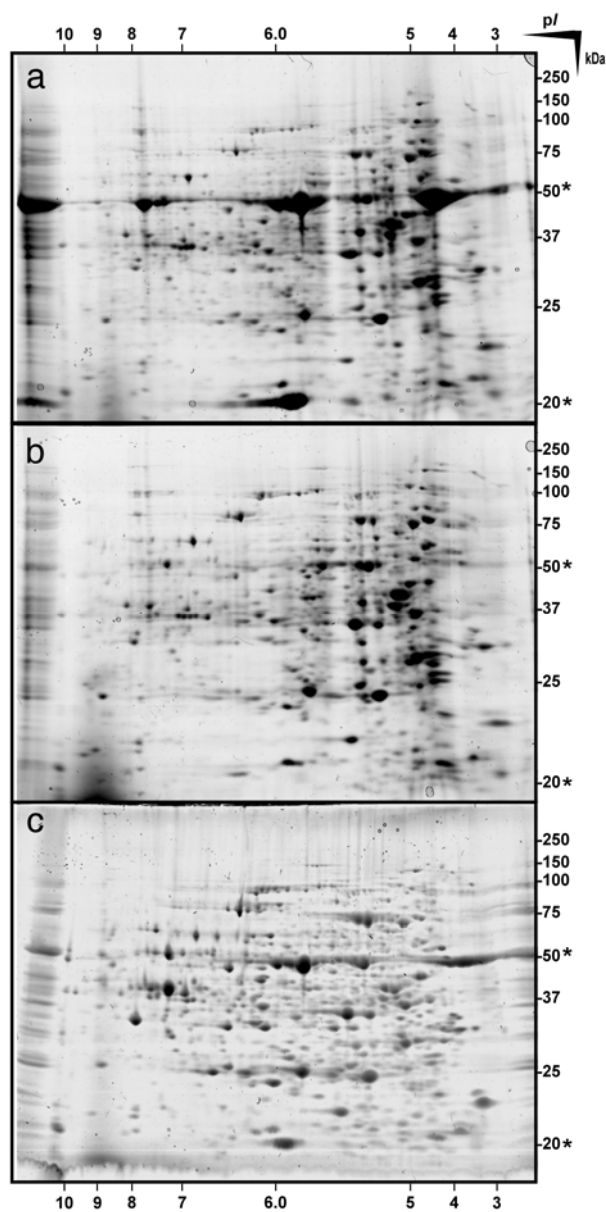


Fig. 2. Arabidopsis proteome map; Complete proteome (a) and Rubisco depleted proteome (b) in 7 days old seedlings, (c) partial Rubisco depletion in rosette leaf (30 days old plant), (*) molecular mass of Rubisco subunits 53 kDa and 20 kDa. Bio-Safe Coomassie stain, 150 µg of protein, 7 cm IPG strip

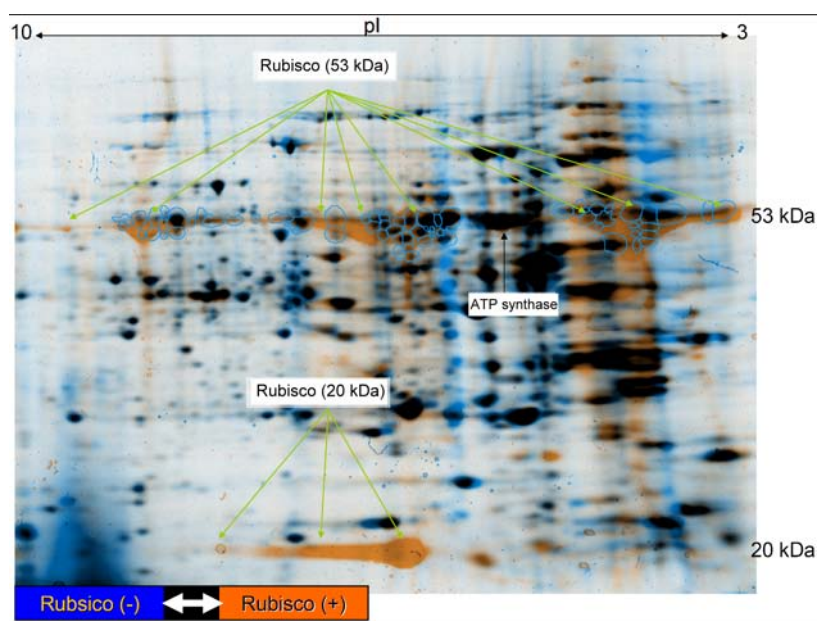


Fig. 3, Fig. S1: An overlay image between proteomes in Fig. 2 (a, b). Marked spots indicate Rubisco and newly found spots after Rubisco depletion