

Proteinový fingerprinting vaječného bílku

Proteinový fingerprinting je technika studia populací organizmů založená na izoelektrické fokuzaci (IEF). IEF spočívá v elektroforetickém dělení proteinů podle jejich izoelektrických bodů v polyakrylamidovém gelu s gradientem pH mezi elektrodami. V ornitologii je použitelná pro odhalení vnitrodruhového hnízdního parazitizmu, tedy jevu, kdy samice sice naklade většinu vajec do svého hnízda, ale několik dalších vajec i do hnízd samic stejného druhu v jejím okolí. Tato evoluční strategie se vyskytuje např. u zástupců řádu vrubozobí (Anseriformes). Vychází se z předpokladu, že složení vaječného bílku je geneticky dáno a mezi jednotlivými samicemi jsou v jeho složení rozdíly. Jeho studiem tak je možné zachytit pomocí vajec individualitu samic, které je nakladly, navíc jeho variabilitu neovlivňují geny otce. Bílek pro analýzu se odebírá navrtáním vajíčka injekční jehlou, odebráním několika až několika desítek mikrolitrů bílku (podle velikosti vejce) a zalepením otvoru. Pokud při odběru nedojde nešťastnou náhodou k poškození embrya, mládě se normálně vylíhne.

Úloha: Odhalení cizích vajec ve snůšce

Biologický materiál:

vaječný bílek ze slepičích vajec naředěný 1:20 deionizovanou vodou

Chemikálie a roztoky:

Příprava gelu:

Zásobní roztok 40% C3 IEF gelu:

97 g akrylamidu (max. 0,005 % kyseliny akrylové)

3 g N, N'-metylenbisakrylamidu

rozpustit ve 100 ml deionizované vody

doplnit deionizovanou vodou na 250 ml

Roztok molekulárního lepidla:

1 ml 0,5 % kyseliny octové v 96% ethanolu

3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Roztok 10% peroxidisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$:

1 g peroxidisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

rozpustit v 10 ml deionizované H_2O

uchovávat v mikrozkuvkách po 112 μ l (pro gel 24 x 22 x 0,025 cm) v -20°C

T5C3 IEF gel rozměru 24 x 22 x 0,25 cm:

1,75 ml zásobního roztoku 40% C3 IEF gelu

1,4 ml příslušného Servalytu

1,75 ml glycerolu

9,1 ml vody

dobře promíchat, aby se rozpustil všechny glycerol

112 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného

14 µl TEMEDu

dobře promíchat, ihned nasát do injekční stříkačky a ihned naplnit prostor mezi skly

Elektrodové pufr:

Katodový pufr:

0,22 g L-argininu

0,18 g L-lysinu

6 ml ethylendiaminu

rozpustit ve 40 ml deionizované vody, doplnit deionizovanou vodou na 50 ml

Anodový pufr:

0,17 g kyseliny L-asparagové

0,18 g kyseliny L-glutamové

rozpustit ve 40 ml deionizované vody, doplnit deionizovanou vodou na 50 ml

uchovávat zamražený!!!

Vizualizace IEF gelu:

Formaldehydový fixační roztok:

400 ml methanol

0,5 ml 37% roztoku formaldehydu

doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Thiosíranový roztok:

0,3 g thiosíranu sodného (pentahydrátu)

doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného:

1 g dusičnanu stříbrného

doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Vývojka:

30 g uhličitanu sodného

80 µl roztoku thiosíranu sodného o koncentraci 10 mg/ml

doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Roztok kyseliny citronové 2,3 mmol/l:

48 g bezvodé kyseliny citronové (52,5 g monohydrátu kyseliny citronové)

doplnit deionizovanou vodou na 100 ml

Sušicí roztok:

104 ml 96% ethanolu

40 ml glycerolu

doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Pracovní postup:

Příprava skel:

- 1) Obě skla důkladně omýt vodou se saponátem a vydrhnout kartáčkem. Po té je opláchnout deionizovanou vodou, osušit, dvakrát opláchnout 96% ethanolom a osušit papírovým ručníkem.
- 2) Větší sklo ošetřit na ploše, která se bude dotýkat gelu, přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů, ten rozetřít papírovým ubrouskem a nechat 5 minut zaschnout, pak opláchnout deionizovanou vodou a osušit papírovým ručníkem.
- 3) Menší sklo ošetřit na ploše, která se bude dotýkat gelu, 1 ml roztoku molekulárního lepidla. Ten rozetřít papírovým ubrouskem a nechat 5 minut zaschnout, pak čtyřikrát opláchnout 96% ethanolom a pokaždé osušit papírovým ručníkem.
- 4) Na rovnou podložku v digestoři (polystyrenová deska) umístit větší sklo ošetřenou plochou nahoru, na něj po stranách položit 0,25 mm silné spacers a na ně položit menší sklo ošetřenou plochou dolů. Spacers umístit až do kraje skel, gumu spaceru přiložit k menšímu sklu, aby se jej těsně dotýkala. Na jedné straně jsou hrany skel přesně v zákrytu, na protilehlé straně jsou konce skel vzájemně posunuty přibližně o 2,5 cm. V místě spacerů skla na každé straně sepnout dvěma klipsy.

Příprava gelu:

- 5) T5C3 IEF gel připravit smísením jeho jednotlivých komponent, dobře promíchat, nasát do injekční stříkačky přiměřeného objemu a ihned vypouštět mezi skla po celé délce kratšího skla na tom čele, kde toto sklo nedosahuje čela skla delšího. Zároveň při tom na sklo druhou rukou poklepávat, aby se předešlo vzniku bublin v gelu a po nalití nechat hodinu polymerizovat.

- 6) Chladicí oběhové čerpadlo připojit gumovými hadicemi ke komoře pro IEF, nastavit termostat na 5 °C, nalít do něj deionizovanou vodu, aby byla nádoba cca ze 3/4 plná, zapnout chlazení a cirkulaci vody.
- 7) Po utužení gelu odstranit všechny klipsy a skla důkladně omýt od všech zbytků polyakrylamidu, skla od sebe odpáčit a sklo s nalepeným gelem umístit na chlazenou plochu IEF komory gelem nahoru.

Prefokuzace:

- 8) V jedné Petriho misce nechat nasát elektrodový strip přibližně 3 ml katodového pufru (nažloutlá kapalina), ve druhé Petriho misce nechat nasát elektrodový strip přibližně 3 ml anodového pufru (čirá kapalina), a stripy umístit na protilehlé strany gelu. Při tom dbát, aby byl anodový strip u anody a katodový strip u katody - nezaměnit je!
- 9) Nastavit rozteč elektrod ve víku tak, aby odpovídaly pozici stripů na gelu, víko přikrýt, připojit komoru ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu, na něm nastavit 3000 V, 150 mA, 20 W a prefokuzaci nechat probíhat půl hodiny.

Aplikace vzorků a fokuzace:

- 10) Vypnout zdroj elektrického proudu, odpojit od něho IEF komoru, sejmut víko a ke katodovému stripu, paralelně s ním umístit aplikátor vzorků tak, aby se vzorky umístit v řadě cca 2 - 3 cm od stripu.
- 11) Do každé pozice v aplikátoru napipetovat 3 µl vzorku. Po jejich napipetování víko přikrýt, připojit komoru ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu, na něm nastavit opět 3000 V, 150 mA, 20 W a vlastní izoelektrickou fokuzaci nechat probíhat 6 hodin.
- 12) Po ukončení vypnout zdroj elektrického proudu, vypnout chladicí oběhové čerpadlo, odpojit od zdroje IEF komoru, sejmut víko a sklo s gelem umístit do misky na třepačku opět gelem nahoru.

Vizualizace pomocí stříbra:

- 13) Gel přelít 200 ml formaldehydového fixačního roztoku a 10 minut jemně třepat.
- 14) Vylít fixační roztok a gel dvakrát po dobu pěti minut mírně třepat ve 200 ml deionizované vody.
- 15) Vodu vylít a gel přelít na jednu minutu 200 ml thiosíranového roztoku.
- 16) Thiosíranový roztok vylít a gel dvakrát opláchnout deionizovanou vodou (20 sec).
- 17) Gel přelít 200 ml 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného a 10 minut jemně třepat.
- 18) Roztok vylít a gel nejprve opláchnout deionizovanou vodou, a pak malým objemem vývojků.

- 19) Gel přelít 200 ml vývojky, do níž bylo těsně před použitím připipetováno 100 μ l 37% roztoku formaldehydu a přibližně 1 minutu jemně třepat, dokud nejsou vystupující bandy dostatečně intenzivní.
- 20) Vývoj zbarvení zastavit přidáním 10 ml roztoku kyseliny citronové (vývoj zbarvení bandů pokračuje ještě chvíli po přidání tohoto roztoku!!!) a 10 minut jemně třepat.
- 21) Roztok vylít a gel po dobu deseti minut mírně třepat ve 200 ml deionizované vody.
- 22) Vodu vylít a gel po dobu deseti minut mírně třepat ve 200 ml sušicího roztoku.
- 23) Roztok vylít a gel nechat přes noc vyschnout při pokojové teplotě, případně v sušárně při teplotě 50 °C.

Vizualizace pomocí přípravku PageBlue:

- 13) Gel zalít 200 ml roztoku PageBlue a nechat cca 30 minut třepat.
- 14) Page Blue vylít a sklo s gelem 3x promýt deionizovanou vodou.
- 15) Gel zalít cca půl litrem deionizované vody a na třepače odbarvovat, dokud intenzita obarvení nebude vhodná k hodnocení.
- 16) Roztok vylít a gel nechat přes noc vyschnout při pokojové teplotě, případně v sušárně při teplotě 50 °C.