

BADANIE PROFILI BIAŁKOWYCH W BULWACH ZIEMNIAKA PO PORAŻENIU BAKTERIAMI *DICKEYA SOLANI*

**Projekt finansowany przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi
Temat numer 56**

Zofia Murawska, Janusz Dębski, Dominik Cysewski,
Katarzyna Szajko, Renata Lebecka

CZARNA NÓŻKA ZIEMNIAKA

MOKRA ZGNILIZNA BULW ZIEMNIAKA

Pectobacterium atrosepticum 57%

Gardan *et al.* 2003; Waleron *et al.* 2013

P. carotovorum subsp. *carotovorum* 37%

Gardan *et al.* 2003

P. c. subsp. *brasiliense* 1,8%

Waleron *et al.* 2015

P. wasabiae 6%

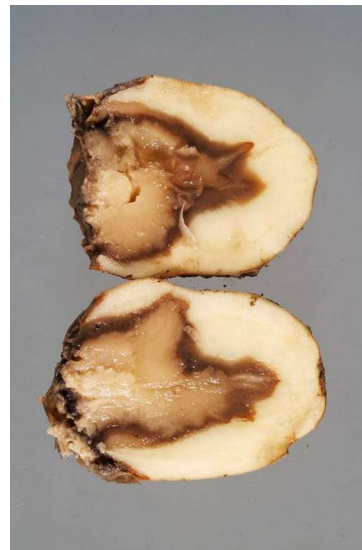
Gardan *et al.* 2003

Dickeya solani 5% (2009-2013)

Sławiak *et al.* 2009; Potrykus *et al.* 2016

D. dianthicola

Samson *et al.* 2005



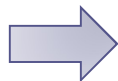
CEL

Opracowanie metody izolacji białek z bulw ziemniaka porażonych bakteriami *Dickeya solani* do badania proteomu metodą spektrometrii mas.

MATERIAŁY I METODY

TEST ODPORNOŚCI

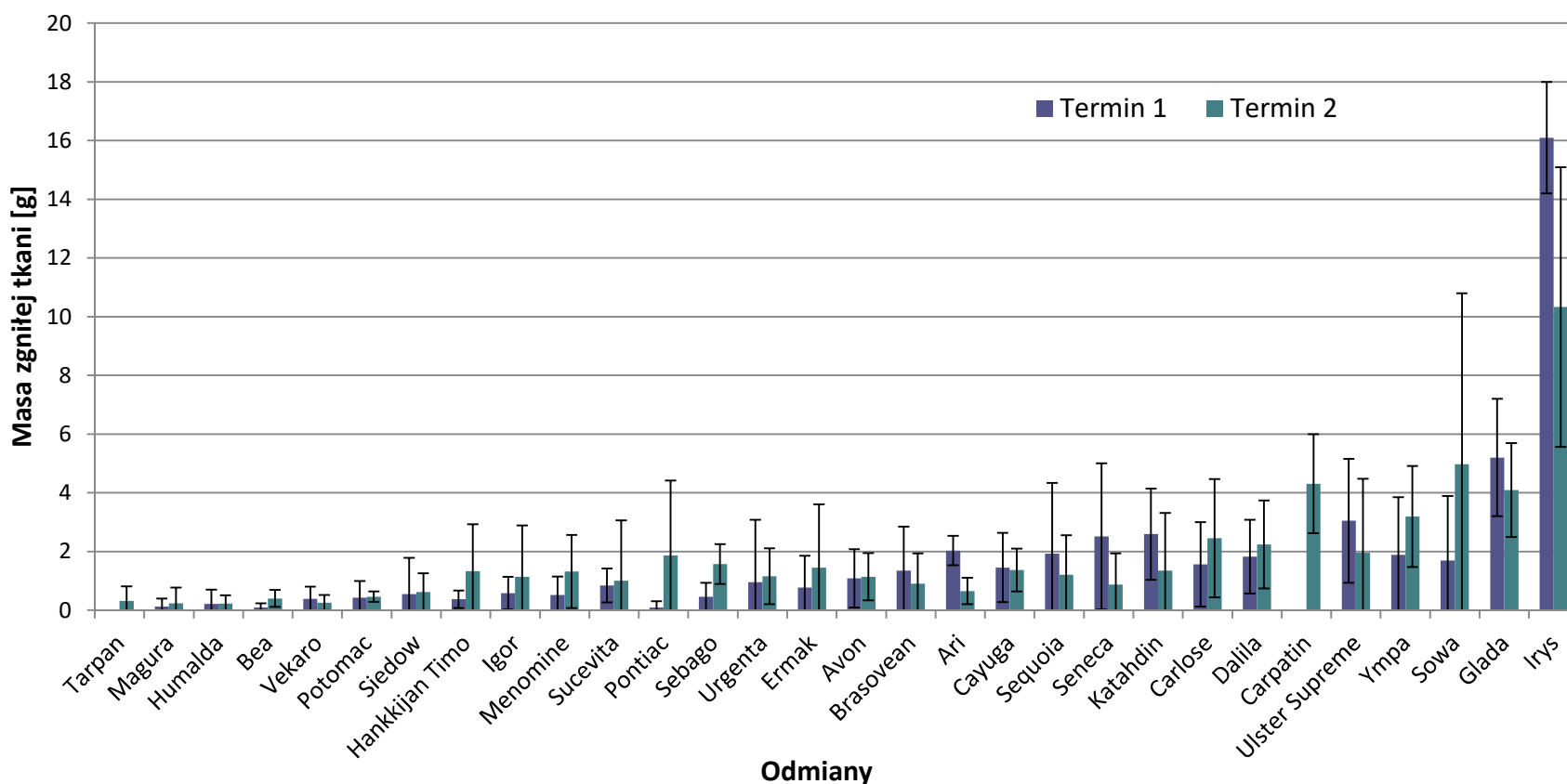
- ✓ Pożywka Lysogeny Broth z agarem
- ✓ Temp. 26°C przez 24 godziny
- ✓ $OD_{600} \sim 1,0$



26°C

TEST ODPORNOŚCI

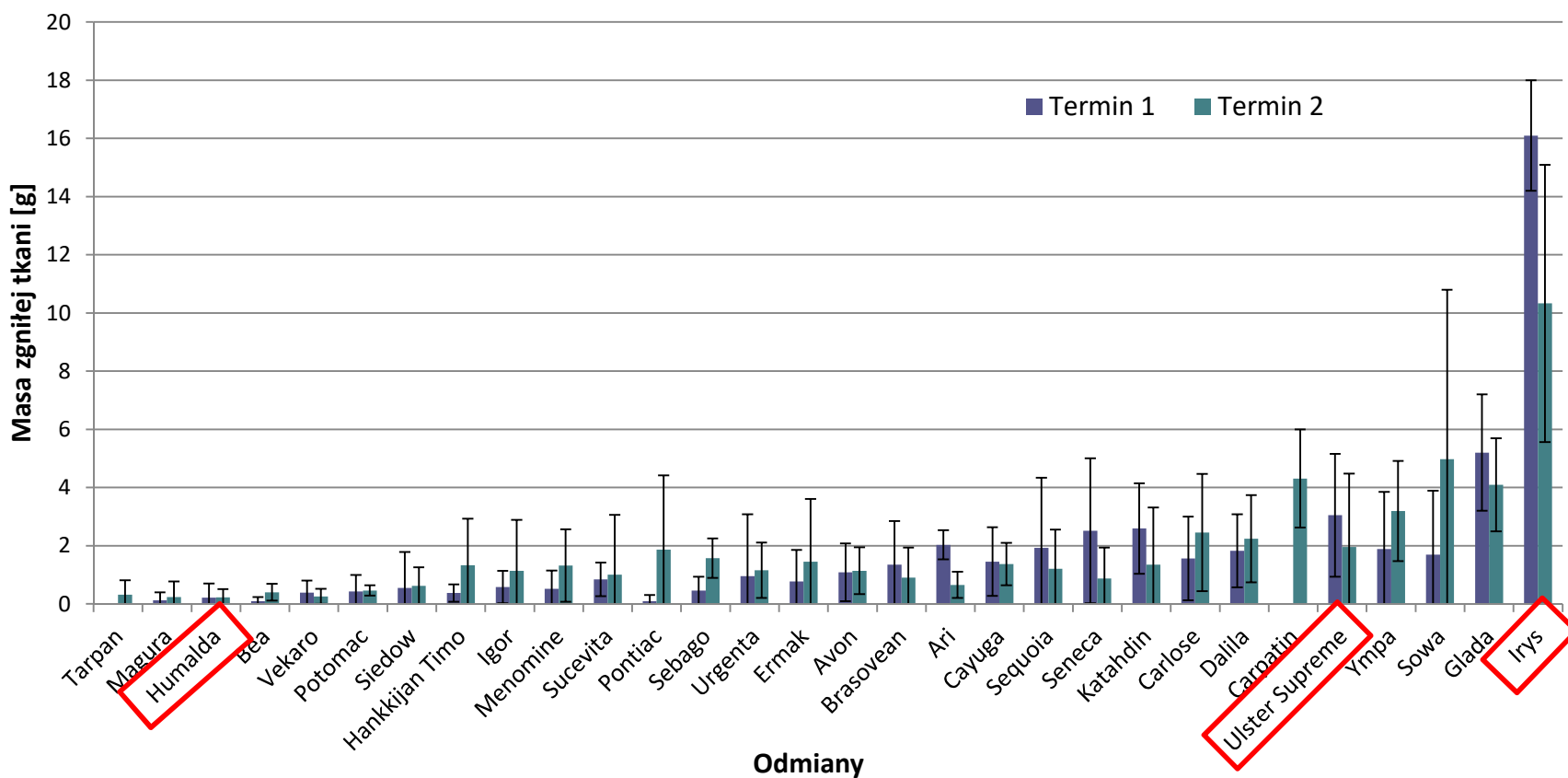
Wyniki testu odporności na 27 odmianach pochodzących od odmiany Katahdin, odmiana Katahdin, dwie odmiany wzorcowe: Irys o bulwach podatnych i Glada o bulwach średnio-odpornych.



Średnie porażenie bulw ziemniaka (\pm SD) przez bakterie *Dickeya solani*, szczep IFB0099 w teście laboratoryjnym po trzech dniach inkubacji w 26°C, 28 odmian ziemniaka: 25 pochodzących od odmiany Katahdin, odmiany Katahdin, Irys i Glada.

TEST ODPORNOŚCI

Wyniki testu odporności na 27 odmianach pochodzących od odmiany Katahdin, odmiana Katahdin, dwie odmiany wzorcowe: Irys o bulwach podatnych i Glada o bulwach średnio-odpornych.



Średnie porażenie bulw ziemniaka (\pm SD) przez bakterie *Dickeya solani*, szczep IFB0099 w teście laboratoryjnym po trzech dniach inkubacji w 26°C, 28 odmian ziemniaka: 27 pochodzących od odmiany Katahdin, odmiany Katahdin, Irys i Glada.

MATERIAŁY

Irys Ulster
Supreme

Odmiany o bulwach
podatnych
na *D. solani*

Humalda

Odmiana o bulwach
o wyższej odporności
na *D. solani*



Irys

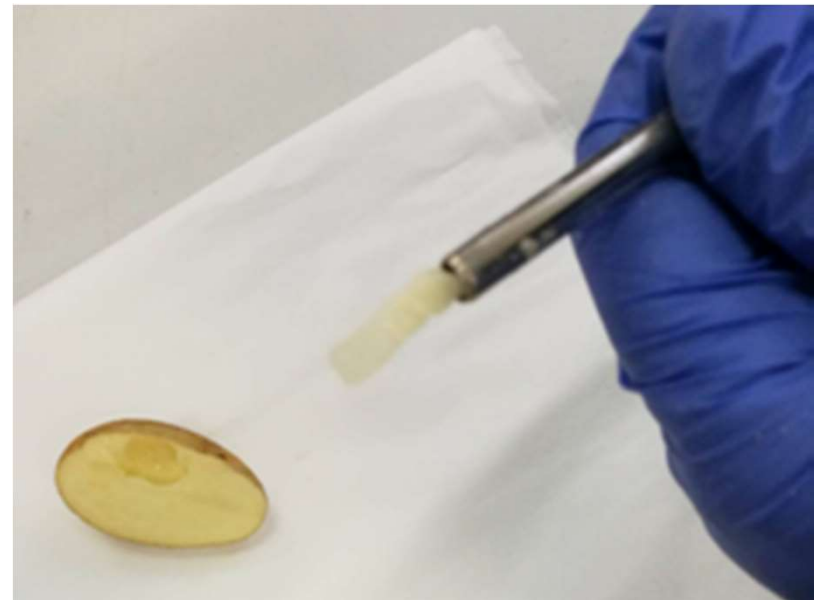
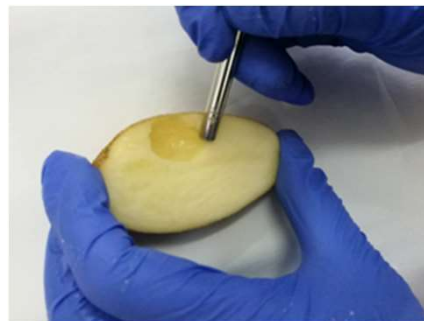


Humalda

INOKULACJA BULW - IZOLACJA BIAŁEK



26°C



LIOFILIZACJA PRÓB



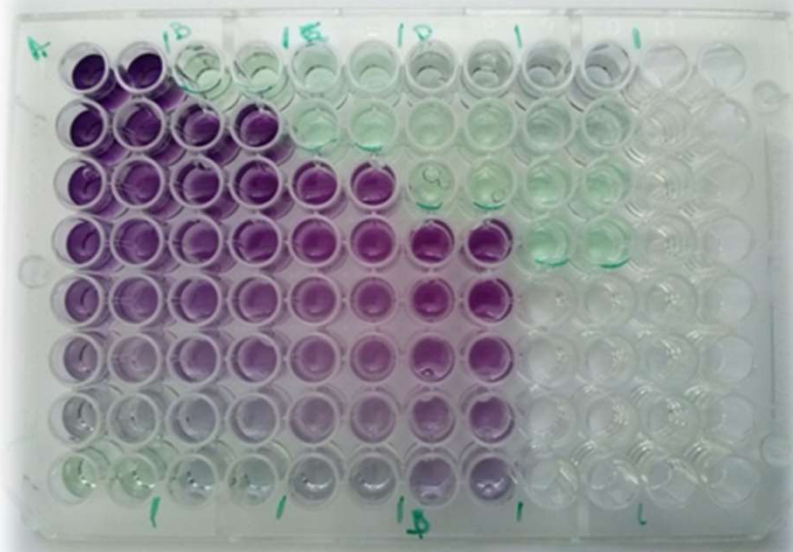
72 godziny



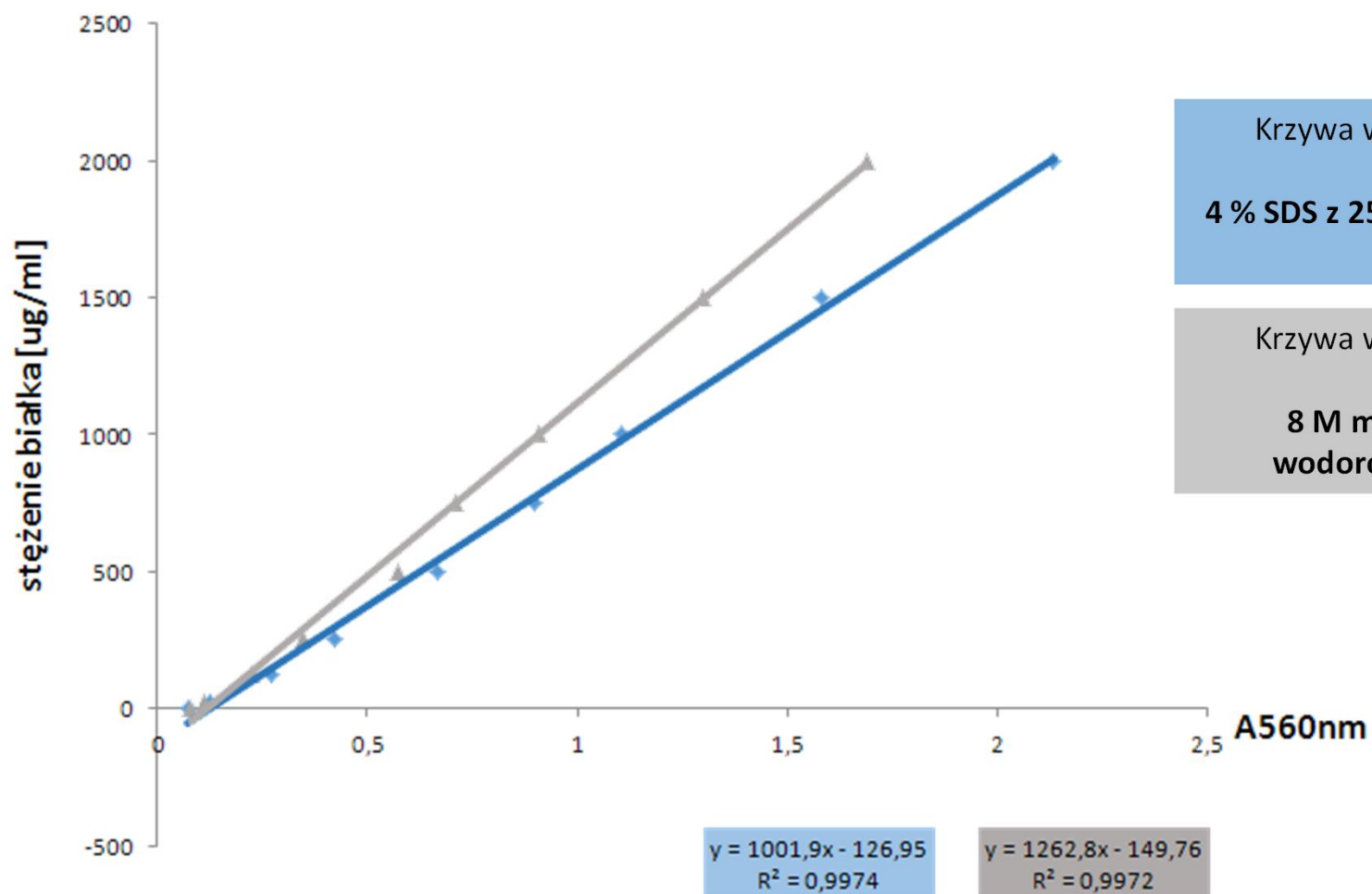
ILOŚCIOWE OZNACZANIE BIAŁEK

metoda BCA

BCA (kwas bicinechinowy) wchodzi w reakcję z jonami miedzi tworząc purpurowe kompleksy w środowisku zasadowym



KRZYWE WZORCOWE



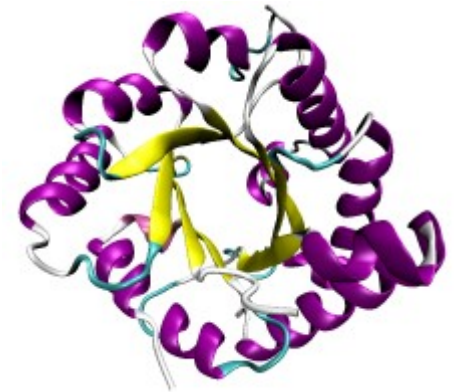
Krzywa wzorcowa zawieszona
w buforze
**4 % SDS z 25 mM wodorowęglanem
amonu**

Krzywa wzorcowa zawieszona
w buforze
**8 M moczniku z 100 mM
wodorowęglanem amonu.**

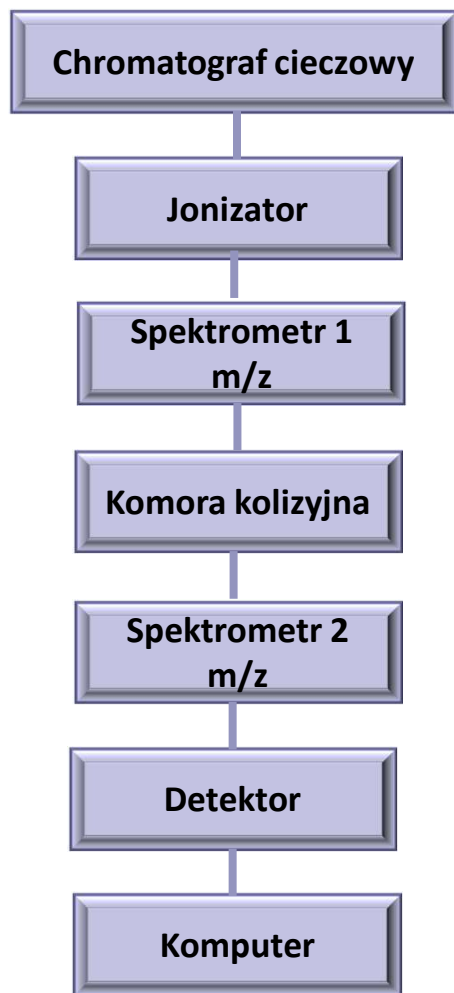
PROCEDURA IDENTYFIKACJI BIAŁEK PRZY WYKORZYSTANIU SPEKTROMETRII MAS

IHAR-PIB, o/Młochów

- ✓ Izolacja białek
- ✓ Trawienie białka w celu uzyskania mieszaniny peptydów, po uprzedniej redukcji i zablokowaniu zredukowanych mostków dwusiarczkowych;



PROCEDURA IDENTYFIKACJI BIAŁEK PRZY WYKORZYSTANIU SPEKTROMETRII MAS



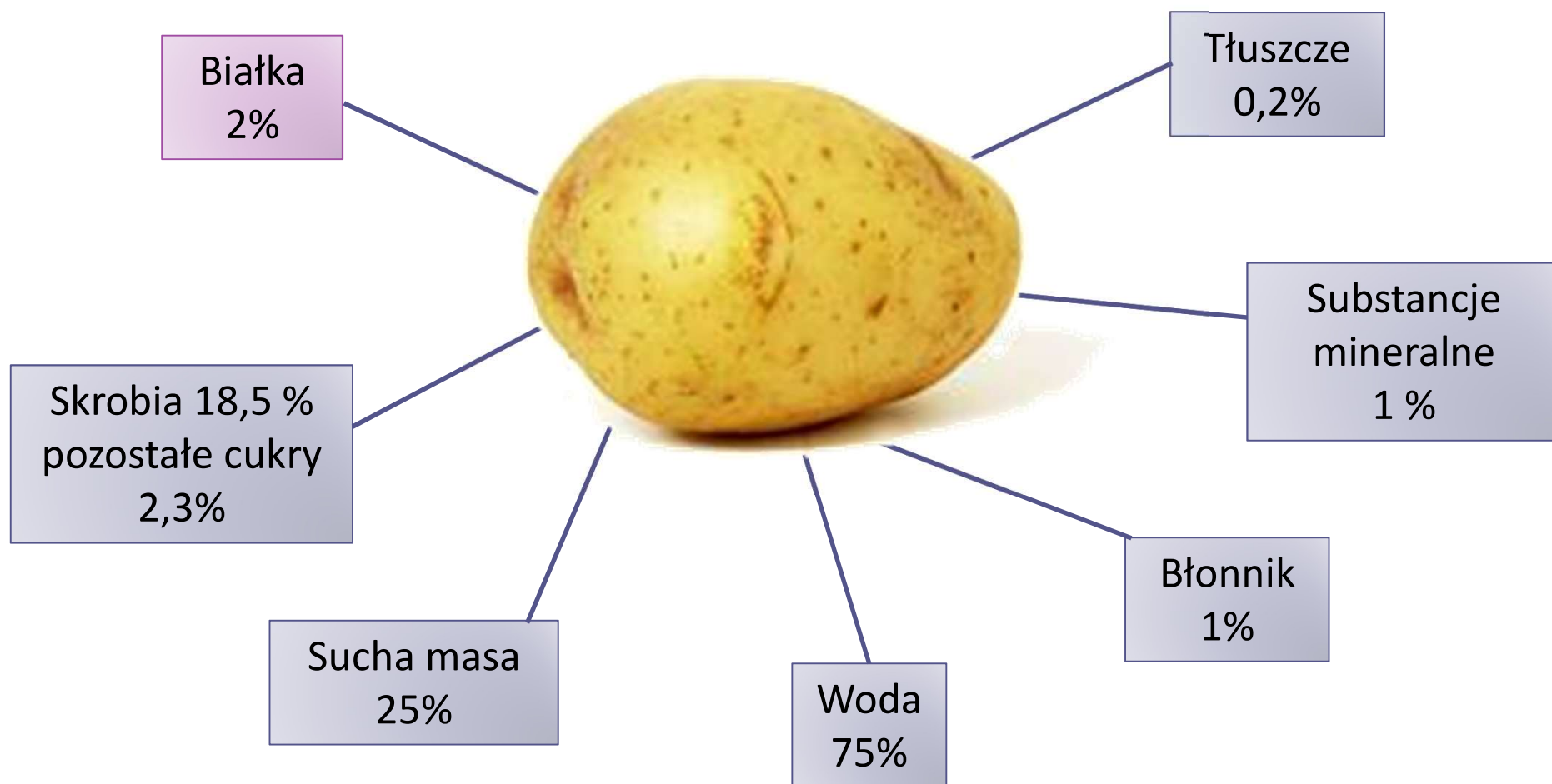
Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas, IBB-PAN

- ✓ rozdział mieszaniny peptydów przez chromatografię cieczową (LC) i pomiar mas peptydów i ich fragmentów w spektrometrze mas;
- ✓ porównanie uzyskanych mas peptydów i ich fragmentów z bazą danych sekwencji białkowych (np. NCBI, UniProt) przy pomocy programu MASCOT;
- ✓ analiza statystyczna wiarygodności uzyskanych przypisań i ustalenie listy białek obecnych w próbce.

Schemat blokowy układu LC-MS/MS

METODY IZOLACJI BIAŁEK

SKŁAD BULWY ZIEMNIAKA



METODY IZOLACJI BIAŁEK

Metoda I

Metoda II

Zliofilizowany fragment bulwy

Deoksycholan sodu SDC

wodorowęglan amonu

Siarczan dodecyłu sodu SDS

Sonifikacja

Wodorowęglan amonu

Wirowanie

Pomiar spektrofotometryczny

200 µg białka + wodorowęglan amonu

Aceton

Inkubacja

Wodorowęglan amonu

Mocznik + wodorowęglan amonu

Woda

Pomiar spektrofotometryczny

50 µg białka + wodorowęglan amonu

Lys-C

TCEP

Inkubacja

Inkubacja

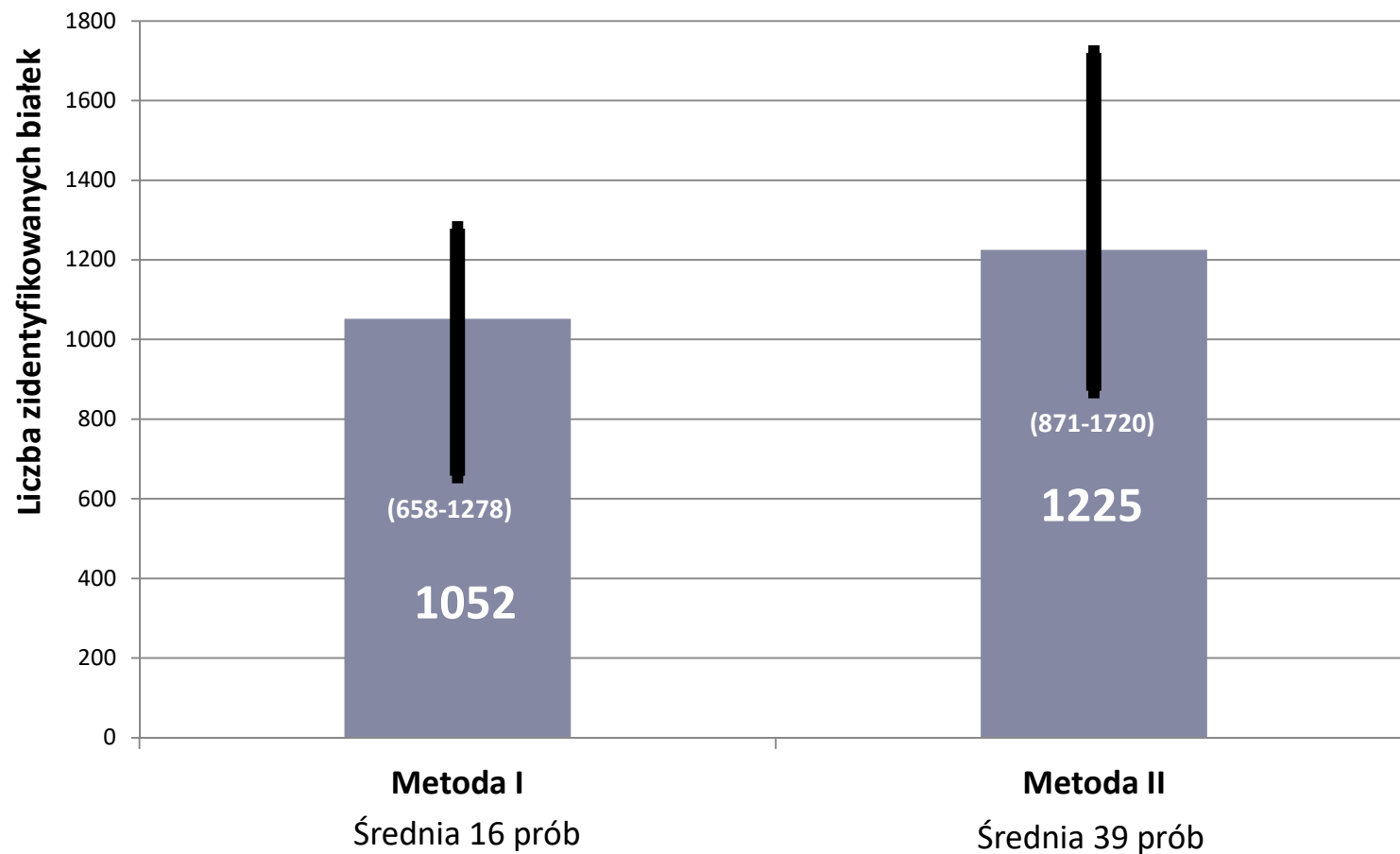
MMTS i trypsyna

Inkubacja

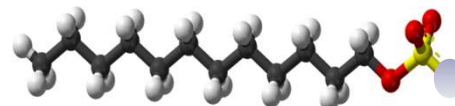
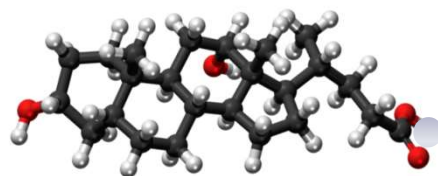
TFA

WYNIKI

100

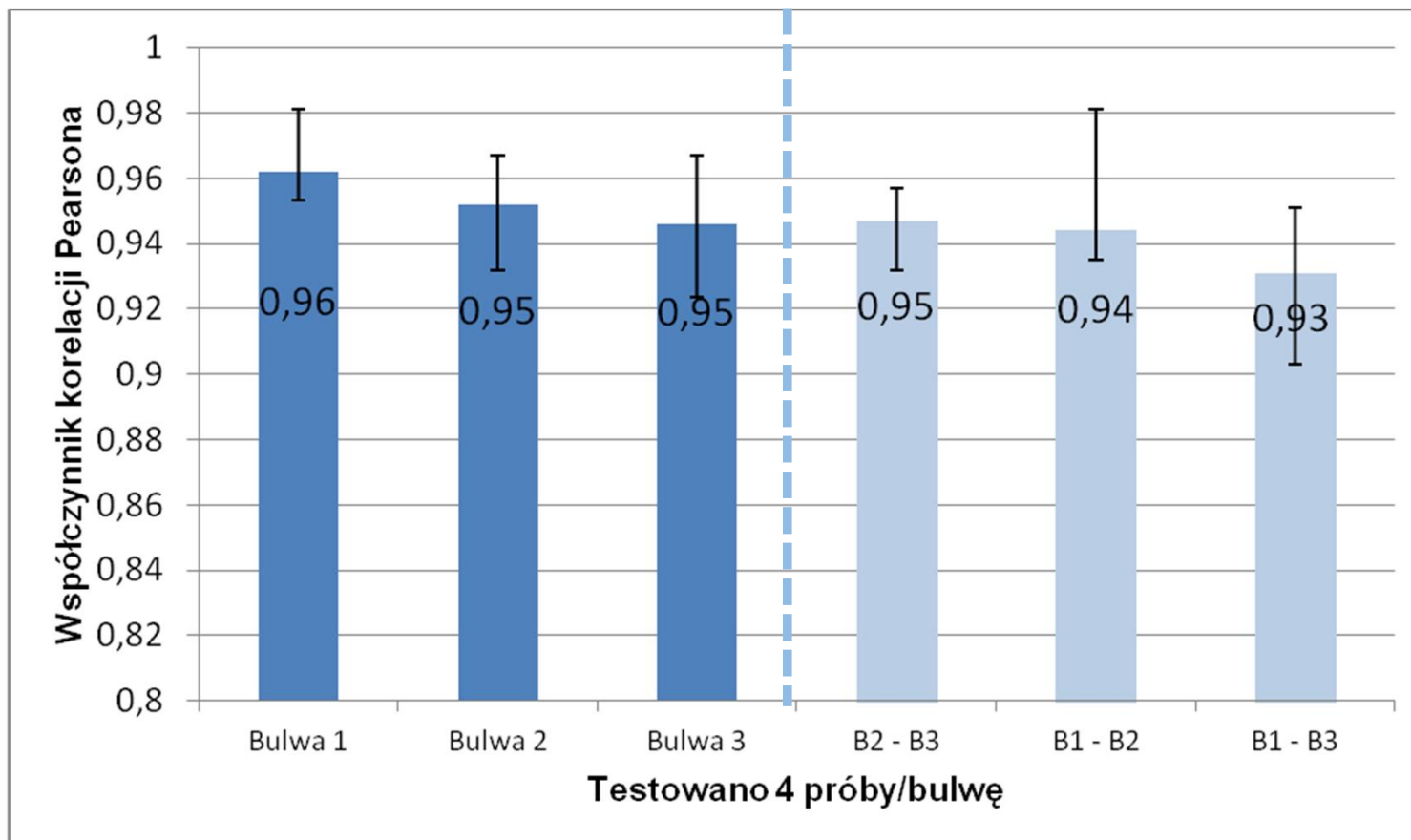


Deoksycholan sodu



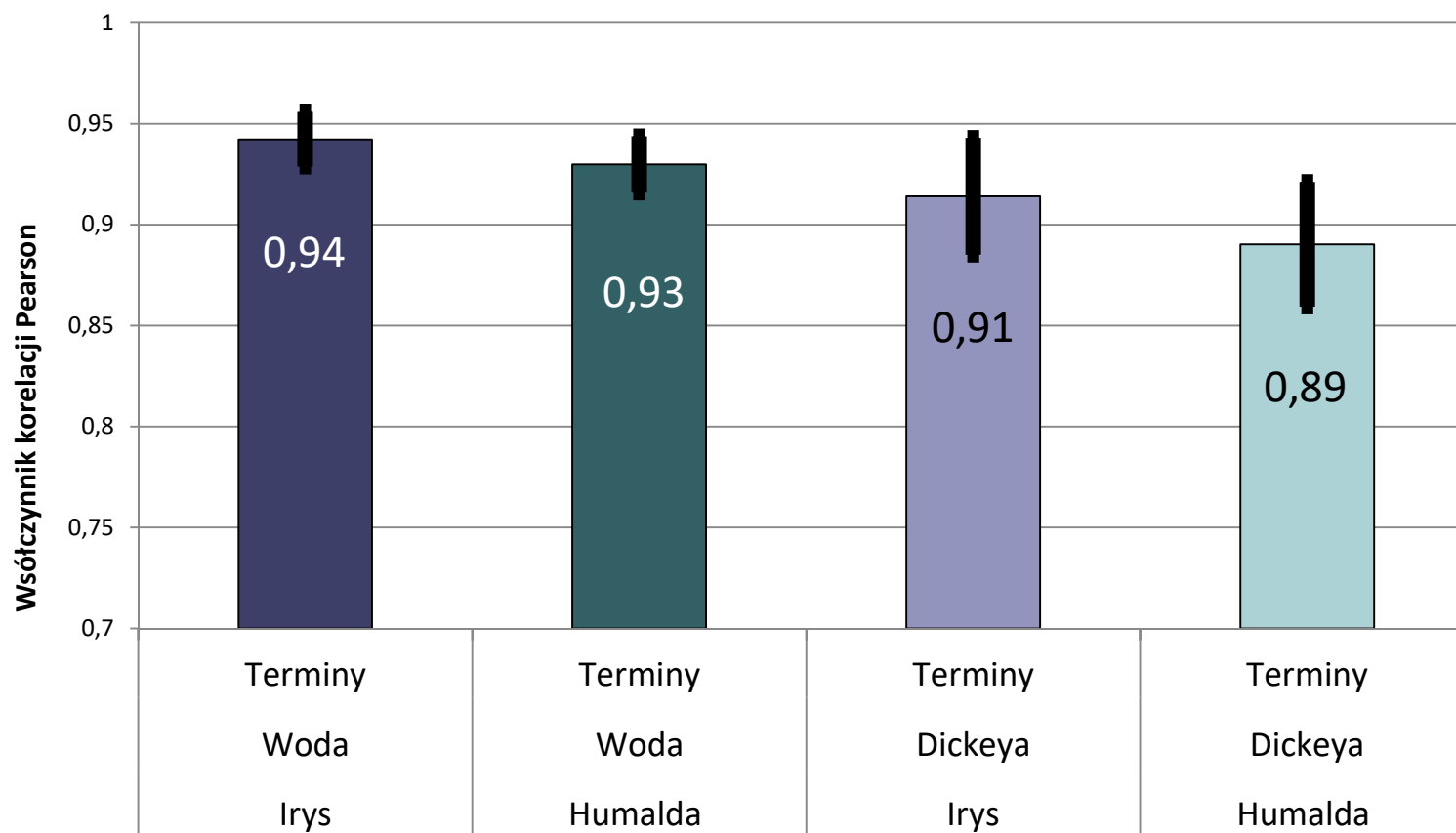
Siarczan dodecylu sodu

ZMIENNOŚĆ PRÓB W OBRĘBIE TEJ SAMEJ BULWY ORAZ POMIĘDZY BULWAMI



Zmienność prób pobranych z tych samych i z różnych bulw odmian Ulster Supreme 48 godzin po inokulacji bakteriami *Dickeya solani* wyrażoną za pomocą współczynnika korelacji Pearsona dla wyników pomiaru białek metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej- spektrometrii mas (HPLC-MS)

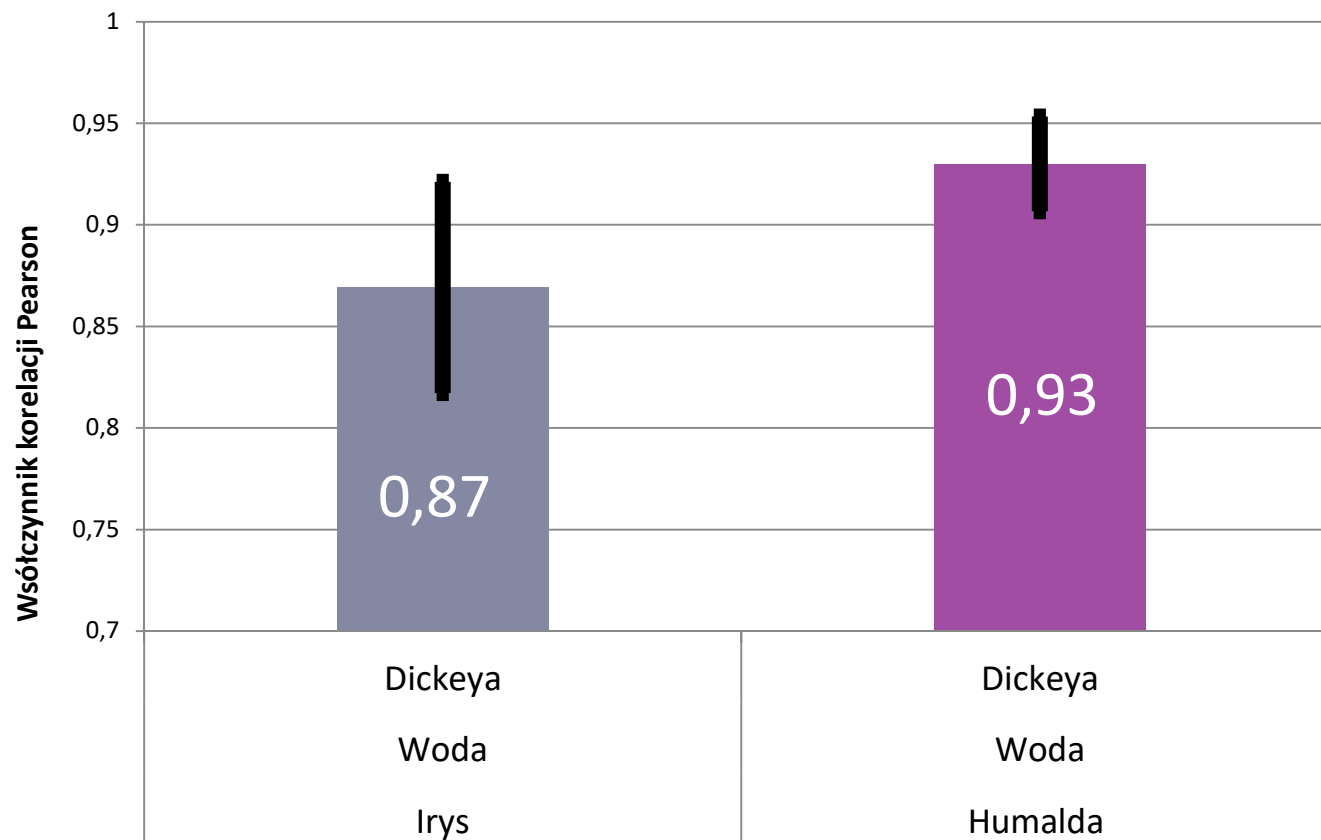
ZMIENNOŚĆ TERMINU IZOLACJI



Brak porażenia



ZMIENNOŚĆ PRÓB



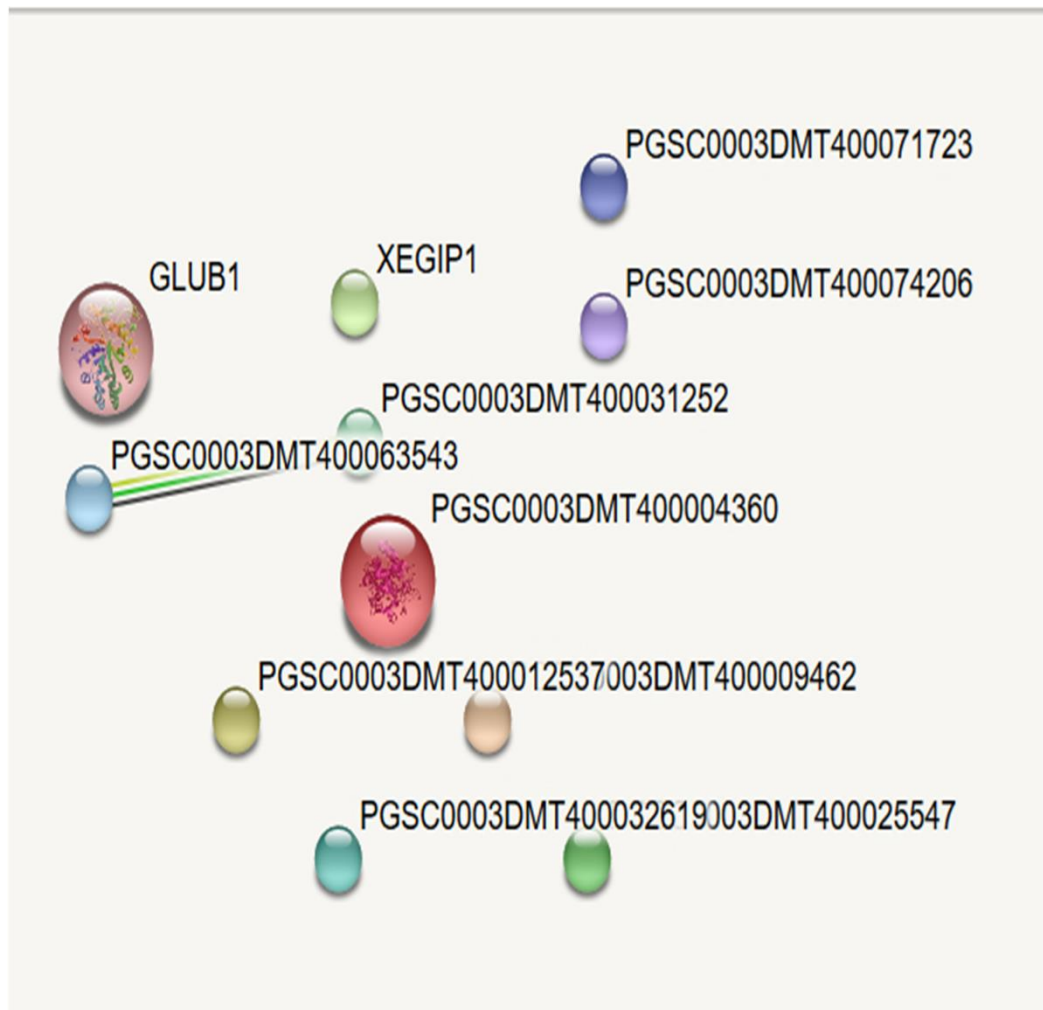
Irys



Humalda



BIAŁKA RÓŻNICOWE

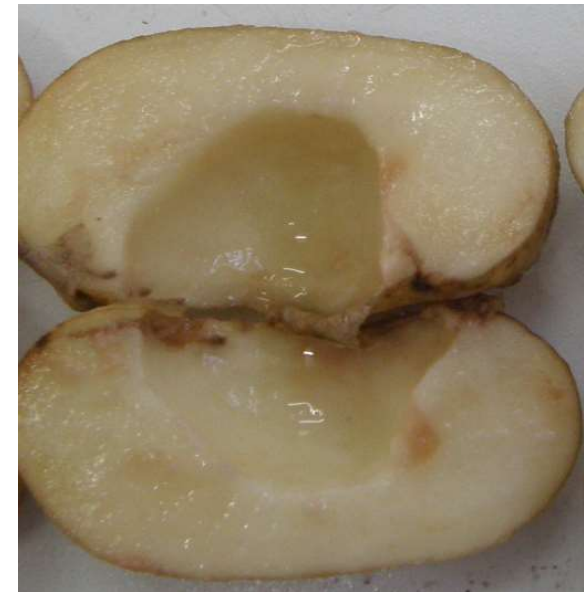
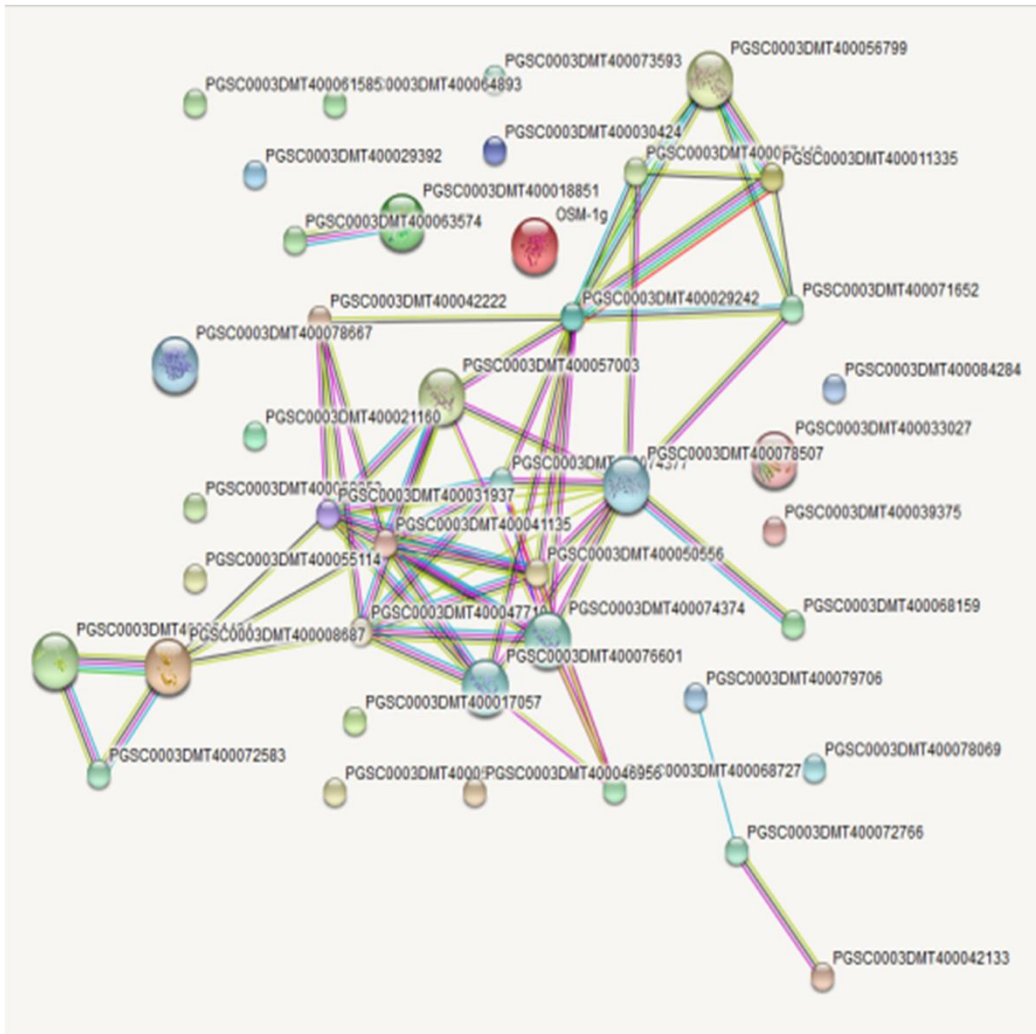


Humalda

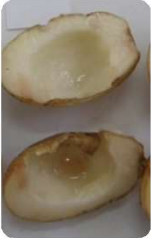


BIAŁKA RÓŻNICOWE

Irys



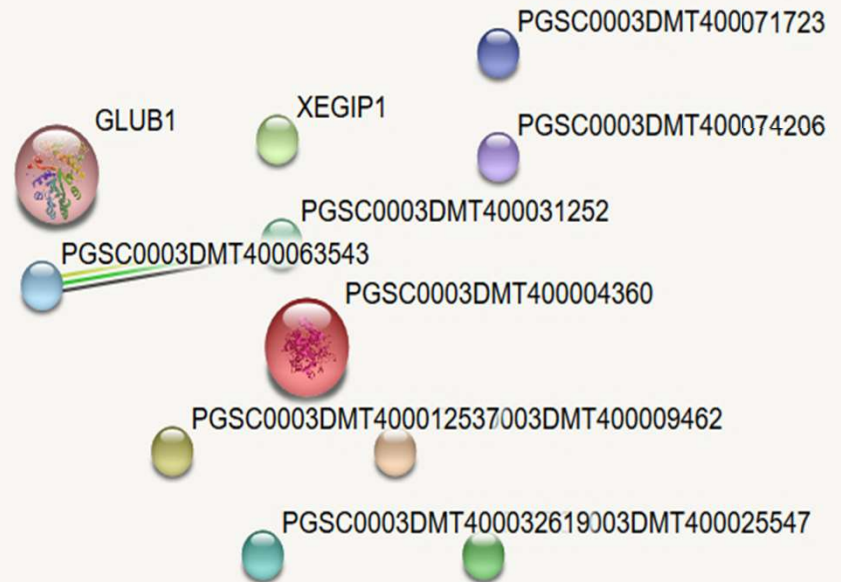
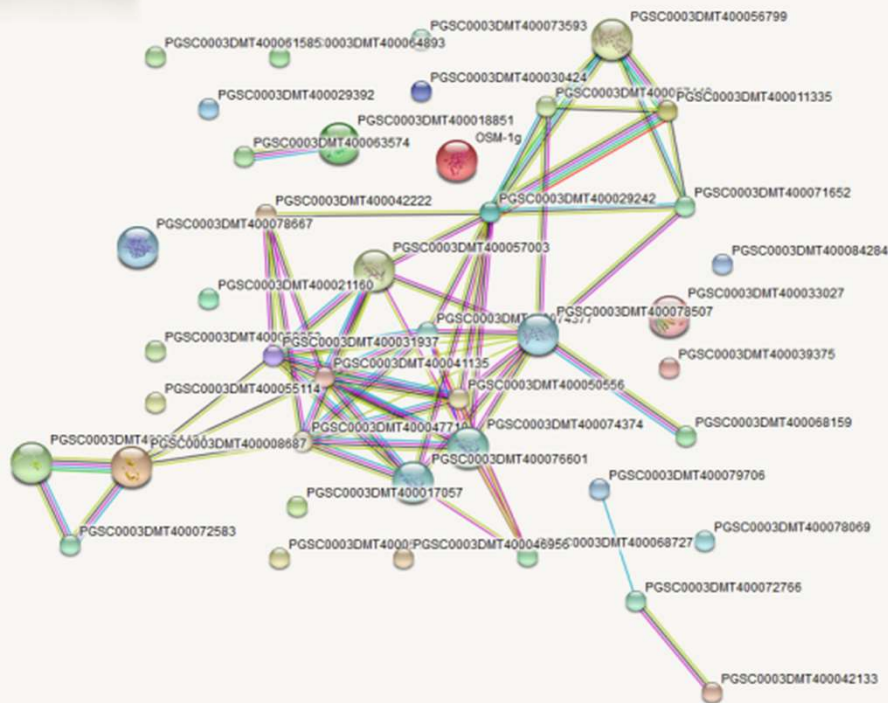
BIAŁKA RÓŻNICOWE



Irys



Humalda



WNIOSKI

Wybrano II metodę izolacji białek, dzięki której uzyskano większą liczbę zidentyfikowanych białek.

Współczynnik korelacji pomiędzy	Wartość wsp. korelacji	Wynik
Próbami z odmiany Ulster Supreme z tej samej bulwy z różnych bulw	0,95 – 0,96 0,93 – 0,95	Powtarzalności stosowanej metody izolacji
Próbami z bulw odmiany Humalda lub Irys izolowanymi w dwóch terminach	0,89 – 0,94	
Próbami pochodzącymi z bulw odmiany Humalda lub Irys traktowanymi wodą i zakażanych bakteriami	0,87 – 0,93	Różnice w profilach białkowych