

---

## PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

---

### DETEKCE METABOLICKY ZNAČENÝCH PROTEINŮ A RNA POMOCÍ CLICK REAKCE NA MEMBRÁNĚ

Článek je věnován památce prof. Ing. Rudolfa Zahradníka, DrSc.

JARMILA ŠTĚRBOVÁ<sup>a</sup>, PAVLÍNA KOČOVÁ<sup>a</sup>,  
LUKÁŠ PEKÁREK<sup>b</sup>, MARTIN SELINGER<sup>a,c</sup>,  
JAROSLAV ONDRUŠ<sup>a</sup>, LIBOR GRUBHOFFER<sup>a,c</sup>  
a JÁN ŠTĚRBA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, Branišovská 1760, 370 05 České Budějovice, <sup>b</sup> Helmholtz Institut für RNA-basierte Infektionsforschung, Josef-Schneider-Straße 2/D15, 97080 Würzburg, Německo,

<sup>c</sup> Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice  
sterbova@prf.jcu.cz

Došlo 14.6.21, přijato 7.10.21.

---

Klíčová slova: Click chemie, BONCAT, bioortogonální nekanonické značení aminokyselin, 2D elektroforéza, elektroblot

---

### Úvod

Termín Click chemie byl poprvé představen v práci Kolba a spol.<sup>1</sup>. Práce odkazuje na typ reakcí, které jsou modulární, stereospecifické, produkující vysoké výtěžky a pouze neškodné (mezi)produkty. Reakce probíhají za jednoduchých reakčních podmínek (ideálně by neměly být citlivé na přítomnost vody a kyslíku), produkt musí být jednoduše izolovatelný a stabilní za fyziologických podmínek<sup>1</sup>.

Jedním typem Click reakce je 1,3-dipolární cykloadice mezi terminálním alkyne a azidovými skupinami, jejichž výsledkem je vytvoření stabilního triazolu<sup>2</sup>. Tato reakce však při fyziologických teplotách probíhá pomalu, proto byla vyvinuta tzv. azido-alkynová Huisgenova cykloadice katalyzovaná mědí (CuAAC, Copper-Catalysed Azide-Alkyne Cycloaddition). Použití mědi jako katalyzátoru umožnilo zrychlení reakce a zvýšení regiospecifity, jelikož vznikaly pouze 1,4-disubstituované produkty<sup>3,4</sup>. Click chemie je dnes hojně používána v různých oblastech výzkumu i průmyslové výroby, jako je farmaceutický výzkum, biochemie, chemie polymerů nebo nanovědy<sup>5–7</sup>.

Click chemie je jednou z metod, které mohou být použity pro detekci, vizualizaci a identifikaci nově syntetizovaných a různě syntetizovaných proteinů, glykanů, lipidů a/nebo nukleových kyselin<sup>8</sup>.

Bioortogonální chemie je definována jako sada chemických reakcí, které mohou probíhat v živých organismech a které neinterferují s přirozenými biochemickými procesy v buňce<sup>8</sup>. Umožňuje vizualizaci procesů v živých systémech a je dostupná pro značení téměř jakéhokoli typu biomolekul – proteinů, glykanů, lipidů nebo nukleových kyselin *in vivo* a *in vitro*<sup>9–13</sup>. Široce používaná kombinace bioortogonální a Click chemie pro značení proteinů je nazývána BONCAT (bioortogonální nekanonické značení aminokyselin, bioorthogonal non-canonical amino acid tagging)<sup>9</sup>.

Metoda BONCAT je založena na začlenění modifikovaných aminokyselin, které nesou malou nereaktivní skupinu, do nově syntetizovaných proteinů. Aminokyseliny používané pro BONCAT, L-azidohomocystein (AHA) a L-homopropargylglycin (HPG), slouží jako náhrada pro methionin a jsou přijímány translačním mechanismem buňky<sup>14</sup>. Požadavky pro bioortogonalitu jsou rovněž naplněny; azidová a alkyňová skupina jsou malé, inertní, nevyskytují se v živém systému a jsou stabilní za fyziologických podmínek<sup>10,15</sup>. Každý protein obsahuje teoreticky nejméně jeden methionin, nicméně předchozí studie ukazují, že přibližně 5 % sekvencí lidských proteinů obsahuje pouze iniciační methionin, který může být odstraněn během post-translačních modifikací<sup>9</sup>.

Pro detekci jednotlivých bioortogonálně značených proteinů jsou využívány různé přístupy. Jednou z možností je elektroforetická separace proteinů, jejich elektroblotting a detekce na membráně s využitím malých protein-specifických molekul. Tyto molekuly, např. inhibitory enzymů, jsou konjugované s alkyne/azidem a váží se kovalentně na aktivní místo enzymu blotovaného na povrch membrány. Pro samotnou detekci se využívá CuAAC reakce, díky které je ve výsledku na protein navázaná fluorescenční značka s následnou detekcí fluorescence nebo biotin s následnou detekcí streptavidinem konjugovaným s křenovou peroxidásou<sup>16,17</sup>. Podobný přístup použil Ohata a spol.<sup>18</sup> pro detekci jednotlivých proteinů; v tomto případě byly proteiny přímo značeny azidovou nebo alkyňovou skupinou s následnou vazbou fluorescenční značky Click reakcí. Ve všech těchto případech byla elektroforéza použita primárně k oddělení značených proteinů od ostatních malých molekul.

Kombinace BONCAT s CuAAC představuje velmi účinný a jednoduchý nástroj pro vizualizaci změn v syntéze proteinů a identifikaci proteinů se změněnou expresí, což znamená velký pokrok v biochemických a molekulárně biologických studiích<sup>9,13,19,20</sup>. Například Hatzenpichler a spol.<sup>13</sup> značili nově syntetizované proteiny pomocí AHA a nechali je reagovat s DBCO-PEG<sub>4</sub>-Carboxyrhodaminem 110 za použití napětím podporované

Click reakce. Značené proteiny byly elektroforeticky separovány a detekovány pomocí fluorescenčního signálu.

Nejpoužívanější metodou pro separaci proteinů obsahujících AHA nebo HPG z reakční směsi (obsahující nezreagované značící molekuly) je precipitace, nejčastěji s využitím methanolu a chloroformu<sup>21</sup>. Tato metoda může nicméně vést ke ztrátě některých proteinů<sup>22–24</sup> a může ovlivnit migraci proteinů v gelu a způsobit rozostření signálu, ke kterému dochází pravděpodobně v důsledku agregace proteinů<sup>25</sup>.

Z výše uvedených důvodů jsme optimalizovali BONCAT za použití přístupu Click reakce na membráně pro detekci proteinů metabolicky značených AHA nebo HPG bez předchozí precipitace. Stejnou metodu jsme aplikovali na značené proteiny separované 2D elektroforézou a pro potvrzení možnosti využití metody i u jiných biomakromolekul také pro detekci RNA značené 5-ethynyluridinem (5-EU). Domníváme se, že reakce Click na membráně je vhodnější pro detekci bioortogonálně značených biomolekul ve srovnání s Click reakcí následovanou standardní precipitací methanolem/chloroformem.

## Experimentální část

Detekce metabolicky značených proteinů metodou Click na membráně

### *Kultivace buněk a metabolické značení proteinů*

Lidské glioblastomové buňky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Biowest) obsahujícím 10 % fetálního bovinního séra (FBS, Sigma-Aldrich), 1 % L-alanyl-L-glutaminu (Biochrom) a 1 % antibiotik (finální koncentrace amfotericin B 0,25 µg ml<sup>-1</sup>, penicillin G 100 U ml<sup>-1</sup>, streptomycin 100 µg ml<sup>-1</sup>, Biowest) při 37 °C. Buňky byly promyty dvakrát ve sterilním PBS (Phosphate Buffer Saline) a inkubovány 1 h v modifikovaném RPMI 1640 médiu bez sirmých aminokyselin (Sigma-Aldrich), obsahujícím 0,21 mM cystinu (SERVA) a 2 mM L-alanyl-L-glutaminu (Biochrom). Po vyčerpání methioninu bylo do média přidáno AHA nebo HPG (obojí Click Chemistry Tools) ve finální koncentraci 50 µM a nově tvořené proteiny byly metabolicky značeny 2 h. Buňky byly dvakrát promyty v PBS, uvolněny do PBS pomocí škrabky a centrifugovány 10 min při 4 °C a 400 g. Buněčný pelet byl lyzován v lyzačním pufru (1% SDS, 0,1M sodno-fosfátový pufr, pH 8,0) doplněném o inhibitory proteas (HALT Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific). Buněčné lyzáty byly inkubovány 30 min na ledu, sonikovány a zmrazeny na -80 °C. Koncentrace proteinů byla stanovena metodou BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific).

### *Click reakce v roztoku*

Click reakce v roztoku byla prováděna podle<sup>26</sup>. Na každých 50 mg proteinů bylo použito 0,5 ml Click reakční směsi obsahující 100 µM CuSO<sub>4</sub>, 0,5 mM THPTA (Click Chemistry Tools), 250 µM askorbátu sodného (SERVA), 100 mM draselno-fosfátového pufru, pH 7,0, a 100 µM

biotin-PEG<sub>4</sub>-alkynu nebo biotin-pikolylyl-azidu (obojí Click Chemistry Tools) ve vzorcích značených AHA anebo HPG. Reakce probíhala při pokojové teplotě 1 h.

### *2D elektroforéza*

Pro odstranění nezreagovaných reakčních složek a přípravu vzorků proteinů pro elektroforézu byly použity dva přístupy – srážení methanolem a chloroformem<sup>27</sup> nebo ultrafiltrace. Pro ultrafiltraci byly použity ultrafiltrační kolonky Vivaspin 2 Centrifugal Concentrator (10K MWCO, PES, Sartorius) dle pokynů výrobce. Vzorky byly redukovány na 10 % jejich původního objemu a naředěny rehydratačním pufrům.

Vysrážené proteiny byly rozpuštěny v rehydratačním pufru (7M močovina deionizovaná Amberlitem MB-150 (cit.<sup>28</sup>), 2M thiomočovina, 2% CHAPS, 40 mM DTT, 0,2 % 3–10 Pharmalytes, 0,02% bromfenolová modř (všechno Sigma-Aldrich)) na výslednou koncentraci 0,4 µg µl<sup>-1</sup>. Vzorky byly centrifugovány 10 min při 13 400 g pro odstranění případných agregátů vzniklých během srážení. 125 µl supernatantu bylo naneseno na IPG strip s lineárním gradientem pH v rozsahu 3–10 (Bio-Rad) a byla provedena rehydratace přes noc pod vrstvou minerálního oleje (Sigma-Aldrich). Izoelektrická fokusace (IEF) byla provedena na přístroji IEF100 (Hofer) při 20 °C (celkově 13 750 kWh).

Po IEF byly stripy ekvilibrovány 10 min v ekvilibračním pufru (8M močovina, 0,375 M Tris, pH 8,8; 2% SDS, 20% glycerol) s 2% (w/v) dithiotreitollem (DTT) a následně 10 min v ekvilibračním pufru s 2,5% (w/v) jodacetamidem (vše Sigma-Aldrich). Stripy byly přeneseny na 10% akrylamidový gel (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, Bio-Rad) a převrstveny 0,5% agarosou s nízkou teplotou tání (SERVA) v elektroodovém pufru. Barevný proteinový standard (10–245 kDa, Applichem) byl nanesen vedle pozitivního konce stripu. Elektroforéza byla provedena podle<sup>29</sup> v aparatuře Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad).

### *Elektroblot a Click na membráně*

Proteiny separované elektroforézou byly přeneseny na PVDF membránu<sup>30</sup>. V případě vzorků, u kterých byla Click reakce prováděna v roztoku před elektroforézou a blotem, byly membrány obarveny a vyvolány. V případě vzorků, které nebyly zpracovány Click reakcí v roztoku, následovala po rozdělení proteinů elektroforézou a jejich přenesení na PVDF membránu Click reakce na membráně. Všechny gely po elektroblotu byly fixovány a obarveny tzv. Blue Silver metodou podle<sup>31</sup>. Modifikovaná Click reakce byla provedena na povrchu membrány podle<sup>26</sup>. Pro jednu membránu o velikosti 7,5 cm × 8,5 cm bylo použito 5 ml Click reakční směsi a reakce probíhala 1 h při pokojové teplotě. Během optimalizace metody byl biotin-PEG<sub>4</sub>-alkyn použit v koncentraci 5–100 µM, po optimalizaci byla používána koncentrace 10 µM. Po značení byly membrány 2× promyty PBS-T (PBS s 0,05% Tween-20), blokovány v blokovacím činidle Roti-Block (Carl Roth) v PBS-T a inkubovány ve streptavidinu konjugovaném s alkalickou fosfatase (AP, alkaline phosphatase). Poté

následovala inkubace s biotinylovanými anti-streptavidin protilátkami a podruhé se streptavidinem-AP (vše Vector Laboratories, ředění 1:1000 v Roti-Block). Tato trojkroková detekce zajišťuje vysoce citlivou detekci s nízkým pozadím (nepublikované výsledky). Výsledný signál byl vyvolán ve vyvolávacím pufru (0,1M Tris, 0,1M NaCl, 0,05M MgCl<sub>2</sub>, pH 9,0) s 330 μg ml<sup>-1</sup> BCIP (5-brom-4-chlor-3-indolyl-fosfát) a 165 μg ml<sup>-1</sup> NBT (*p*-nitroblue tetrazolium-chlorid) (oba Applichem). Reakce byla zastavena po vyvolání dostatečně silného signálu promytím membrány v destilované vodě.

#### Detekce metabolicky značené RNA pomocí reakce Click na membráně

##### *Kultivace buněk a metabolické značení RNA syntetizované de novo*

Lidská meduloblastomová buněčná linie (DAOY ATCC HTB-186, cit.<sup>32</sup>) byla kultivována v RPMI 1640 médiu obsahujícím 10 % FBS, 1 % antibiotik-antimykotik, 1 % L-alanyl-L-glutaminu a 50 nM β-merkaptioethanolu. Buňky byly kultivovány při 37 °C v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Buňky byly nasazeny do šesti jamkových desek v hustotě 5·10<sup>5</sup> buněk na jamku. K buňkám byl přidán 5-EU ve finální koncentraci 1 mM a metabolické značení bylo provedeno v intervalech 30 min, 2 h, 4 h a 6 h. Experiment byl prováděn v biologických triplicátech.

##### *Izolace RNA*

Buňky byly promyty v PBS a lyzovány přidáním 1 ml činidla RNA Blue (Top-Bio) na jamku. Celková RNA byla poté izolována podle manuálu výrobce. Pelety RNA byly rozpuštěny ve vodě ošetřené diethylpyrokarbonátem. Koncentrace a čistota RNA byly kontrolovány spektrometrem Nanophotometer Pearl (Implen).

##### *Elektroforéza a blotování*

RNA byla separována na 1,2% agarosovém denaturačním gelu pufrovaném pomocí MOPS (3-(*N*-morfolino)-propansulfonová kyselina) obsahujícím 6,7 % formaldehydu a vizualizována pomocí barviva GelRed (Biotium). Poté probíhal kapilární blotting RNA na PVDF anebo nylonové membráně (Cytiva) s využitím 20× SSC pufru (3M NaCl, 0,3M citrát sodný, pH 7,0). Membrána byla fixovaná UV zářením (120 mJ cm<sup>-2</sup>) a promyta 0,1 M draselno-fosfátovým pufrem, pH 7,0.

##### *Click na membráně*

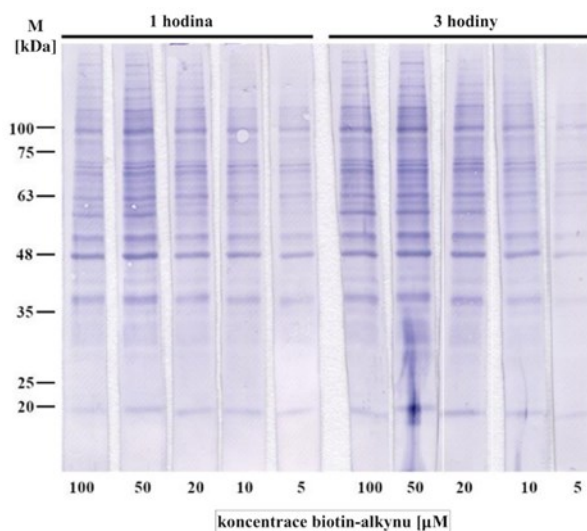
Membrány byly inkubovány v Click reakční směsi obsahující 10 μM pikolyl-biotin-azidu 1 h ve tmě při pokojové teplotě. Poté byly membrány blokovány (Roti-Block) a značeny trojitým systémem protilátek (koží anti-biotin protilátka, koňská anti-koží protilátka konjugovaná s AP, králičí anti-koňská protilátka konjugovaná s AP). Chemiluminiscence byla detekována použitím CDP-Star kitu (Novex); ke kolorimetrickému vyvolání signálu byl použit vyvolávací pufr obsahující 330 μg ml<sup>-1</sup> BCIP a 165 μg ml<sup>-1</sup> NBT (obě Applichem).

## Výsledky a diskuse

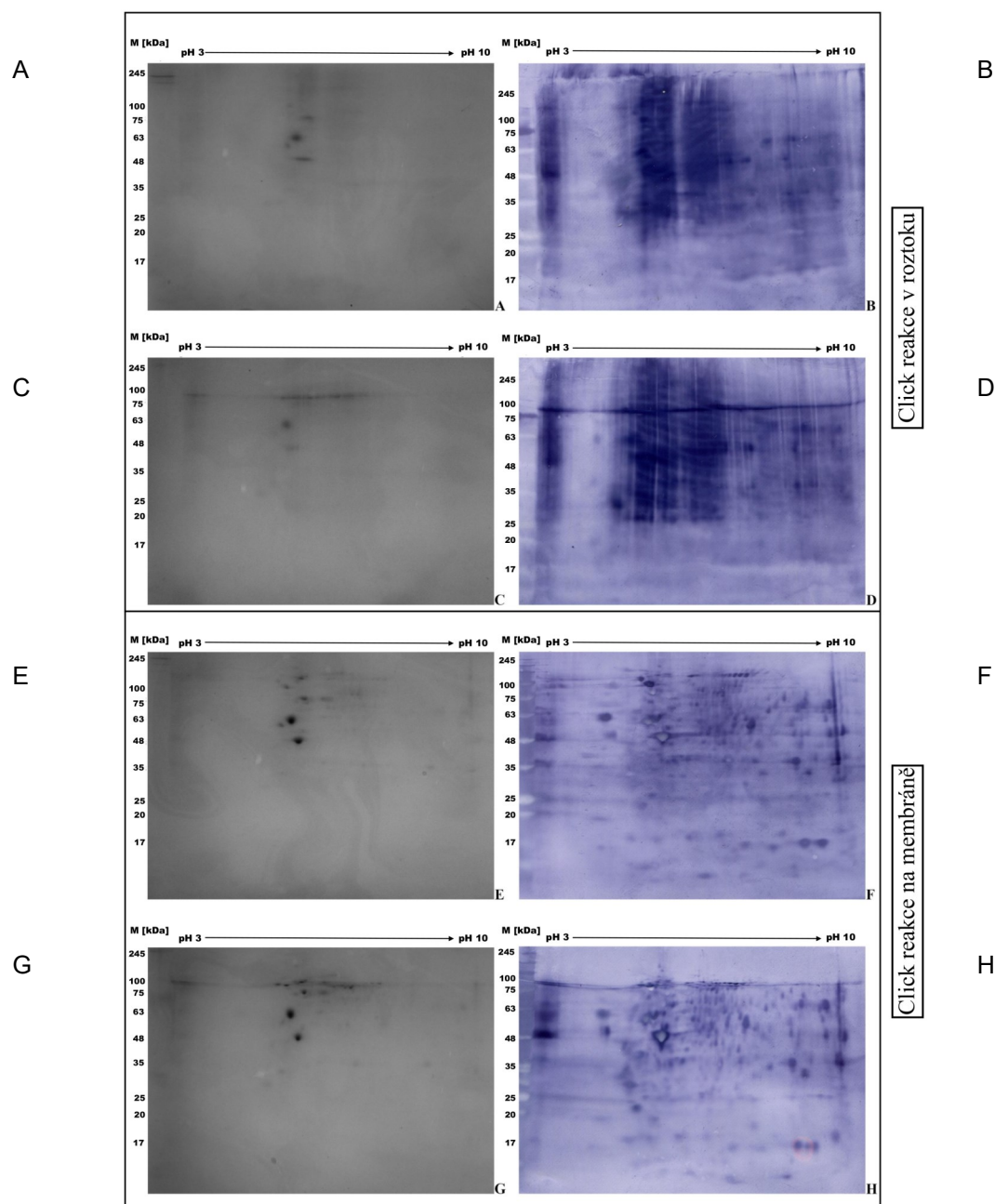
Standardní postup BONCAT je založen na analýze proteinů, které prochází Click reakcí v roztoku. Tento přístup je široce používán<sup>9,10,13,33</sup>, nicméně takto prováděná Click reakce nemusí pokaždé vést k jasným výsledkům. Jednou z nevýhod reakce v roztoku je potřeba přidání nadbytku nízkomolekulárního činidla, které by mělo být před další analýzou ze vzorku odstraněno, neboť jeho přítomnost může vést k falešně pozitivním anebo zkraseným výsledkům. To představuje další krok, který může ovlivnit výsledek. Jednou z možností je srážení<sup>25</sup>, které ale může vést v některých případech ke tvorbě nerozpustných proteinových agregátů způsobujících nedostatečnou fokusaci proteinů během IEF (cit.<sup>34</sup>). Proto jsme zkoumali možnost využití Click reakce na membráně po elektroblotingu.

Prvním krokem byla optimalizace množství biotin-alkynu použitého pro Click reakci prováděnou na membráně. Click reakce ve vzorcích obsahujících AHA byla prováděna 1 nebo 3 h s různými koncentracemi biotin-alkynu (100 μM, 50 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM). Pokles koncentrace biotin-alkynu neovlivnil výrazně intenzitu signálu ani nebylo potřeba přistoupit k prodloužení času inkubace (obr. 1). Všechny následující experimenty využívající metodu Click na membráně probíhaly v reakční směsi obsahující 10 μM biotin-alkynu po dobu 1 h.

AHA značené proteiny po Click reakci v roztoku byly analyzovány 2D elektroforézou a western blotem. Gel i membrána vykazovaly nedostatečnou separaci proteinů v celém rozsahu gelu (obr. 2A, B). Použití HPG místo AHA nemělo žádný příznivý efekt (obr. 2C, D). Proteiny



Obr. 1. **Optimalizace detekce proteinů značených AHA metodou Click na membráně;** 1 μg proteinů byl separován na 10% akrylamidovém gelu a blotován na PVDF membránu. Click reakce byla provedena s uvedenými koncentracemi biotin-alkynu po dobu 1 nebo 3 h. Nově syntetizované proteiny byly detekovány trojkrokovou detekcí streptavidinem konjugovaným s AP a biotinylovanými anti-streptavidin protilátkami s následnou chromogenní detekcí



Obr. 2. Porovnání 2D elektroforetických profilů a detekce proteinů obsahujících AHA či HPG značených Click reakcí v roztoku nebo Click na membráně; 50  $\mu\text{g}$  proteinů po Click reakci v roztoku (A – D) nebo před Click reakcí (E – H) bylo separováno pomocí IEF následované SDS-PAGE. Nově vzniklé proteiny v A, B, E a F byly značeny pomocí AHA, proteiny v C, D, G a H byly značeny pomocí HPG. Separované proteiny byly přeneseny na PVDF membránu a gely byly obarveny Blue Silver metodou (A, C, E a G). Click reakce na membráně byla provedena na blotovaných proteinech v F, H. Membrány (B, D, F a H) byly blokovány a nově syntetizované proteiny byly detekovány trojkrokovou detekcí se streptavidinem-AP a biotinylovanými anti-streptavidin protilátkami s následnou chromogenní detekcí

značené biotinem byly zviditelněny za použití trojkrokové detekce (obr. 2B, D). 2D elektroforéza je metoda vysoce citlivá k neúplné fokusaci proteinů, což se projevuje ve formě proužků proteinů přes celý rozsah separace

v jednom nebo druhém směru a nesprávným proteinovým profilem místo fokusovaných proteinových spotů (ideálně ve formě teček). Snahy o zlepšení výsledků a odstranění proteinových agregátů ultrafiltrací, opakovanou centrifu-

gací, precipitací nebo použitím deionizované močoviny<sup>28</sup> rovněž nepřinesly žádné uspokojivé zlepšení (data nejsou ukázána). Potíže se separací bioortogonálně značených proteinů (zejména malých proteinů a peptidů) v gelu byly dokumentovány i v dalších pracích<sup>18</sup>.

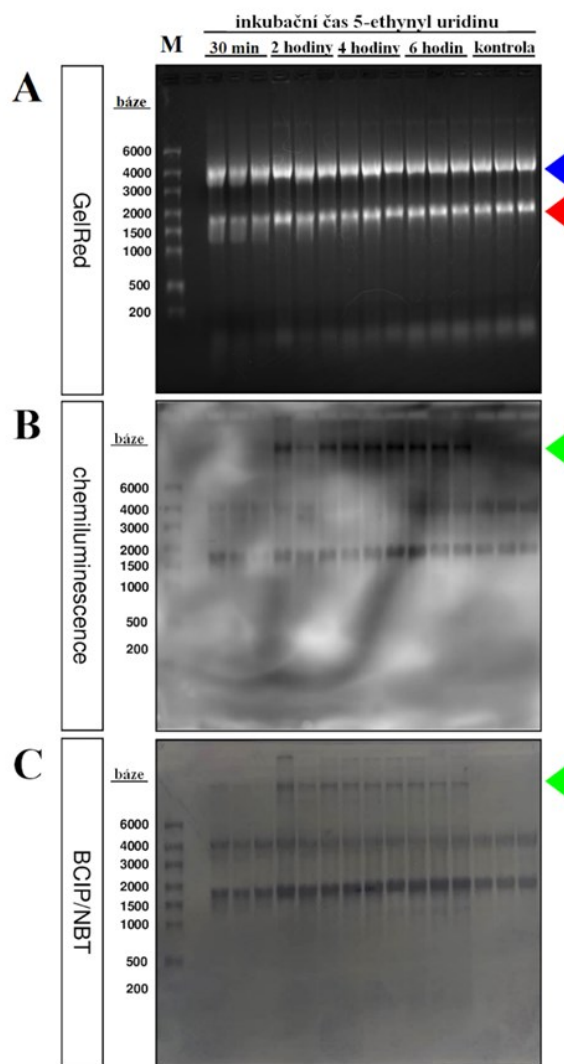
Proto jsme přistoupili k provedení Click reakce na membráně místo Click reakce v roztoku před elektroforetickou separací a elektroblotem. Vzorky proteinů obsahující AHA byly po lýze buněk zpracovány stejně jako standardní vzorky pro analýzu 2D elektroforézou a Click reakce byla provedena na blotovaných proteinech na povrchu membrány (obr. 2F). Ve srovnání s proteinovým profilem po Click reakci v roztoku (obr. 2B) byly proteinové spoty lépe ohraničeny, přítomnost nedostatečně separovaných proteinů ve formě proužků byla výrazně nižší. Podobné výsledky byly pozorovány při použití HPG (obr. 2D, 2H). Jedním z důvodů těchto pozorovaných rozdílů může být změna pI modifikovaných proteinů po navázání biotin-alkynu<sup>35</sup>, případně tvorba proteinových agregátů<sup>34</sup>. Analogický efekt byl pozorován v případě 1D SDS-PAGE i 2D elektroforézy (nepublikovaná data).

#### Detekce nově syntetizované RNA metodou Click na membráně

Po úspěšném použití Click reakce na membráně pro analýzu AHA nebo HPG značených proteinů jsme ověřili vhodnost použití této metody i pro jiné bioortogonálně značené biomolekuly. Jako příklad jsme testovali RNA značenou 5-EU a její detekci pomocí Click reakce na membráně. DAOY buňky byly inkubovány s 1 mM 5-EU 30 min, 2, 4, a 6 h. Čistota a integrita izolované RNA byla ověřena spektrofotometrickými a elektroforetickými metodami. Barvení RNA pomocí činidla GelRed v denaturovaném agarosovém gelu dokládá její vysokou integritu v případě testovaných vzorků (obr. 3A). Inkorporovaný 5-EU byl detekován kombinací Click reakce na membráně s 10nM pikolyl-biotin-azidem a následně trojkrokové detekce biotinu pomocí protilátek. 5-EU inkorporovaný v nově vznikající RNA byl vizualizován za použití chemiluminiscenčního (obr. 3B) a chromogenního substrátu (obr. 3C). Obrázek 3B ukazuje, že intervaly (kromě intervalu 30 min) jsou dostatečné pro začlenění detekovatelného množství 5-EU v případě 45S pre-rRNA. Na membránách je u všech vzorků pozorovatelný nespecifický signál pocházející z fluorescenční barvy GelRed v oblasti 18 a 28S rRNA (obr. 3B, C).

Metabolické značení RNA syntetizované *de novo* je hojně používané, často s využitím radioaktivních nukleosidů s inkorporovanými radioizotopy velmi těžkého vodíku (<sup>3</sup>H) nebo fosforu (<sup>32</sup>P) s následnou elektroforetickou separací a přenesením separovaných nukleových kyselin na nylonovou nebo nitrocelulózovou membránu a detekci nově vzniklých RNA autoradiografií<sup>36,37</sup>. Click chemie slouží jako neradioaktivní alternativa. Fluorescenční *in situ* detekce nově vznikající RNA s inkorporovaným 5-EU byla popsána<sup>38</sup> a široce využívána<sup>39,40</sup>, zatímco detekce *de novo* syntetizované RNA na membráně pomocí Click reakce dosud nebyla popsána.

V této práci jsme ukázali, že protokol metody Click na membráně lze úspěšně použít i pro značení RNA obsahující 5-EU, obdobně je využitelný i pro detekci jiných bioortogonálně značených biomakromolekul. Postup je nicméně vhodný pouze v případě použití odolnější PVDF



Obr. 3. **Detekce nově syntetizované RNA metodou Click na membráně;** Celková RNA obsahující 5-EU byla separována v 1,2% denaturačním agarosovém gelu a vizualizována barvivem GelRed (A). Jako velikostní standard byl použit RiboRuler High Range RNA ladder (M). Šipky ukazují na 28S rRNA (modře) a 18S rRNA (červeně). (B) molekuly RNA byly následně přeneseny z gelu na PVDF membránu, fixovány pomocí UV světla a značeny metodou Click na membráně. RNA syntetizovaná *de novo* byla detekována trojitým značením za použití streptavidinu-AP a biotinylovaného anti-streptavidinu s následnou chemiluminiscenční detekcí. 45S pre-rRNA je označena zelenou šipkou. (C) Membrána byla dále použita pro kolorimetrické vyvolání signálu za použití BCIP/NBT. V oblasti 18S a 28S rRNA v (B) a (C) je viditelný nespecifický signál způsobený fluorescenčním barvivem GelRed

membrány, protože při použití nylonové membrány byl pozorován slabý signál a vysoké pozadí (data nejsou ukázána).

## Závěr

Bioortogonální chemie je jednou z možností, jak modifikovat různé biomolekuly v jejich nativním prostředí. Kombinace bioortogonální a Click chemie je široce používána ke značení a analýze nově syntetizovaných proteinů, avšak při běžně používaném postupu zpracování vzorků dochází často k významnému snížení kvality proteinového profilu při 2D elektroforéze.

Námi popsaná kombinace bioortogonální chemie s metodou Click na membráně je aplikovatelná pro detekci nově vznikajících proteinů i RNA, které jsou bioortogonálně značené, separované elektroforézou a přenesené na PVDF membránu.

## LITERATURA

- Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 40, 2004 (2001).
- Huisgen R., Anneser E., Mack W.: *Angew. Chem.* 73, 656 (1961).
- Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 41, 2596 (2002).
- Tornøe C. W., Christensen C., Meldal M.: *J. Org. Chem.* 67, 3057 (2002).
- Thirumurugan P., Matosiuk D., Jozwiak K.: *Chem. Rev. (Washington, DC, U.S.)* 113, 4905 (2013).
- Sanchez-Sanchez A., Perez-Baena I., Pomposo J. A.: *Molecules* 18, 3339 (2013).
- Martens S., Holloway J. O., Du Prez F. E.: *Macromol. Rapid Commun.* 38, (2017).
- Sletten E. M., Bertozzi C. R.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 48, 6974 (2009).
- Dieterich D. C., Link A. J., Graumann J., Tirrell D. A., Schuman E. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9482 (2006).
- Hinz F. I., Dieterich D. C., Tirrell D. A., Schuman E. M.: *ACS. Chem. Neurosci.* 3, 40 (2012).
- Thinon E., Fernandez J. P., Molina H., Hang H. C.: *J. Proteome Res.* 17, 1907 (2018).
- Purba T. S., Marsh J., Ng'andu K., Kurinna S., Paus R.: *BioTechniques* 65, 97 (2018).
- Hatzenpichler R., Scheller S., Tavormina P. L., Babin B. M., Tirrell D. A., Orphan V. J.: *Environ. Microbiol.* 16, 2568 (2014).
- Kiick K. L., Saxon E., Tirrell D. A., Bertozzi C. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 19 (2002).
- Prescher J. A., Bertozzi C. R.: *Nat. Chem. Biol.* 1, 13 (2005).
- Tsai C. S., Yen H. Y., Lin M. I., Tsai T. I., Wang S. Y., Huang W. I., Hsu T. L., Cheng Y. S., Fang J. M., Wong C. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 2466 (2013).
- Vohidov F., Coughlin J. M., Ball Z. T.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 54, 4587 (2015).
- Ohata J., Vohidov F., Ball Z. T.: *Mol. BioSyst.* 11, 2846 (2015).
- Marter K., Kobler O., Erdmann I., Soleimanpour E., Landgraf P., Müller A., Abele J., Thomas U., Dieterich D. C.: *Bio-Protoc.* 9, e3142 (2019).
- Yao J., Huang X., Ren J.: *Analyst (Cambridge, U.K.)* 146, 478 (2021).
- Wessel D., Flügge U. I.: *Anal. Biochem.* 138, 141 (1984).
- Liang V., Ullrich M., Lam H., Chew Y. L., Banister S., Song X., Zaw T., Kassiou M., Gotz J., Nicholas H. R.: *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 3339 (2014).
- Bak-Jensen K. S., Laugesen S., Roepstorff P., Svendsen B.: *Proteomics* 4, 728 (2004).
- Vertommen A., Panis B., Swennen R., Carpentier S. C.: *Planta* 231, 1113 (2010).
- Hurst C. H., Turnbull D., Plain F., Fuller W., Hemsley P. A.: *BioTechniques* 62, 69 (2017).
- Presolski S. I., Hong V. P., Finn M. G.: *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 3, 153 (2011).
- Folch J., Ascoli I., Lees M., Meath J. A., LeBaron F. N.: *J. Biol. Chem.* 191, 833 (1951).
- Reed P. W., Densmore A., Bloch R. J.: *Electrophoresis* 33, 1263 (2012).
- Laemmli U. K.: *Nature* 227, 680 (1970).
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350 (1979).
- Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G. M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P. G.: *Electrophoresis* 25, 1327 (2004).
- Jacobsen P. F., Jenkyn D. J., Papadimitriou J. M.: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44, 472 (1985).
- McClatchy D. B., Ma Y., Liu C., Stein B. D., Martinez-Bartolome S., Vasquez D., Hellberg K., Shaw R. J., Yates J. R., 3rd: *J. Proteome Res.* 14, 4815 (2015).
- Freedman R. B., Clare Mills E. N., v knize: *Techniques for the Analysis of Membrane Proteins* (Ragan C. I., Cherry R. J., ed.), str. 27. Springer, Dordrecht 1986.
- Osterman I. A., Ustinov A. V., Evdokimov D. V., Korshun V. A., Sergiev P. V., Serebryakova M. V., Demina I. A., Galyamina M. A., Govorun V. M., Dontsova O. A.: *Proteomics* 13, 17 (2013).
- Kos M., Tollervey D.: *Mol. Cell* 37, 809 (2010).
- Morello L. G., Hesling C., Coltri P. P., Castilho B. A., Rimokh R., Zanchin N. I.: *Nucleic Acids Res.* 39, 648 (2011).
- Jao C. Y., Salic A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15779 (2008).
- Peltonen K., Colis L., Liu H., Trivedi R., Moubarek M. S., Moore H. M., Bai B., Rudek M. A., Bieberich C. J., Laiho M.: *Cancer Cell* 25, 77 (2014).
- Gomes C., Smith S. C., Youssef M. N., Zheng J. J., Hagg T., Hetman M.: *J. Biol. Chem.* 286, 4357 (2011).

**J. Štěřbová<sup>a</sup>, P. Kočová<sup>a</sup>, L. Pekárek<sup>b</sup>, M. Selinger<sup>a,c</sup>, J. Ondruš<sup>a</sup>, L. Grubhoffer<sup>a,c</sup>, and J. Štěřba<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, <sup>b</sup> Helmholtz Institute for RNA-based Infection Research, Würzburg, Germany, <sup>c</sup> Institute of Parasitology, Biology Centre of the ASCR, České Budějovice): **Click-on-Membrane for Detection of Metabolically Labelled Proteins and RNA**

Bioorthogonal chemistry provides one of the possibilities to modify various biomolecules in their native environment. The combination of Click chemistry with the BONCAT method (bioorthogonal non-canonical amino acid tagging) is widely used for tagging and analysis of newly synthesized proteins, which are clearly distinguish-

able from the pre-existing protein pool. However, the commonly used procedure results in low quality 2D electrophoretic profiles. We put a lot of effort into obtaining clear results using a standard Click protocol, with a negligible effect. Here we describe a Click-on-membrane approach which we successfully used not only to monitor *de novo* protein synthesis but also to detect newly synthesized RNA.

Full text English translation is available in the on-line version.

**Keywords:** Click chemistry, BONCAT, bioorthogonal non-canonical amino acid tagging, 2D electrophoresis, electroblotting

## DETECTION OF METABOLICALLY LABELLED PROTEINS AND RNA BY CLICK REACTION ON MEMBRANE

The article is dedicated to the memory of prof. Ing. Rudolf Zahradnik, DrSc.

JARMILA ŠTĚRBOVÁ<sup>a</sup>, PAVLÍNA KOČOVÁ<sup>a</sup>,  
LUKÁŠ PEKÁREK<sup>b</sup>, MARTIN SELINGER<sup>a,c</sup>,  
JAROSLAV ONDRUŠ<sup>a</sup>, LIBOR GRUBHOFFER<sup>a,c</sup>,  
and JÁN ŠTĚRBA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 1760, 370 05 České Budějovice, <sup>b</sup> Helmholtz Institut für RNA-basierte Infektionsforschung, Josef-Schneider-Straße 2/D15, 97080 Würzburg, Germany, <sup>c</sup> Institute of Parasitology, Biological Centre of the CAS, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice  
sterbova@prf.jcu.cz

Keywords: Click chemistry, BONCAT, bioorthogonal non-canonical amino acid labeling, 2D electrophoresis, electroblot

### Introduction

The term Click chemistry was first introduced in the work of Kolb et al.<sup>1</sup>. It refers to a type of reactions that are modular, stereospecific, producing high yields and only harmless (intermediate) products. The reactions take place under simple reaction conditions (ideally, they should not be sensitive to the presence of water and oxygen), the product must be easily isolated and stable under physiological conditions<sup>1</sup>.

One type of Click reactions is the 1,3-dipolar cycloaddition between the terminal alkyne and azide groups, which results in the formation of the stable triazole<sup>2</sup>. However, this reaction proceeds slowly at physiological temperatures, so the so-called copper-catalyzed azido-alkyne Huisgen cycloaddition (CuAAC, copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition) was developed. The use of copper as a catalyst allowed for an acceleration of the reaction and an increase in regioselectivity, since only 1,4-disubstituted products were formed<sup>3,4</sup>. Click chemistry is now widely used in various research and industrial areas such as pharmaceutical research, biochemistry, polymer chemistry or nanoscience<sup>5–7</sup>. Click chemistry is one of the methods that can be used to detect, visualize, and identify newly synthesized or differentially synthesized proteins, glycans, lipids and/or nucleic acids<sup>8</sup>.

Bioorthogonal chemistry is defined as a set of chemical reactions that can take place in living organisms and that do not interfere with natural biochemical processes in the cell<sup>8</sup>. It allows visualization of processes in living systems and is available for labelling of almost any type of

biomolecules – proteins, glycans, lipids or nucleic acids *in vivo* and *in vitro*<sup>9–13</sup>. A widely used combination of bioorthogonal and Click chemistry for protein labelling is called BONCAT (bioorthogonal non-canonical amino acid tagging)<sup>9</sup>.

The BONCAT method is based on the incorporation of modified amino acids carrying a small non-reactive group into newly synthesized proteins. The amino acids used for BONCAT, L-azidohomoalanine (AHA) and L-homopropargylglycine (HPG), serve as a substitute for methionine and are taken up by the cell's translational machinery<sup>14</sup>. The requirements for bioorthogonality are also met; the azide and alkyne groups are small, inert, do not occur in living systems and are stable under physiological conditions<sup>10,15</sup>. Each protein theoretically contains at least one methionine; however, previous studies show that approximately 5 % of human protein sequences contain only the initiating methionine, which can be removed during post-translational modifications<sup>9</sup>.

Different approaches have been used to detect individual bioorthogonally tagged proteins. One possibility is electrophoretic separation of proteins, their electroblotting and detection on the membrane using small protein-binding molecules. These molecules, e.g., enzyme inhibitors, are conjugated to an alkyne/azide and bind covalently to the active site of the enzyme blotted onto the membrane surface. For the detection itself, the CuAAC reaction is used, resulting in a fluorescent label bound to the protein followed by fluorescence detection; or biotin labelling followed by detection with streptavidin conjugated to horseradish peroxidase<sup>16,17</sup>. A similar approach was used by Ohata et al.<sup>18</sup> for the detection of single proteins; in this case, proteins were directly labelled with an azide or alkyne group followed by binding of a fluorescent dye by the Click reaction. In all these cases, electrophoresis was used primarily to separate the labelled proteins from other small molecules.

The combination of BONCAT with CuAAC is a very powerful and simple tool for visualizing changes in protein synthesis and identifying proteins with altered expression, which represents a major advance in biochemical and molecular biology studies<sup>9,13,19,20</sup>. For example, Hatzenpichler et al.<sup>13</sup> labelled newly synthesized proteins with AHA and allowed them to react with DBCO-PEG<sub>4</sub>-Carboxy-rhodamine 110 using a voltage-assisted Click reaction. The labelled proteins were electrophoretically separated and detected using a fluorescence signal.

The most commonly used method for separation of AHA- or HPG-containing proteins from the reaction mixture (containing unreacted labelling molecules) is precipitation, most commonly using methanol and chloroform<sup>21</sup>. However, this method can lead to the loss of some proteins<sup>22–24</sup> and can affect the migration of proteins in the gel and cause signal blurring, which is likely to occur due to protein aggregation<sup>25</sup>.

For the above reasons, we optimized BONCAT using a Click reaction approach on the membrane to detect metabolically labelled AHA or HPG proteins without prior precipitation. We applied the same method to labelled



proteins separated by 2D electrophoresis and, to confirm the feasibility of the method for other biomacromolecules, also for the detection of 5-ethynyl uridine (5-EU)-labelled RNA. We believe that the Click-on-membrane approach is more suitable for the detection of bioorthogonally labelled biomolecules compared to the Click reaction in solution followed by standard methanol/chloroform precipitation.

## Experimental part

### Detection of metabolically labelled proteins using Click on membrane method

#### *Cell culture and metabolic labelling of proteins*

Human glioblastoma cells were cultured in RPMI 1640 medium (Biowest) containing 10 % fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich), 1 % L-alanyl-L-glutamine (Biochrom) and 1 % antibiotics (final concentration of amphotericin B 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , penicillin G 100 U  $\text{mL}^{-1}$ , streptomycin 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Biowest) at 37 °C. Cells were washed twice in sterile PBS (Phosphate Buffer Saline) and incubated for 1 h in modified RPMI 1640 medium without sulphur-containing amino acids (Sigma-Aldrich) containing 0.21 mM cystine (SERVA) and 2 mM L-alanyl-L-glutamine (Biochrom). After methionine depletion, AHA or HPG (both Click Chemistry Tools) was added to the medium at a final concentration of 50  $\mu\text{M}$  and the newly formed proteins were metabolically labelled for 2 h. Cells were washed twice in PBS, released into PBS using a scraper and centrifuged for 10 min at 4 °C and 400 x g. The cell pellet was lysed in lysis buffer (1 % SDS, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0) supplemented with protease inhibitors (HALT Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific). Cell lysates were incubated for 30 min on ice, sonicated and frozen at –80 °C. Protein concentration was determined by the BCA method (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific).

#### *Click reaction in solution*

Click reaction in solution was carried out according to ref.<sup>26</sup>. For every 50 mg of proteins, 0.5 mL of Click reaction mixture containing 100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 0.5 mM THPTA (Click Chemistry Tools), 250  $\mu\text{M}$  sodium ascorbate (SERVA), 100 mM potassium-phosphate buffer, pH 7.0, and 100  $\mu\text{M}$  biotin-PEG<sub>4</sub>-alkyne or biotin-picolyl azide (both Click Chemistry Tools) was used in AHA- or HPG-labelled samples, respectively. The reaction was carried out at room temperature for 1 h.

#### *2D electrophoresis*

Two approaches were used to remove unreacted reaction components and prepare the protein samples for electrophoresis – precipitation with methanol and chloroform<sup>27</sup> and ultrafiltration. For ultrafiltration, Vivaspin 2 Centrifugal Concentrator ultrafiltration columns (10K MWCO, PES, Sartorius) were used according to the manufacturer's instructions. Samples were reduced to 10 % of their original volume and diluted with rehydration buffer.

Precipitated proteins were dissolved in rehydration buffer (7 M urea deionized with Amberlite MB-150 (ref.<sup>28</sup>), 2 M thiourea, 2 % CHAPS, 40 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 % 3–10 Pharmalytes, 0.02 % bromophenol blue (all Sigma-Aldrich)) to a final concentration of 0.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Samples were centrifuged for 10 min at 13 400 x g to remove any aggregates formed during precipitation. 125  $\mu\text{l}$  of supernatant was applied to an IPG strip with a linear pH gradient of 3–10 (Bio-Rad) and rehydrated overnight under a layer of mineral oil (Sigma-Aldrich). Isoelectric focusing (IEF) was performed on an IEF100 instrument (Hoefer) at 20 °C (total 13 750 kWh).

After IEF, strips were equilibrated for 10 min in equilibration buffer (8 M urea, 0.375 M Tris, pH 8.8; 2 % SDS, 20 % glycerol) with 2 % (w/v) DTT followed by 10 min in equilibration buffer with 2.5 % (w/v) iodoacetamide (all Sigma-Aldrich). Strips were transferred onto a 10 % acrylamide gel (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, Bio-Rad) and overlaid with 0.5 % low melting point agarose (SERVA) in electrode buffer. A coloured protein standard (10–245 kDa, Applichem) was applied next to the positive end of the strip. Electrophoresis was performed according to ref.<sup>29</sup> in a Mini-PROTEAN Tetra Cell apparatus (Bio-Rad).

#### *Electroblot and Click reaction on the membrane*

Proteins separated by electrophoresis were transferred to a PVDF membrane<sup>30</sup>. For samples where the Click reaction was performed in solution prior to electrophoresis and blotting, the membranes were stained and developed. In the case of samples that were not processed by the Click reaction in solution, protein separation by electrophoresis and transfer to the PVDF membrane was followed by the Click reaction on the membrane (see below). All gels after electroblotting were fixed and stained using the Blue Silver method according to<sup>31</sup>. The modified Click reaction was performed on the membrane surface according to ref.<sup>26</sup>. For one 7.5 cm × 8.5 cm membrane, 5 mL of Click reaction mixture was used and the reaction was run for 1 h at room temperature. During the optimization of the method, biotin-PEG<sub>4</sub>-alkyne was used at a concentration range of 5–100  $\mu\text{M}$ , after optimization a concentration of 10  $\mu\text{M}$  was used. After labelling, membranes were washed twice with PBS-T (PBS with 0.05 % Tween-20), blocked in Roti-Block blocking reagent (Carl Roth) in PBS-T and incubated in streptavidin conjugated with alkaline phosphatase (AP). This was followed by incubation with biotinylated anti-streptavidin antibodies and a second time with streptavidin-AP (all Vector Laboratories, 1:1000 dilution in Roti-Block). This three-step detection provides a highly sensitive detection with low background (unpublished results). The resulting signal was induced in developing buffer (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.05 M  $\text{MgCl}_2$ , pH 9.0) with 330  $\mu\text{g mL}^{-1}$  BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) and 165  $\mu\text{g mL}^{-1}$  NBT (*p*-nitroblue tetrazolium chloride) (both Applichem). The reaction was stopped after inducing a sufficiently strong signal by washing the membrane in distilled water.

## Detection of metabolically labelled RNA by the Click reaction on the membrane

### Cell culture and metabolic labelling of de novo synthesized RNA

A human medulloblastoma cell line (DAOY ATCC HTB-186, ref.<sup>32</sup>) was cultured in RPMI 1640 medium containing 10 % FBS, 1 % antibiotic-antimycotic, 1 % L-alanyl-L-glutamine and 50 nM  $\beta$ -mercaptoethanol. Cells were cultured at 37 °C in an atmosphere with 5 % CO<sub>2</sub>. Cells were seeded in six-well plates at a density of  $5 \cdot 10^5$  cells per well. 5-EU was added to the cells at a final concentration of 1 mM and metabolic labelling was performed at intervals of 30 min, 2 h, 4 h and 6 h. The experiment was performed in biological triplicates.

### RNA isolation

Cells were washed in PBS and lysed by adding 1 mL of RNA Blue reagent (Top-Bio) per well. Total RNA was then isolated according to the manufacturer's manual. RNA pellets were dissolved in diethyl pyrocarbonate-treated water. RNA concentration and purity were checked with a Nanophotometer Pearl spectrometer (Implen).

### Electrophoresis and blotting

RNA was separated on a 1.2 % agarose denaturing gel buffered with MOPS (3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid) containing 6–7 % formaldehyde and visualized using the GelRed dye (Biotium). Capillary blotting of RNA was then performed on PVDF or nylon membrane (Cytiva) using 20 $\times$  SSC buffer (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0). The membrane was fixed with UV light (120 mJ cm<sup>-2</sup>) and washed with 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0.

### Click-on-membrane

Membranes were incubated in Click reaction mixture containing 10  $\mu$ M picolyl-biotin-azide for 1 h in the dark at room temperature. The membranes were then blocked (Roti-Block) and labelled with a triple antibody system (goat anti-biotin antibody, AP-conjugated horse anti-goat antibody, AP-conjugated rabbit anti-goat antibody). Chemiluminescence was detected using the CDP-Star kit (Novex); a development buffer containing 330  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> BCIP and 165  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> NBT (both Applichem) was used for colorimetric signal induction.

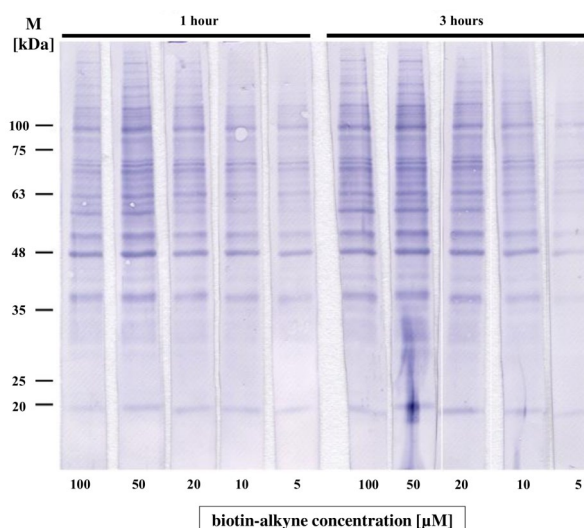
## Results and discussion

The standard BONCAT procedure is based on the analysis of proteins that undergo the Click reaction in solution. This approach is widely used<sup>9,10,13,33</sup>, however, the Click reaction performed in this way may not always lead to clear results. One of the disadvantages of the in-solution reaction is the need to add an excess of the low molecular weight reagent, which should be removed from the sample before further analysis, as its presence may lead to false positive or biased results. This is an additional step that

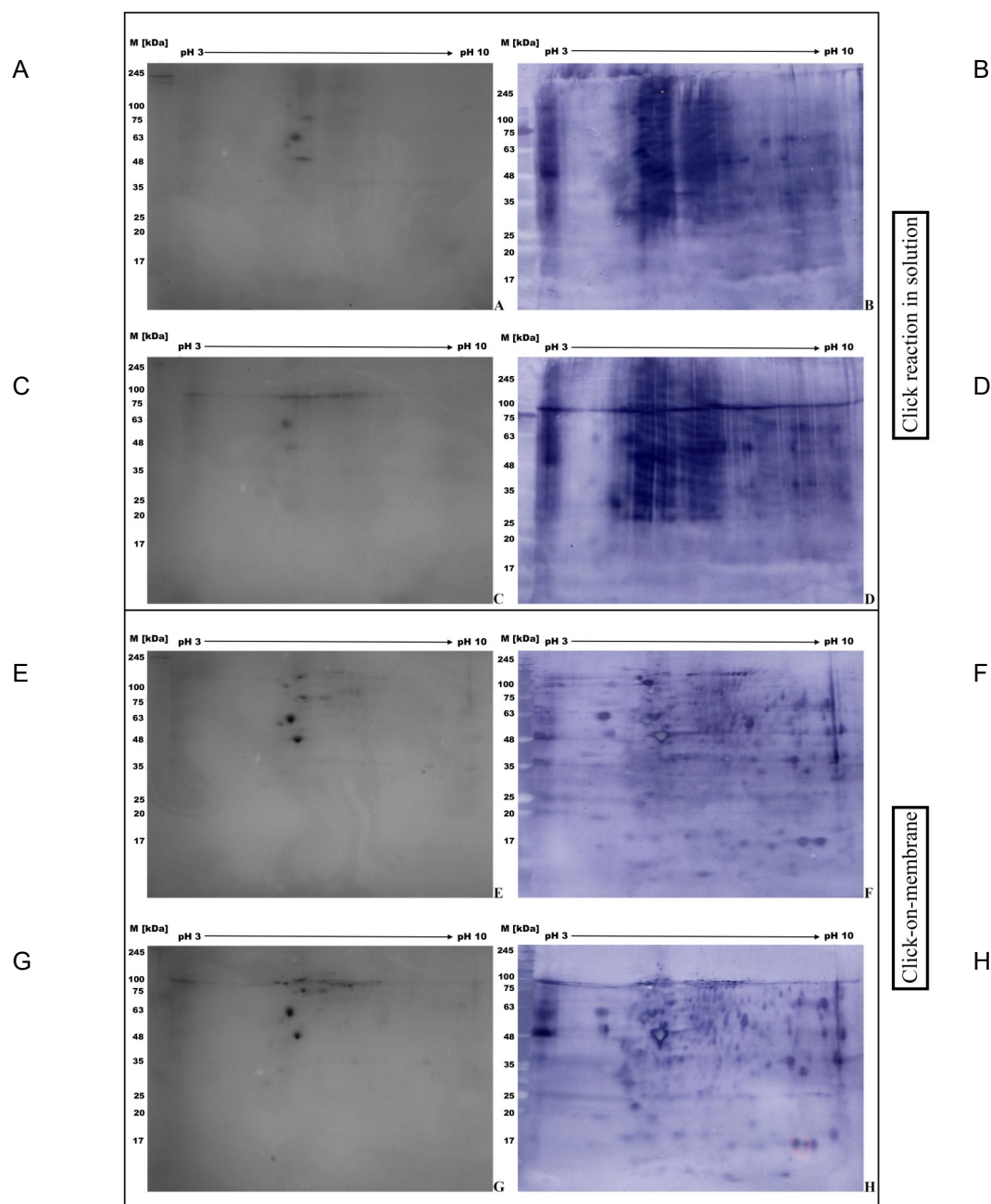
may affect the result. One possibility is precipitation<sup>25</sup> but this can lead in some cases to the formation of insoluble protein aggregates causing insufficient protein focusing during IEF<sup>34</sup>. Therefore, we investigated the possibility of performing the Click reaction on the membrane after electroblotting.

The first step was to optimize the amount of biotin-alkyne used for the Click reaction performed on the membrane. The click reaction in AHA-containing samples was performed for 1 or 3 h with different concentrations of biotin-alkyne (100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M). A decrease in biotin-alkyne concentration did not significantly affect the signal intensity, nor was it necessary to proceed to an extension of the incubation time (fig. 1). All subsequent experiments using the Click on the membrane method were carried out in a reaction mixture containing 10  $\mu$ M biotin-alkyne for 1 h.

AHA-labelled proteins after Click reaction in solution were analysed by 2D electrophoresis and western blot. The gel and membrane showed insufficient separation of proteins throughout the gel (fig. 2A, B). The use of HPG instead of AHA had no beneficial effect (fig. 2C, D). Biotin-labelled proteins were visualized using a three-step detection (fig. 2B, D). 2D electrophoresis is a method highly sensitive to incomplete protein focusing, which manifests as protein streaks across the entire range of separation in one direction or the other and incorrect protein profiles instead of focused protein spots (ideally in the form of dots). Attempts to improve the results and remove protein aggregates by ultrafiltration, repeated centrifugation, precipitation, or the use of deionized urea<sup>28</sup> have also failed to



**Fig. 1. Optimization of the detection of AHA-labelled proteins by the Click-on-membrane method;** 1  $\mu$ g of protein was separated on a 10 % acrylamide gel and blotted PVDF membrane. Click reactions were performed with the indicated concentrations of biotin-alkyne for 1 or 3 h. The newly synthesized proteins were detected by a three-step detection using AP-conjugated streptavidin and biotinylated anti-streptavidin antibodies followed by chromogenic detection



**Fig. 2. Comparison of 2D electrophoretic profiles and detection of AHA- or HPG-containing proteins labelled by Click reaction in solution or Click-on-membrane approach;** 50  $\mu\text{g}$  of proteins after the Click reaction in solution (A-D) or before the Click reaction (E-H) were separated by IEF followed by SDS-PAGE. The newly formed proteins in A, B, E, and F were labelled with AHA, and the proteins in C, D, G, and H were labelled with HPG. The separated proteins were transferred to PVDF membrane and the gels were stained by the Blue Silver method (A, C, E and G). Click reactions on the membrane were performed on the blotted proteins in F, H. Membranes (B, D, F and H) were blocked and newly synthesized proteins were detected by a three-step detection with streptavidin-AP and biotinylated anti-streptavidin antibodies followed by chromogenic detection

produce any satisfactory improvement (data not shown). Difficulties in the separation of bioorthogonally labelled proteins (especially small proteins and peptides) in the gel have been documented in other publications<sup>18</sup>.

Therefore, we proceeded to perform the Click reaction on the membrane instead of the Click reaction in solution prior to electrophoretic separation and electroblotting. After cell lysis, the AHA-containing protein samples were

processed in the same manner as standard samples for analysis by 2D electrophoresis, and the Click reaction was performed on blotted proteins on the membrane surface (fig. 2F). Compared with the protein profile after the Click reaction in solution (fig. 2B), the protein spots were sharper and more focused, and the presence of poorly separated proteins in the form of streaks was significantly reduced. Similar results were observed using HPG (fig. 2D, H). One reason for these observed differences may be the change in pI of the modified proteins after biotin-alkyne binding<sup>35</sup> or the formation of protein aggregates<sup>34</sup>. An analogous effect was observed for both 1D SDS-PAGE and 2D electrophoresis (unpublished data).

#### Detection of newly synthesized RNA by Click-on-membrane

After the successful use of the Click reaction on the membrane for the analysis of AHA or HPG labelled proteins, we verified the suitability of this method for other bioorthogonally labelled biomolecules. As an example, we tested the detection of 5-EU labelled RNA. DAOY cells were incubated with 1 mM 5-EU for 30 min, 2, 4, and 6 h. The purity and integrity of the isolated RNA were verified by spectrophotometric and electrophoretic methods. Staining of RNA with GelRed reagent in denatured agarose gel demonstrates its high integrity (fig. 3A). Incorporated 5-EU was detected by the Click-on-membrane reaction with 10 nM picolyl-biotin-azide followed by a three-step detection of biotin using antibodies. 5-EU incorporated in nascent RNA was visualized using chemiluminescence (fig. 3B) and chromogenic substrate (fig. 3C). Figure 3B shows that the intervals (except the 30 min interval) are sufficient to incorporate detectable amounts of 5-EU in the case of 45S pre-rRNA. A nonspecific signal originating from the GelRed fluorescent dye in the 18S and 28S rRNA region is observable on the membranes for all samples (fig. 3B, C).

Metabolic labelling of *de novo* synthesized RNA is widely used, often using radioactive nucleosides with incorporated radioisotopes of tritium (<sup>3</sup>H) or phosphorus (<sup>32</sup>P) followed by electrophoretic separation and transfer of the separated nucleic acids to a nylon or nitrocellulose membrane and detection of the newly formed RNA by autoradiography<sup>36,37</sup>. Click chemistry serves as a non-radioactive alternative. Fluorescence *in situ* detection of newly formed RNA with incorporated 5-EU has been described<sup>38</sup> and widely used<sup>39,40</sup>, whereas detection of *de novo* synthesized RNA on membrane by Click reaction has not been described so far.

In this work, we have shown that the Click-on-membrane method can be successfully applied to detection of 5-EU-containing RNA, and is similarly applicable to the detection of other bioorthogonally labelled biomolecules. However, the procedure is only suitable when using a more durable PVDF membrane, as a weak signal and high background were observed when using a nylon membrane (data not shown).

## Conclusion

Bioorthogonal chemistry is one way how to modify various biomolecules in their native environment. The combination of bioorthogonal and Click chemistry is widely used to label and analyse newly synthesized proteins,

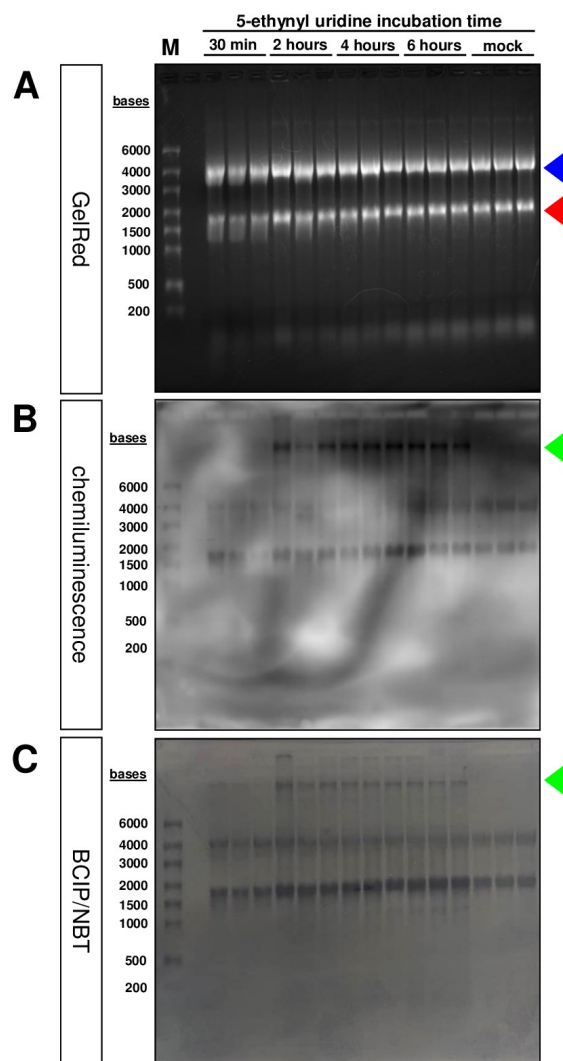


Fig. 3. **Detection of newly synthesized RNA by Click-on-membrane method;** Total RNA containing 5-EU was separated in a 1.2 % denaturing agarose gel and visualized by the GelRed dye (A). RiboRuler High Range RNA ladder (M) was used as a size standard. Arrows point to 28SrRNA (blue) and 18SrRNA (red). (B) RNA molecules were subsequently transferred from the gel to a PVDF membrane, fixed with UV light and labelled using the Click-on-membrane approach. RNA synthesised *de novo* was detected by triple labelling using streptavidin-AP and biotinylated anti-streptavidin followed by chemiluminescence detection. 45S pre-rRNA is indicated by the green arrow. (C) The membrane was further used for colorimetric signal detection using BCIP/NBT. Non-specific signal caused by the fluorescent dye Gel Red is visible in the 18S and 28SrRNA region in (B) and (C)

but the commonly used sample processing procedure often results in a significant reduction in the quality of the protein profile during 2D electrophoresis.

Our described combination of bioorthogonal chemistry with the Click-on-membrane method is applicable for the detection of newly synthesised proteins and RNA that are bioorthogonally labelled, separated by electrophoresis and transferred to a PVDF membrane.

## REFERENCES

- Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **40**, 2004 (2001).
- Huisgen R., Anneser E., Mack W.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **73**, 656 (1961).
- Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **41**, 2596 (2002).
- Tornøe C. W., Christensen C., Meldal M.: *J. Org. Chem.* **67**, 3057 (2002).
- Thirumurugan P., Matosiuk D., Jozwiak K.: *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **113**, 4905 (2013).
- Sanchez-Sanchez A., Perez-Baena I., Pomposo J. A.: *Molecules* **18**, 3339 (2013).
- Martens S., Holloway J. O., Du Prez F. E.: *Macromol. Rapid Commun.* **38**, (2017).
- Sletten E. M., Bertozzi C. R.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **48**, 6974 (2009).
- Dieterich D. C., Link A. J., Graumann J., Tirrell D. A., Schuman E. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9482 (2006).
- Hinz F. I., Dieterich D. C., Tirrell D. A., Schuman E. M.: *ACS. Chem. Neurosci.* **3**, 40 (2012).
- Thinon E., Fernandez J. P., Molina H., Hang H. C.: *J. Proteome Res.* **17**, 1907 (2018).
- Purba T. S., Marsh J., Ng'andu K., Kurinna S., Paus R.: *BioTechniques* **65**, 97 (2018).
- Hatzenpichler R., Scheller S., Tavormina P. L., Babin B. M., Tirrell D. A., Orphan V. J.: *Environ. Microbiol.* **16**, 2568 (2014).
- Kiick K. L., Saxon E., Tirrell D. A., Bertozzi C. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 19 (2002).
- Prescher J. A., Bertozzi C. R.: *Nat. Chem. Biol.* **1**, 13 (2005).
- Tsai C. S., Yen H. Y., Lin M. I., Tsai T. I., Wang S. Y., Huang W. I., Hsu T. L., Cheng Y. S., Fang J. M., Wong C. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 2466 (2013).
- Vohidov F., Coughlin J. M., Ball Z. T.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **54**, 4587 (2015).
- Ohata J., Vohidov F., Ball Z. T.: *Mol. BioSyst.* **11**, 2846 (2015).
- Marter K., Kobler O., Erdmann I., Soleimanpour E., Landgraf P., Müller A., Abele J., Thomas U., Dieterich D. C.: *Bio-Protoc.* **9**, e3142 (2019).
- Yao J., Huang X., Ren J.: *Analyst (Cambridge, U. K.)* **146**, 478 (2021).
- Wessel D., Flügge U. I.: *Anal. Biochem.* **138**, 141 (1984).
- Liang V., Ullrich M., Lam H., Chew Y. L., Banister S., Song X., Zaw T., Kassiou M., Gotz J., Nicholas H. R.: *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3339 (2014).
- Bak-Jensen K. S., Laugesen S., Roepstorff P., Svensson B.: *Proteomics* **4**, 728 (2004).
- Vertommen A., Panis B., Swennen R., Carpentier S. C.: *Planta* **231**, 1113 (2010).
- Hurst C. H., Turnbull D., Plain F., Fuller W., Hemsley P. A.: *BioTechniques* **62**, 69 (2017).
- Presolski S. I., Hong V. P., Finn M. G.: *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **3**, 153 (2011).
- Folch J., Ascoli I., Lees M., Meath J. A., LeBaron F. N.: *J. Biol. Chem.* **191**, 833 (1951).
- Reed P. W., Densmore A., Bloch R. J.: *Electrophoresis* **33**, 1263 (2012).
- Laemmli U. K.: *Nature* **227**, 680 (1970).
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350 (1979).
- Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G. M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P. G.: *Electrophoresis* **25**, 1327 (2004).
- Jacobsen P. F., Jenkyn D. J., Papadimitriou J. M.: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**, 472 (1985).
- McClatchy D. B., Ma Y., Liu C., Stein B. D., Martinez-Bartolome S., Vasquez D., Hellberg K., Shaw R. J., Yates J. R., 3rd: *J. Proteome Res.* **14**, 4815 (2015).
- Freedman R. B., Clare Mills E. N., in book: *Techniques for the Analysis of Membrane Proteins* (Ragan C. I., Cherry R. J., ed.), p. 27. Springer, Dordrecht 1986.
- Osterman I. A., Ustinov A. V., Evdokimov D. V., Korshun V. A., Sergiev P. V., Serebryakova M. V., Demina I. A., Galyamina M. A., Govorun V. M., Dontsova O. A.: *Proteomics* **13**, 17 (2013).
- Kos M., Tollervy D.: *Mol. Cell* **37**, 809 (2010).
- Morello L. G., Hesling C., Coltri P. P., Castilho B. A., Rimokh R., Zanchin N. I.: *Nucleic Acids Res.* **39**, 648 (2011).
- Jao C. Y., Salic A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15779 (2008).
- Peltonen K., Colis L., Liu H., Trivedi R., Moubarek M. S., Moore H. M., Bai B., Rudek M. A., Bieberich C. J., Laiho M.: *Cancer Cell* **25**, 77 (2014).
- Gomes C., Smith S. C., Youssef M. N., Zheng J. J., Hagg T., Hetman M.: *J. Biol. Chem.* **286**, 4357 (2011).

## Abstract

Bioorthogonal chemistry provides one of the possibilities to modify various biomolecules in their native environment. The combination of Click chemistry with the BONCAT method (bioorthogonal non-canonical amino acid tagging) is widely used for tagging and analysis of newly synthesized proteins, which are clearly distinguishable from the pre-existing protein pool. However, the commonly used procedure results in low quality 2D electrophoretic profiles. We put a lot of effort into obtaining clear

results using a standard Click protocol, with a negligible effect. Here we describe a Click-on-membrane approach which we successfully used not only to monitor *de novo* protein synthesis but also to detect newly synthesized RNA.