

Marijana Krsnik-Rasol, Biljana Balen, Boris Maček, Dubravko
Pavoković

Elektroforetske tehnike istraživanja proteina

PMF
Biološki odsjek
Skripta za internu uporabu
2004./2005.

Osnovni principi elektroforeze

Pojmom elektroforeza označavamo gibanje čestica u električnom polju, a njihova pokretljivost ovisi o:

1. jakosti električnog polja
2. svojstvima čestica:
 - neto naboju
 - veličini
 - obliku
3. sredini u kojoj se čestice gibaju:
 - ionska jakost
 - viskoznost
 - temperatura

Elektroforetska pokretljivost (m - mobility) definira se kao udaljenost (d) koju čestica prijeđe u vremenu (t) pod djelovanjem gradijenta napona (E):

$$m = d / tE \quad \text{ili} \quad m = v / E$$

Većina čestica koje elektroforetski razdvajamo, pa tako i proteini, amfoterne su molekule. Najveći dio naboja proteina potječe od ionizacije karboksilnih i amino skupina.



Disocijacijske konstante (pK vrijednosti) ovih skupina razlikuju se, pa neto naboj molekula ovisi o pH vrijednosti sredine u kojoj se nalaze. Stoga će elektroforetska pokretljivost također ovisiti o pH . U koliko je pH vrijednost pufera u kojem izvodimo elektroforezu jednaka pI vrijednosti proteina (to je onaj pH na kojem je količina $+i$ - naboja na proteinskoj molekuli izjednačena, pa čitava molekula nije nabijena), on neće migrirati u električnom polju. Pri pH vrijednostima nižim od njegove pI protein će putovati prema katodi, dok će pri pH višem od njegove pI putovati prema anodi. Većina puferskih sistema prilagođena je izvođenju elektroforeze na 25°C , a održavanje stalne temperature važno je iz dva razloga:

1. porast temperature dovodi do difuzije razdvojenih proteinskih vrpca,
2. povišena temperatura može dovesti do gubitka biološke aktivnosti proteina zbog denaturacije.

Čak i kod SDS elektroforeze, kada razdvajamo denaturirane proteine, potrebno je temperaturu održavati konstantnom zbog tzv. "smiling" efekta (na rubovima gela uzorci putuju sporije nego u sredini, gdje je zagrijavanje jače). Problem održavanja temperature povezan je s ionskom jakošću puferskog sustava i primjerenom snagom električne struje.

Pokretljivost nabijene čestice obrnuto je proporcionalna kvadratnom korjenu ionske jakosti. Slabija ionska jakost dozvoljava veću pokretljivost, dok jača ionska jakost

daje oštrije razdvojene zone, ali se tada razvija više topline, što pojačava difuziju i dovodi do pada električnog otpora. Ako je dovod struje previsok, dolazi do pretjeranog zagrijavanja ($P = E \times I$ odnosno $P = I^2 \times R$, gdje je snaga P , kao mjera nastale topline, produkt napona i jakosti struje), što opet dovodi do denaturacije proteina.

Iz prethodno opisanog proizlazi da je izbor pufera bitan, jer o njemu ovisi i snaga električne struje koja se može primijeniti na sistem. Potrebno je imati izvor struje (power supply) kojim je moguće jedan od parametara struje (napon, jakost, snagu) održavati konstantnim.

Osnovna ideja elektroforeze je jednostavna, no treba uzeti u obzir veliki broj čimbenika koji djeluju na put neke nabijene molekule ili iona kroz određeni medij. Njih možemo iskoristiti kao izvor dodatnih informacija; npr. kad pokretljivost ne bi ovisila o veličini molekule, bilo bi nemoguće razdvojiti velike od malih ako su im naboji približno jednaki.

Kao analitička metoda, elektroforeza je jednostavna, brza i vrlo osjetljiva. U kombinaciji s drugim tehnikama molekularne biologije, postala je jedna od najčešće primijenjivanih metoda.

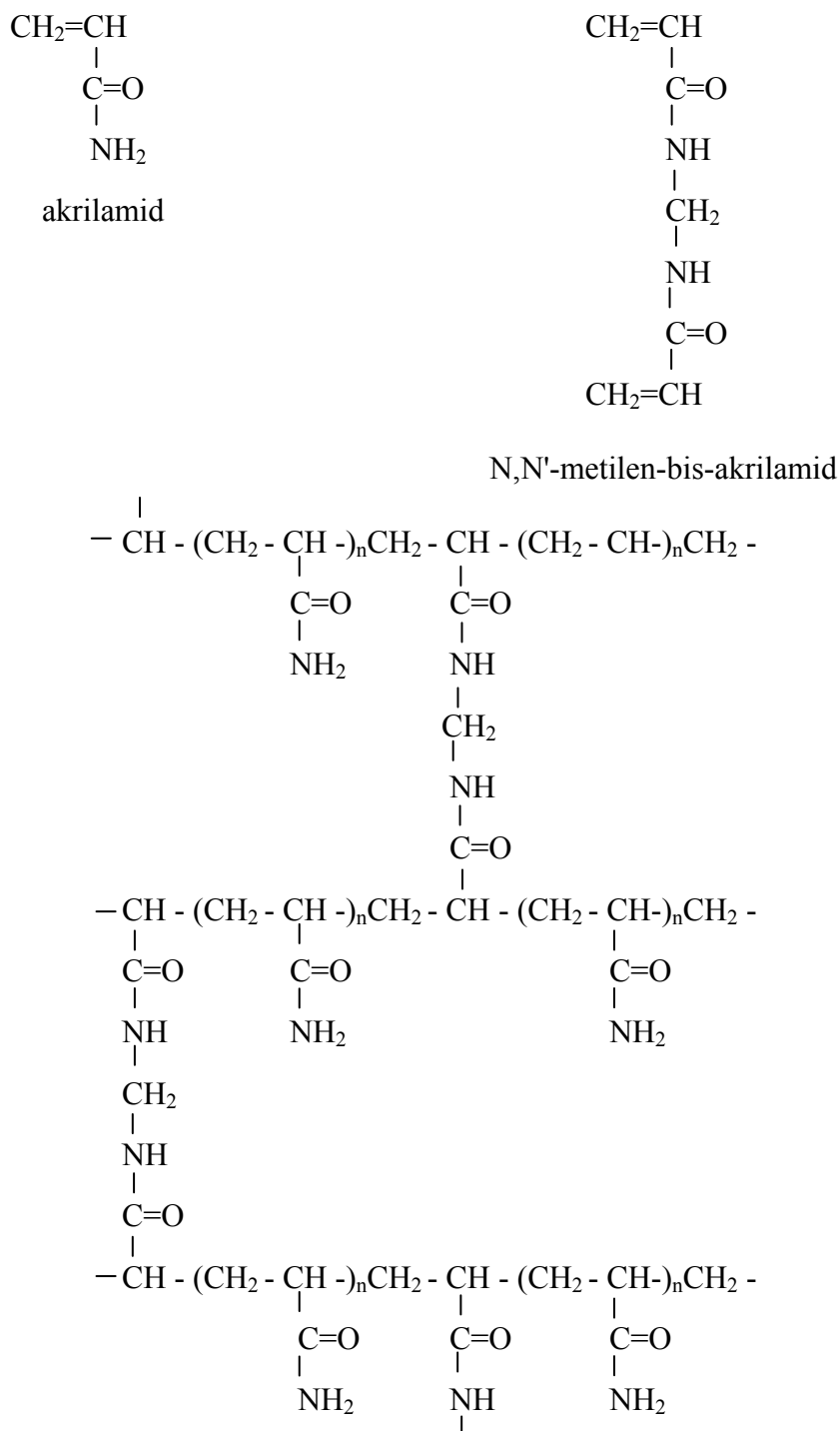
Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (PAGE)

Elektroforetska pokretljivost proteina ovisi o gustoći njihovog naboja, tj. o omjeru naboja i mase. Što je ovaj omjer viši, pokretljivost je veća. Primijeni li se električno polje na otopinu proteina, različite će se molekule, ovisno o gustoći svojeg naboja, gibati različitim brzinama prema anodi ili katodi. Ukoliko je uzorak na početku prisutan kao vrlo uska zona, proteini različite pokretljivosti putovat će kao zasebne zone i razdvojit će se. Ovakav pristup poznat je kao **zonalana elektroforeza**.

Elektroforetski razdvojene čestice u slobodnoj se tekućini, zbog difuzije, opet izmiješaju čim prestane djelovanje električnog polja. Stoga se koriste nosači (supporting matrix) koji omogućuju da razdvojene komponente ostanu u oštro odvojenim zonama. Najčešće rabljeni nosači su papir, škrob, celuloza acetat, agaroz i akrilamid. Bez obzira koji koristimo, važno je da bude inertan, čime se sprječava pojava elektroosmoze koja smanjuje kvalitetu razdvojenosti pruga. Agarozni gelovi najviše se primjenjuju u analizi nukleinskih kiselina, no često se upotrebljavaju i za izoelektrično fokusiranje proteina.

Poliakrilamidni gel nastaje vinilnom polimerizacijom monomera akrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) u duge lance poliakrilamida, te njihovim unakrsnim povezivanjem (cross linking) ugradnjom odgovarajućeg ko-monomera N, N'-metilen-bis-akrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$).

Reakcija polimerizacije katalizirana je kemijski dodatkom amonij persulfata i TEMED-a (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin), ili fotokemijski, dodatkom riboflavina i TEMED-a. U polimerizacijskoj reakciji nastaju lanci poliakrilamida u koje se u malom postotku ugrađuju molekule Bis-a koje onda reagiraju s grupama drugih lanaca, te tvore trodimenzionalnu mrežu.



Slika 1: Struktura poliakrilamidnog gela

Koncentracija akrilamida određuje prosječnu dužinu pojedinih lanaca akrilamida, dok koncentracija Bis-a određuje učestalost unakrsnih veza među lancima. Obje komponente su važne, jer određuju fizikalna svojstva gela kao što su gustoća, elastičnost, mehanička čvrstoća i veličina pora.

Vrlo važno svojstvo akrilamida je njegova čistoća. Dugotrajnim stajanjem dolazi do nastajanja degradacijskih produkata (akrilna kiselina, poliakrilna kiselina, amonijak itd.) koji su štetni u većini elektroforetskih tehnika, a naročito pri izoelektričnom

fokusiranju. Njih se relativno lako može ukloniti miješanjem sa zrcima odgovarajućih ionskih izmjenjivača (npr. Amberlite MB-1), koja se nakon najmanje sat vremena lako uklone filtracijom.

Polimerizaciju akrilamida sprječava otopljeni kisik, pa je smjesu otopina za gel potrebno dobro deaerirati pomoću vakuum sisaljke. Optimalna temperatura za polimerizaciju je oko 25°C i do reakcije dolazi nakon nekoliko minuta. No, potrebno je gel ostaviti barem sat vremena (ili preko noći) kako bi se u potpunosti polimerizirao prije upotrebe.

Veličina pora u gelu ovisi o ukupnoj koncentraciji mješavine akrilamida i bisakrilamida, ali i o samoj koncentraciji sredstva za unakrsno povezivanje (tj. bisakrilamida). Sastav gela definiran je s dva parametra, %T i %C, tj.

%T = akrilamid monomer + bisakrilamid kao %(w/v)

%C = udio (maseni) bisakrilamida u ukupnom monomeru

Veličina pora poliakrilamidnog gela može se progresivno povećavati smanjenjem %T pri konstantnom %C, no vrlo razrijeđeni gelovi (< 2,5%T) mehanički su nestabilni, pa je maksimalna veličina pora oko 80 nm, što omogućava razdvajanje proteina vrlo velikih molekularnih masa. Približan odnos koncentracije gela i veličine proteina koji se optimalno razdvajaju dan je u sljedećoj tablici:

%T	Molekularna masa (kDa)
3-5	100
5-12	20-150
10-15	10-80
>15	<15

Elektroforeza u cjevčicama

Ranije su se za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu koristile cilindrične cjevčice, promjera 3-5 mm i duljine 5-15 cm. Zbog reproducibilnosti je jako bitno da svi gelovi budu iste dužine.

Premda je ova tehnika istisnuta "pločastim" gelovima, još uvijek se koristi u specifičnim slučajevima, primjerice kao prva dimenzija u dvodimenzionalnoj elektroforezi, ili pri izolaciji pojedinih proteina, itd.

Elektroforeza na pločama

Plosnati gelovi na pločama najčešće se koriste, jer omogućavaju istodobnu analizu većeg broja uzoraka na istom gelu, pod jednakim uvjetima, čime se povećava reproducibilnost i usporedivost dobivenih elektroforetskih uzoraka.

Gelovi se izlijevaju u odgovarajućim "kasetama", u najjednostavnijem slučaju između dviju staklenih ploča odvojenih tankim razmaknicama, čija debljina određuje debljinu gela i najčešće je 0,5-1,5 mm. Za preparativne svrhe mogu se koristiti gelovi debljine do 6 mm. Ploče i razmaknice moraju se na odgovarajući način učvrstiti kako bi se spriječilo curenje otopine. Pločasti gelovi mogu biti vertikalni i horizontalni.

Vertikalna gel-elektroforeza jedna je od najraširenijih i provodi se u gelovima dimenzija oko 14×16 cm, no postoje i mini izvedbe s gelovima duljine oko 7 cm. Glavna im je prednost kratko trajanje elektroforeze (45 minuta, dok je za velike gelove potrebno dulje vrijeme).

Horizontalna gel-elektroforeza više se primjenjuje u analizi nukleinskih kiselina, a u radu s proteinima upotrebljava se pri izoelektričnom fokusiranju, gdje je korisno primijeniti veliku jakost polja i ultratanke gelove.

S obzirom na koncentraciju poliakrilamida gelovi mogu biti homogeni ili s gradijentom. Ovisno o veličini proteina koje želimo razdvojiti odabire se veličina pora, tj. koncentracija gela. Homogeni gelovi uglavnom daju zadovoljavajuće razdvajanje, no ako na istom gelu želimo istovremeno razdvojiti vrlo velike i male proteine, preporučljivo je primijenjivati koncentracijski gradijent poliakrilamida. Gelovi s gradijentom poliakrilamida nezamjenjivi su i pri analizi izoenzima.

Elektroforeza u nativnim uvjetima

Elektroforeza u nativnim uvjetima primjenjuje se kada je potrebno sačuvati interakcije među proteinskim podjedinicama i njihovu nativnu konformaciju, što omogućava analizu biološke aktivnosti proteina (npr. aktivnost enzima, vezanje antitijela, aktivnost receptora). Nažalost, pogodna je samo za one proteine koji su topivi i koji se neće istaložiti ili agregirati tijekom elektroforeze.

Kontinuirana zonalna elektroforeza

Najjednostavnija PAGE provodi se u gelu jedinstvene koncentracije poliakrilamida u kombinaciji s homogenim puferskim sustavom.

Izbor svojstava pufera koji se koristi za elektroforezu vrlo je važan. Elektroforeza proteina može se provesti u rasponu pH od 2 do 11, no deaminacija proteina i hidrolitičke reakcije česte su pri ekstremnim pH vrijednostima. Osim toga, treba voditi računa o svojstvima proteina koje analiziramo; mnogi proteini su skloni precipitiranju pri pH vrijednostima bliskim njihovoj izoelektričnoj točki pa takve uvijete valja izbjegavati, bitan je i pH pri kojem proteini zadržavaju svoju biološku aktivnost, itd.

Kako većina proteina ima pI u rasponu pH 4-7, najčešće korišteni puferski sustavi su blago alkalni (pH 8-9), pa je većina proteina pod tim uvjetima negativno nabijena i tijekom elektroforeze migrira prema anodi. Treba istaknuti da će u ovakvom sustavu eventualno prisutni bazični proteini putovati u suprotnom smjeru i izaći iz gela.

Prednost ove tehnike je u jednostavnosti i brzini izvedbe, no neprikladna je za razrijeđene uzorke jer ne postoji koncentracijski učinak na početku razdvajanja pa se dobiju široke pruge u elektroforetskoj slici.

Višefazni puferski sustav

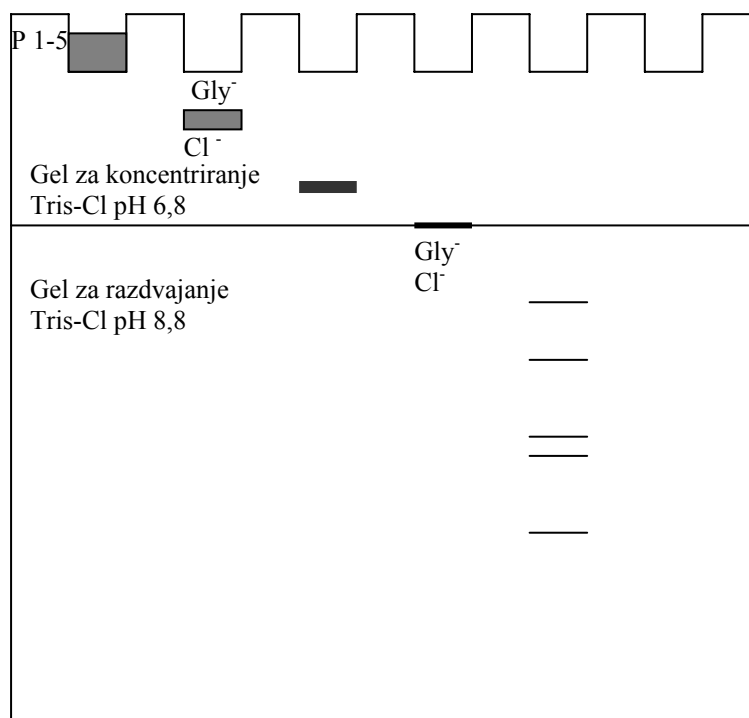
Popularnost ovih tehnika zasnovana je na mogućnosti koncentriranja proteina u uzorku u vrlo usku startnu zonu, što omogućuje razdvajanje proteina u oštrem pruge i bolju moć razlučivanja. Pogodne su za analizu većih volumena razrijeđenih uzoraka,

no zbog koncentriranja može doći do agregacije i stvaranja ireverzibilnih interakcija među proteinima. Treba paziti da različiti uvjeti i vrijednost pH tijekom koncentriranja i razdvajanja znatnije ne naruše kemijska, fizikalna i biološka svojstva proteina u uzorku.

Četiri su važne osobine diskontinuiranih puferskih sistema:

1. između zone s uzorkom i gela za razdvajanje nalazi se gel za koncentriranje s velikim porama (tj. gel s niskom koncentracijom poliakrilamida)
2. gel za razdvajanje sadrži višu koncentraciju poliakrilamida, prilagođenu rasponu veličina proteina koje razdvajamo
3. uzorak i oba gela sadrže kloridne ione, dok elektrodni puffer sadrži ione glicina
4. pH vrijednost gela za razdvajanje (pH 8,8) viša je od pH vrijednosti gela za koncentriranje (pH 6,9)

Kolrausch boundary - pri pH 6,9 stvara se gradijent napona između iona koji brzo putuju (Cl^-) i iona koji sporo putuju (Gly^-) čime se koncentriraju ioni srednje pokretljivosti (proteini). Pri prelasku u gel za razdvajanje gdje je pH 8,8 glicin potpuno disocira i njegova pokretljivost gotovo doseže pokretljivost kloridnih iona, što na granici između dva gela dodatno sabije proteine u usku startnu traku. Smanjenje veličine pora u gelu dovodi do razdvajanja proteinskih pruga, ovisno o njihovoj molekularnoj masi.



Slika 2: Koncentriranje proteina u usku startnu zonu u gelu za koncentriranje i pri ulasku u gel za razdvajanje.

Određivanje molekularnih masa nativnih proteina - Ferguson plot

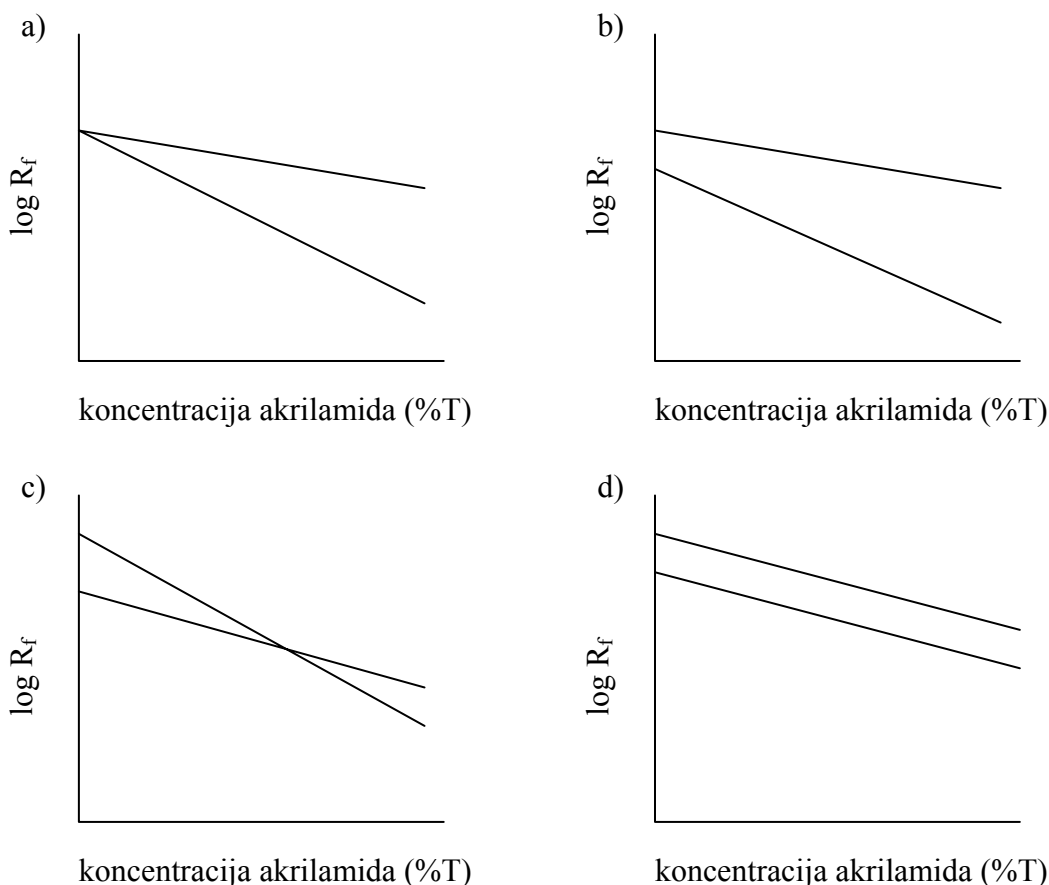
Nativni se proteini razdvajaju na osnovu veličine i naboja.

Postoji linearna ovisnost između koncentracije gela (%T) i logaritma relativne pokretljivosti (R_f):

$$\log R_f = \log Y_0 - K_R T$$

Relativna pokretljivost definirana je kao pokretljivost određenog proteina u odnosu na frontu pufera (određuje se pokretljivošću niskomolekularne negativno nabijene boje, npr. Bromphenol Blue, koja putuje zajedno s puferom). Stoga je R_f omjer udaljenosti koju prijeđe protein i udaljenosti koju prijeđe boja. Y_0 je pokretljivost pri 0%T, tj. ona pokretljivost koju bi proteinska molekula imala u otopini. K_R je retardacijski koeficijent. Postoji linearan odnos između retardacijskog koeficijenta i molekularne mase nativnih proteina.

Serija nativnih proteina čije su molekularne mase određene drugim metodama može poslužiti za konstrukciju dijagrama s odnosom K_R i molekularnih masa. Obzirom da retardacijski koeficijenti ovise o velikom broju čimbenika, pri provođenju Fergusonove analize uvjete je potrebno održavati što konstantnijima. Problemi pri mjerenjima mase mogu proizaći iz eventualne prisutnosti ugljikohidrata, lipida ili prostetičkih skupina u analiziranom proteinu.



Slika 3. Primjeri Fergusonovih grafova: a) dvije molekule razlikuju se po veličini ali ne i po neto naboju, b) manja molekula ima veći neto naboj i veću pokretljivost u otopini, c) veća molekula ima i veći neto naboj, d) dvije se molekule razlikuju u naboju ali imaju jednaku molekularnu masu.

Elektroforeza u prisutnosti aditiva

Elektroforeza u nativnim uvjetima pogodna je za analizu topljivih proteina, no problemi nastaju kada su proteini u uzorku netopljivi ili podložni formiranju multimolekularnih kompleksa i agregaciji u uvjetima koji se koriste za razdvajanje. U takvim se okolnostima dobro elektroforetsko razdvajanje može postići samo uz dodatak odgovarajućih aditiva koji će povećati topljivost proteina i smanjiti agregaciju.

Agensi za razaranje disulfidnih mostova

Disulfidne veze između polipeptidnih lanaca često su uključene u formiranje proteinskih agregata. Osim toga, imaju značajnu ulogu u stabilizaciji proteina sastavljenih od više podjedinica. Disulfidni mostovi mogu se reducirati dodatkom merkaptotetanolu ili ditionitrolu (DTT) uzorcima.

Urea

Urea se koristi kao aditiv koji povećava topljivost proteina i sprječava agregaciju. Proteini se progresivno razmataju i denaturiraju kada su izloženi rastućim koncentracijama uree. Stoga se niske koncentracije uree koriste kada je proteine potrebno zadržati u nativnom stanju, a visoke koncentracije (najčešće 8 M ili više) služe za denaturaciju. Urea se dodaje u uzorke i gelove, a nije ju potrebno dodavati i u puffer.

Važno je napomenuti da se urea raspada, naročito pri alkalnim pH vrijednostima, formirajući cijanatne ione koji mogu reagirati s aminogrupama proteina. Ovaj proces karbamilacije rezultira promjenama naboja proteina, što može dovesti do poremećaja elektroforetskih svojstava. Formiranje cijanatnih iona ovisno je o temperaturi, pa je važno da se uzorci koji sadrže ureu ne zagrijavaju.

Detergenti

Dodavanje detergenta u uzorke i gel popularna je i vrlo efikasna metoda povećavanja topljivosti proteina koje želimo elektroforetski analizirati. Četiri su osnovne kategorije detergenata: neionski, amfoterni ili zwitterionski, anionski i kationski. Detergenti su najučinkovitiji u prevladavanju hidrofobnih interakcija uključenih u protein-lipid i protein-protein interakcije.

Pri odabiru odgovarajućeg detergenta važno je znati da li je potrebno sačuvati biološku aktivnost analiziranih proteina. Anionski i kationski detergenti imaju izrazite denaturacijske efekte, dok su neionski blagi i uglavnom ne djeluju denaturirajuće.

Neionski detergenti većinom su blagi i ne denaturiraju proteine. Drugo im je važno svojstvo da ne utječu na neto naboj, pa se razdvajanje proteina odvija ovisno o njihovom nativnom naboju i veličini. To ih čini kompatibilnima s važnom skupinom tehnika koje se koriste izoelektričnim fokusiranjem. Najčešće rabljeni neionski detergenti su na bazi polioksietilen etera (Triton X-100, Lubrol PX i WX itd.).

Zwitterionski detergenti smatraju se blažima od anionskih i kationskih i, poput neionskih, nemaju utjecaja na neto naboj proteina. CHAPS se pokazao vrlo efikasnim

u solubilizaciji membranskih proteina, a kompatibilan je i s gelovima koji sadrže visoke koncentracije uree, što ga čini pogodnom alternativom neionskim detergentima u izoelektričnoj dimenziji dvodimenzionalne elektroforeze.

Anionski detergentsi. Svakako najpopularniji u ovoj skupini je natrij dodecil sulfat (SDS), zahvaljujući svojoj sposobnosti da solubilizira, disocira i denaturira na podjedinice većinu oligomernih proteina. Uz to, SDS-polipeptidni kompleksi tijekom elektroforeze putuju prema anodi ovisno o molekularnoj masi pojedinih polipeptidnih lanaca. Uspješno se koriste i neki drugi anionski detergentsi, poput natrij deoksikolata (DOC).

Kationski detergentsi, poput cetiltriethylamonij bromida (CTAB), koriste se za analizu izrazito kiselih ili bazičnih proteina koji se ne mogu zadovoljavajuće razdvojiti SDS-PAGE elektroforezom. U ovom slučaju proteini migriraju prema katodi.

Slika 4. Strukture nekih detergenata: a) Lubrol PX; b) Triton X-100; c) Triton N-101; d) Ammonix LO; e) digitonin; f) oktil glukozid; g) CHAPS; h) Zwittergent 3-14; i) lizofosfatidilkolin; j) natrij kolat; k) natrij dodecil sulfat (SDS); l) natrij taurokolat; m) natrij deoksikolat; n) cetiltrimetilamonij bromid.

Natrij dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)

SDS-PAGE najšire je korištena elektroforetska tehnika za analizu proteina, prvenstveno zahvaljujući sposobnosti SDS-a da, u prisutnosti reagensa za razaranje disulfidnih veza, solubilizira, denaturira i disocira većinu proteina u pojedinačne polipeptidne lance.

Većina proteina može vezati 1,4g SDS / g proteina, maskirajući naboj polipeptidnih lanaca tako da neto naboj po jedinici mase bude približno konstantan. Elektroforetsko razdvajanje ovisi stoga samo o efektivnom promjeru molekule, koji odgovara relativnoj molekularnoj masi, a rezultat je isključivo efekta sita u gelu.

Koncentraciju poliakrilamida u gelu potrebno je prilagoditi rasponu molekularnih masa proteina koje želimo razdvojiti (veći proteini, manji %T i obrnuto).

Diskontinuirani puferski sistemi

Danas se za SDS-PAGE koriste gotovo isključivo diskontinuirani sustavi, zbog oštrijih pruga i veće moći razdvajanja u odnosu na kontinuirane sisteme.

Koncentriranje proteina odvija se na istom principu kao i kod nativne elektroforeze, no u ovom slučaju praktički svi proteini putuju jednakom brzinom i automatski se koncentriraju (zbog uniformne gustoće naboja).

Najčešće korišteni sistem je po Laemmliju, a zasniva se na Ornstein-Davisovom puferskom sistemu za elektroforezu nativnih proteina, uz dodatak 0,1% (w/v) SDS-a.

Priprema uzoraka

Uzorke je bitno tretirati na način koji osigurava optimalnu reakciju sa SDS-om, što se postiže zagrijavanjem uzorka u odgovarajućem puferu (koji sadrži SDS i merkaptioetanol) barem dvije minute na 100°C. Pri denaturaciji uzorci se moraju pomiješati s dostatnom količinom pufera, koja ovisi o koncentraciji proteina u uzorku. Pri nanošenju na gel važno je jažice ne pretrpati, ali i ne nanositi velike volumene razrijeđenih uzoraka. U načelu, za bojanje bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 nanosi se 20 - 60 µg proteina po jažici, a za bojenje srebrom, koje je osjetljivije, dovoljno je svega 5-15 µg proteina.

Ukoliko su uzorci previše razrijeđeni, potrebno ih je prije elektroforeze koncentrirati, što se može izvesti različitim metodama, poput liofilizacije, taloženja amonij sulfatom, dijalize nasuprot visokoj koncentraciji polietilen glikola, precipitacije acetonom ili triklor octenom kiselinom (TCA).

Određivanje molekularne mase pomoću SDS-PAGE

Kako proteini pri denaturaciji vežu SDS u približno konstantnom masenom odnosu rezultirajući SDS-proteinski kompleksi imaju ujednačenu gustoću naboja i tijekom elektroforeze migriraju na osnovu molekularnih masa. Utvrđeno je da je u takvim uvjetima grafički odnos $\log_{10} M_r$ i R_f vrijednosti (udaljenost koju prijeđe protein prema udaljenosti koju prijeđe boja) strogo linearan. Stoga se za kalibraciju gel sustava koristi set proteina poznatih molekularnih masa koji se razdvoji, a potom i vizualizira zajedno s analiziranim uzorcima. Za izradu kalibracijskog pravca izračunaju se R_f vrijednosti markera i na semilogaritamskoj skali ucrtaju u odnosu na molekularne mase. Nakon toga se R_f vrijednosti proteina u uzorcima koriste kako bi se iz kalibracijskog pravca očitala njihova molekularna masa.

Ograničenja SDS-PAGE

SDS-PAGE je prikladna metoda za određivanje molekularnih masa proteina koji vežu SDS u stalnom masenom odnosu. Proteini koji su konjugirani s neproteinskim dijelovima (npr. glikoproteini, lipoproteini i sl.) ne mogu biti saturirani SDS-om, što uzrokuje smanjenje omjera naboj/masa, a to dovodi do smanjene pokretljivosti, pa se čini da protein ima veću molekularnu masu od stvarne. U slučaju glikoproteina ovaj se problem može prevladati upotrebom Tris-borat-EDTA pufera umjesto Tris-glicinskog. Smatra se da nabijeni kompleksi borata i ugljikohidrata dovode do porasta negativnog neto naboja, čime se kompenzira smanjeno vezanje SDS-a, a to uvjetuje takovu gustoću naboja koja omogućava pokretljivost glikoproteina proporcionalnu njihovoj molekularnoj masi.

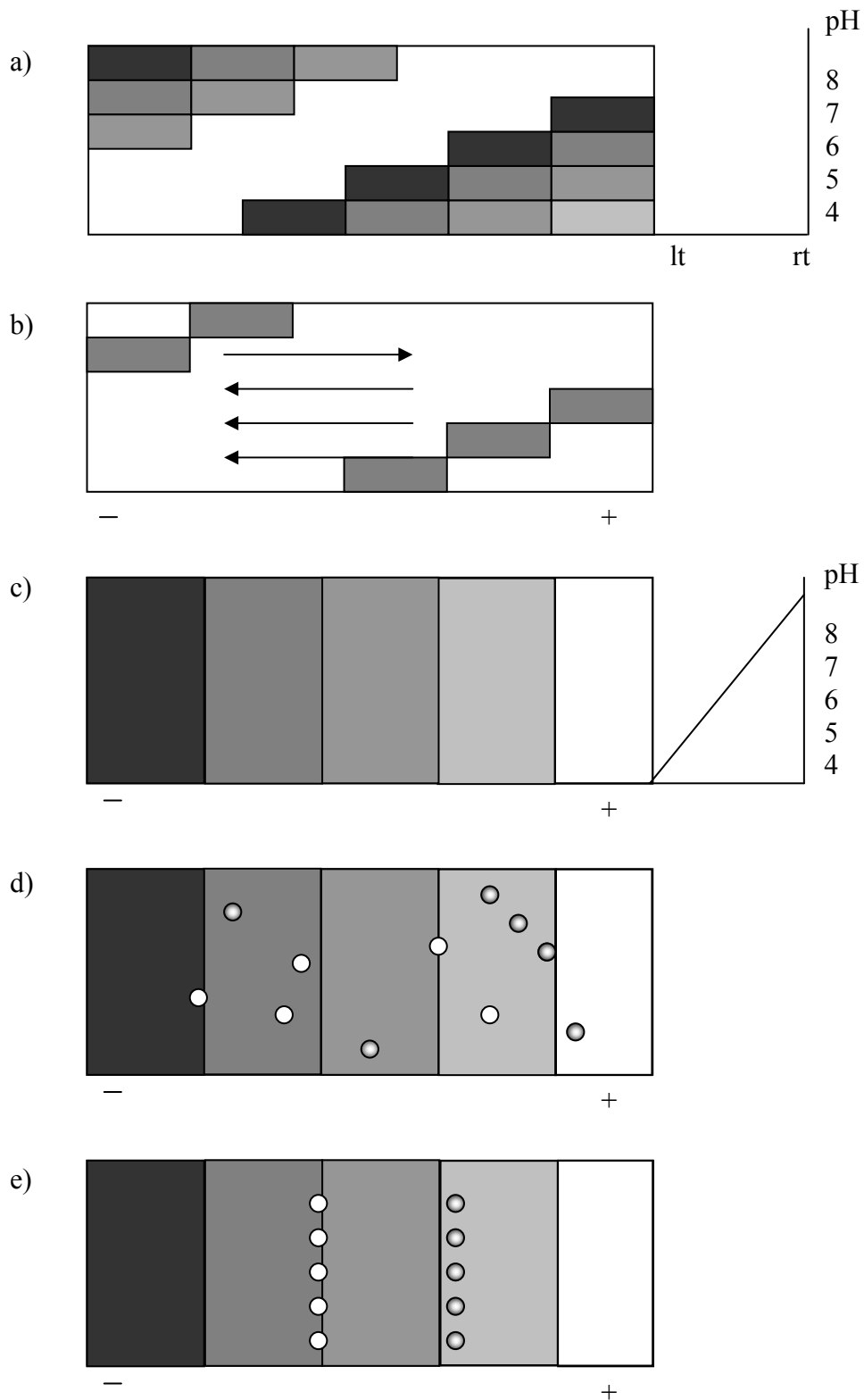
Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje (IEF) je metoda visoke moći razlučivanja u kojoj se proteini razdvajaju u prisutnosti kontinuiranog pH gradijenta. U takvim uvjetima, proteini migriraju zbog svojeg naboja dok ne dosegnu zonu s vrijednošću pH pri kojoj nemaju neto naboj (tj. svoju izoelektričnu točku pI). Proteini će, stoga, dostići ravnotežno stanje "nulte" migracije i koncentrirati se tj. fokusirati u uske zone.

IEF tehnikom moguće je razdvojiti komponente čije se pI vrijednosti razlikuju za 0,02 pH jedinice, a ako se koriste uski imobilizirani pH gradijenti ta je razlika svega 0,001 pH jedinicu.

IEF korištenjem sintetičkih amfolita

Najpopularniji način uspostavljanja gradijenta pH za izoelektrično fokusiranje je ugradnja niskomolekularnih amfoternih molekula u poliakrilamidni gel. Takve tvari imaju bliske pI vrijednosti i pokrivaju određeni raspon pH. Kada ne djeluje električno polje, amfoliti su nasumično raspoređeni u gelu. Primjenom električnog polja amfoliti počinju putovati prema jednoj od elektroda, ovisno o svojem naboju. Primjerice, najkiselije amfolitne molekule s najnižim pI imat će najnegativniji naboj i putovati prema anodi sve dok im neto naboj ne bude jednak nuli. Na tom se mjestu koncentriraju formirajući usku zonu. Na taj će način svaka amfolitna molekula migrirati do mjesta gdje joj je neto naboj nula, neovisno o početnoj poziciji. Kako svaki od amfolita ima visoki puferski kapacitet, pH okolnog medija jednak je pI vrijednosti svakog amfolita. Po završetku koncentriranja amfolita postiže se ravnotežno stanje i u gelu se uspostavlja kontinuirani gradijent pH. Kada se protein nanese na gel, pod uvjetom da je njegov pI unutar raspona kojeg prekrivaju amfoliti korišteni za uspostavu pH gradijenta, dolazi do njegove migracije do mjesta na kojem se pH podudara s njegovom pI vrijednošću. Za razliku od drugih elektroforetskih tehnika, pri izoelektričnom fokusiranju uzorak se može nanijeti bilo gdje na gelu jer će molekule s istom pI vrijednošću uvijek putovati na istu poziciju. Zato proteini postanu visokokoncentrirani u uskim zonama. Ako dođe do njihove difuzije ponovo će postati nabijeni pa će ih djelovanje električnog polja vratiti u zonu u kojoj im je neto naboj jednak nuli.



Shematski prikaz koji ilustrira osnovne principe izoelektričnog fokusiranja u poliakrilamidnom gelu, uz korištenje amfolita u rasponu pH 4-8. a) kada ne djeluje električno polje amfoliti su nasumično raspoređeni i pH je u cijelom gelu jednak. Različiti amfoliti označeni su kao \blacksquare pI=4, \blacksquare pI=5 itd. b) Kada se primijeni električno polje, svaki amfolit putuje do mjesta na kojem mu je neto naboj jednak nuli. Samo amfolit \blacksquare je prikazan. c) Kada amfolit dostigne svoju izoelektričnu točku uspostavlja se linearni gradijent pH duž gela. d) Proteinske molekule (\circ pI=5,5, \bullet pI=6,7) mogu se nanijeti na bilo koji dio gela. e) Svaki protein putuje do mjesta na kojem je pH vrijednost gradijenta jednaka njegovoj pI i tada protein više nema neto naboja te ostaje fokusiran u uskoj zoni.

Kako IEF razdvaja proteine na osnovu njihovog naboja, potrebno je u gelu izbjeći efekt sita. Zato se koriste gelovi s nižom koncentracijom poliakrilamida (3-5 %T). IEF se može provoditi u nativnim uvjetima, u gelovima kojima su dodani samo amfoliti (mogu se dodati i neionski ili zwitterionski detergentski kako bi poboljšali topljivost proteina). U denaturirajućim uvjetima IEF se izvodi uz dodatak uree u visokim koncentracijama.

S obzirom na kemijski sastav i način proizvodnje amfoliti mogu biti dobiveni reakcijom oligoamina s akrilnom kiselinom ili kopolimerizacijom amina, aminokiselina i dipeptida s epiklorohidrinom. Tako dobiveni amfoliti sadrže stotine različitih tipova molekula čije su pI vrijednosti jednoliko raspoređene i pokrivaju široki raspon pH. (npr. 3-11). Samo rijetki proteini imaju pI vrijednosti koje izlaze iz pH raspona 3.5-10, a za većinu proteina su između pH 4-6. IEF se može, ovisno o svojstvima proteina koje analiziramo, provoditi u gradijentima širokog, ali i vrlo uskog pH gradijenta, od npr. svega jedne pH jedinice.

Amfoliti se mogu nabaviti pod različitim komercijalnim nazivima, ovisno o proizvođaču (Pharmalyte, Ampholine, Servalyte, Biolyte, itd.).

Kako bi se kalibrirao pH gradijent u gelu mogu se koristiti standardni marker-proteini poznatih pI vrijednosti.

Dvodimenzionalna gel elektroforeza

Tehnike jednodimenzionalne elektroforeze na zadovoljavajući način mogu razdvojiti kompleksne uzorke na stotinjak diskretnih zona. No, broj različitih proteina u nekom uzorku može biti znatno veći - npr. svaki tip ljudskih stanica eksplicira oko 5 000 proteinskih gena, pa stoga moć razlučivanja jednodimenzionalnih tehnika nije ni približno dovoljna.

Drugo im je važno ograničenje da se proteini razdvajaju na osnovu samo jednog od svojih fizikalno-kemijskih svojstava (npr. veličina, naboj, hidrofobnost). Stoga diskretne pruge detektirane nakon elektroforeze ne moraju nužno predstavljati homogene proteine. Takve zone će sadržavati sve proteine u uzorku s istim svojstvima (naboj, pokretljivost, veličina).

Stoga je bilo potrebno razviti tehnike koje će omogućiti analizu vrlo kompleksnih uzoraka s i po nekoliko tisuća proteina i njihovo međusobno razlučivanje čak i kada imaju slična fizikalno-kemijska svojstva. Najbolji raspoloživi pristup ovom problemu je kombiniranje dvaju različitih jednodimenzionalnih elektroforetskih tehnika u dvodimenzionalni postupak. Metode je najbolje izabrati tako da razdvajaju proteine na osnovu različitih, neovisnih fizikalno-kemijskih svojstava. Tako odabrane metode, ako svaka može razdvojiti 100 diskretnih proteinskih zona, teoretski mogu razdvojiti i do 10 000 proteina, no to u praksi nije slučaj, iako je 2-D PAGE pogodna za analizu proteinske ekspresije u cijelim stanicama, pa čak i tkivima.

Najpopularnija metoda dvodimenzionalne elektroforeze je kombiniranje izoelektričnog fokusiranja u cilindričnim gelovima kao prve dimenzije s SDS-PAGE drugom dimenzijom. Time se proteini razdvajaju na osnovu dva različita svojstva - naboja i veličine. Gelovi za prvu dimenziju najčešće sadrže visoku koncentraciju uree i neki neionski detergent radi poboljšavanja topljivosti proteina.

Za 2-D elektroforezu bitno je proteine dobro otopiti i razoriti sve nekovalentno vezane proteinske komplekse i agregate u otopinu pojedinačnih polipeptida. U protivnom proteinski kompleksi rezultiraju pojavom zasebnih točaka uz smanjen intenzitet signala za pojedinačni peptid. Za većinu uzoraka dobra topljivost postiže se

korištenjem otopine koja sadrži 4% (w/v) NP-40 (ili nekog drugog neionskog detergenta, npr. TritonX-100), 9.5 M ureu, 1% (w/v) DTT i 2% (w/v) amfolita.

Prva dimenzija

Prva dimenzija 2-D PAGE razdvaja proteine na osnovu njihovog naboja izoelektričnim fokusiranjem u kapilarama. Ovisno o uzorcima razdvajanje može biti u širokom (pH 3-10) ili uskom (npr. pH 4.5-7) gradijentu pH. Promjer gela uglavnom je oko 1,5 mm, a koncentracija poliakrilamida 3-5 %T.

Druga dimenzija

Između dviju dimenzija obično je ekvilibracijski korak. Gelovi iz kapilara inkubiraju se nekoliko minuta na sobnoj temperaturi u 0.125 M Tris puferu pH 6,8 koji sadrži SDS, ili pak u puferu za denaturaciju kakav se inače koristi pri denaturaciji uzoraka za SDS-PAGE (sadrži SDS i β -merkaptotanol). Svrha ekvibracije je omogućiti proteinima u gelu da u potpunosti reagiraju sa SDS-om kako bi pravilno migrirali u drugoj dimenziji.

Za prelazak proteina iz jednog gela u drugi dobro prijanjanje gelova je ključno. Zato se najčešće prije elektroforeze IEF gel, naslonjen na površinu SDS gela tako da među njima nema mjehurića zraka, zalije agarozom. Za drugu se dimenziju u pravilu koristi diskontinuirani puferi sustav po Laemmliju, a gelovi mogu imati jedinstvenu koncentraciju poliakrilamida ili koncentracijski gradijent. Gel za koncentriranje može se izostaviti jer su u kapilari proteinske zone već koncentrirane.

Od velike je važnosti za reproducibilnost rezultata svaki korak u dvodimenzionalnoj elektroforezi izvesti pažljivo i pod kontroliranim i što je moguće konstantnijim uvjetima.

Dvodimenzionalna elektroforeza može se izvoditi u nativnim i denaturirajućim uvjetima.

Nativna 2-D PAGE ima ograničenu primjenu samo na lako topljive uzorke, ali joj je prednost mogućnost analize prirodnih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava proteina. Najčešće korištena tehnika zasniva se na kombinaciji IEF u nativnim uvjetima, kao prve dimenzije, i PAGE u odsutnosti uree i detergenata, kao druge dimenzije.

Metode detekcije

Fiksiranje

Po završetku elektroforeze gelovi se moraju fiksirati. Opisane su i metode za izravnu vizualizaciju nefiksiranih proteina, no one se koriste samo onda kada razdvojene komponente želimo izolirati iz gela za dalju analizu. Gelovi koji će se koristiti pri identifikaciji enzimske aktivnosti proteina ne smiju se prethodno fiksirati.

Za većinu vizualizacijskih tehnika neophodno je precipitirati i imobilizirati razdvojene proteine unutar gela i odstraniti sve neproteinske komponente koje bi mogle interferirati s bojenjem.

Najbolji fiksativ za većinu proteina je 20%-tna (w/v) trikloroetena kiselina (TCA). Vrlo su popularne i otopine koje sadrže metanol i octenu kiselinu, no valja napomenuti kako niskomolekularni i bazični proteini te glikoproteini mogu biti

neadekvatno fiksirani. Otopine formaldehida i glutaraldehida mogu se koristiti za povezivanje proteina s matriksom gela, no takav pristup nije u široj uporabi.

Bojanje

Bojanje bojom Coomassie Brilliant Blue

U početku su elektroforetske tehnike bile ograničene na detekciju obojenih proteina i onih koji apsorbiraju UV zračenje, a razvojem organskih boja koje mogu reagirati s proteinima počele su se koristiti Bromphenol blue i Amido black 10B.

No, najpopularnija i najčešća tehnika zasniva se na uporabi nepolarnih sulfatiranih Coomassie boja, razvijenih za bojanje vune. Uglavnom se koristi Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250, boja koja se u kiseloj sredini elektrostatskim silama veže za amino skupine proteina. Rabi se otopina 0.1% (w/v) CBB u metanolu, destiliranoj vodi i octenoj kiselini (9:9:2, v/v/v). Vrijeme potrebno za bojanje ovisi o debljini gela, a u prosjeku je oko 2 sata, nakon čega su i proteini i gel modri. Kako bi se vizualizirale proteinske pruge potrebno je odbojiti gel uz lagano miješanje u istoj otopini metanola i octene kiseline bez dodatka boje 24 sata, što se može ubrzati mijenjanjem otopine za odbojavanje u nekoliko navrata. Nakon odbojavanja proteini se vide kao tamnoplave pruge na bezbojnoj pozadini, a gelovi se mogu čuvati u 7%-tnoj octenoj kiselini.

Postoji nekoliko modifikacija ove metode kako bi se povećala njena osjetljivost (0.2-0.5 µg proteina po prugi, tj. oko 50 µg proteina po uzorku), npr. koloidalno bojanje s CBB g-250.

Glavni nedostatak metode je relativno slaba osjetljivost.

Fluorescencijsko bojanje

Veća osjetljivost detekcije može se postići upotrebom fluorescencijskih tvari, za što postoje dva pristupa. U prvom se proteini vežu s fluorescencijskim bojama prije elektroforeze i fluorescerajuće proteinske pruge se detektiraju skeniranjem gela. Koriste se dansilklorid (osjetljivost 10 ng proteina po vrpici) fluorescamin (5 ng po vrpici). Glavni nedostatak ovog pristupa je moguća promjena naboja proteina uslijed vezanja boje. Drugi pristup zasniva se na obilježavanju proteina fluoresceirajućim molekulama, poput 1-alanin-8-naftalen sulfonata (ANS) ili o-ftalaldehida (OPA), nakon elektroforeze. No, njihova je osjetljivost manja, svega 0.5 µg proteina po vrpici.

Bojanje srebrom

Tehnike zasnovane na bojanju srebrom znatno su osjetljivije od CBB i mogu detektirati 0.1 ng proteina po vrpici, što ih čini izuzetno važnima pri analizi uzoraka raspoloživih u ograničenim količinama. No, ove metode mogu imati nekoliko bitnih nedostataka:

1. izrazito pozadinsko bojenje (čistoća reagensa i vode od iznimne je važnosti)
2. loša reproducibilnost
3. visoka cijena
4. neki se proteini bojaju vrlo slabo, gotovo nikako

Gelovi se nakon elektroforeze fiksiraju u mješavini metanola, octene kiseline i vode, ili u trikloroctenoj kiseline. Prije bojanja potrebno ih je dobro isprati u otopini etanola kako bi se uklonili ostaci Trisa, SDS-a i glicina iz gela, jer mogu vezati srebro i time pojačati pozadinsko bojenje.

Većina protokola prije impregnacije srebrom uključuje pretretman u kojem se povećava osjetljivost i kontrastnost, a može se izvesti na mnogo različitih načina koji uglavnom spadaju u tri osnovne kategorije. Prva se zasniva na povećavanju vezanja srebra za proteine, a druga na smanjenju pozadinskog bojenja uporabom oksidirajućih agensa, npr. dikromata ili permanganata (ograničena je na tehnike u kojima je gel kiseo sve do razvijanja). Treća kategorija obuhvaća tehnike koje povećavaju osjetljivost ubrzavanjem redukcije srebra vezanog za proteine, što se postiže pretretmanom gela sulfidrilnim reagensima (tiourea, ditiotritol, tiosulfat) ili reducirajućim sredstvima (glutaraldehyd, formaldehyd, borohidrid).

Sve metode bojanja srebrom baziraju se na redukciji srebra i mogu se podijeliti ovisno o kemijskom obliku srebrenog iona korištenog za impregnaciju gela.

Alkalne metode koriste amonijakalnu otopinu srebra pripremljenu dodavanjem srebra u smjesu natrij i amonij hidroksida. Bakreni ioni uključeni su diaminske metode jer povećavaju njihovu osjetljivost, mehanizmom sličnim Biuret reakciji. Srebrni ioni vezani za proteine u gelu razvijaju se redukcijom u metalno srebro pomoću formaldehida u zakiseljenoj sredini.

U drugoj skupini metoda se za impregnaciju koristi srebreni nitrat u blago kiseloj otopini. Redukcija u metalno srebro postiže se djelovanjem formaldehida u alkalnoj otopini natrij karbonata ili natrij hidroksida. Prije razvijanja valja dobro isprati slobodni AgNO_3 iz gela da se spriječi taloženje srebrooksida koje dovodi do jakog pozadinskog bojenja.

Sve metode bojenja srebrom uključuju redukciju ionskog u metalno srebro, no točan mehanizam reakcije nije poznat. Smatra se da se ioni srebra vežu na amino skupine proteina, naročito lizina.

Radioaktivno obilježavanje

Proteinski uzorci za analizu mogu se obilježiti ugradnjom radioaktivnih aminokiselina (uglavnom ^{14}C leucina i ^{35}S metionina), a takav se pristup koristi mahom u kulturi tkiva. Detekcija se provodi autoradiografijom.

Detekcija glikoproteina

Glikoproteini se boje kao i ostali proteini, no nekoliko je tehnika pomoću kojih ih možemo razlikovati od neglikoziliranih proteina. Danas su najpopularnije one zasnovane na radioaktivno ili fluorescencijski obilježenim lektinima ili enzimatski konjugiranim lektinima. Mogu se primijeniti izravno u gelu, ali je bolje detekciju glikoproteina provoditi nakon transfera na membranu (npr. nitroceluloznu).

Različiti lektini vežu se na različite šećerne ostatke glikoproteina, što je prikazano u tablici.

ŠEĆER	LEKTIN	IZVOR LEKTINA
D-manoza	Con A	Canavalia ensiformis
D-glukoza	Con A	Canavalia ensiformis
D-galaktoza	PNA RCA 1	Arachis hypogaea (kikiriki) Ricinus communis (ricinus)
L-fukoza	UEA	Ulex europaeus (štipavac)
N-acetil-D-galaktozamin	DBA SBA	Dolichos biflorus Glycine max (soja)
N-acetil-D-glukozamin	WGA	Triticus vulgaris (pšenica)
N-acetil-D-galaktozamin		Helix pomatia (puž vinogradnjak)
N-acetil neuraminska kiselina		Limulus polyphemus (američki bodljaš)

Prijenos proteina na membranu

Bez obzira na široku primjenu elektroforetskih tehnika u analizi proteinskih uzoraka, one ipak ne pružaju izravne informacije o identitetu i funkcionalnim osobinama razdvojenih proteina.

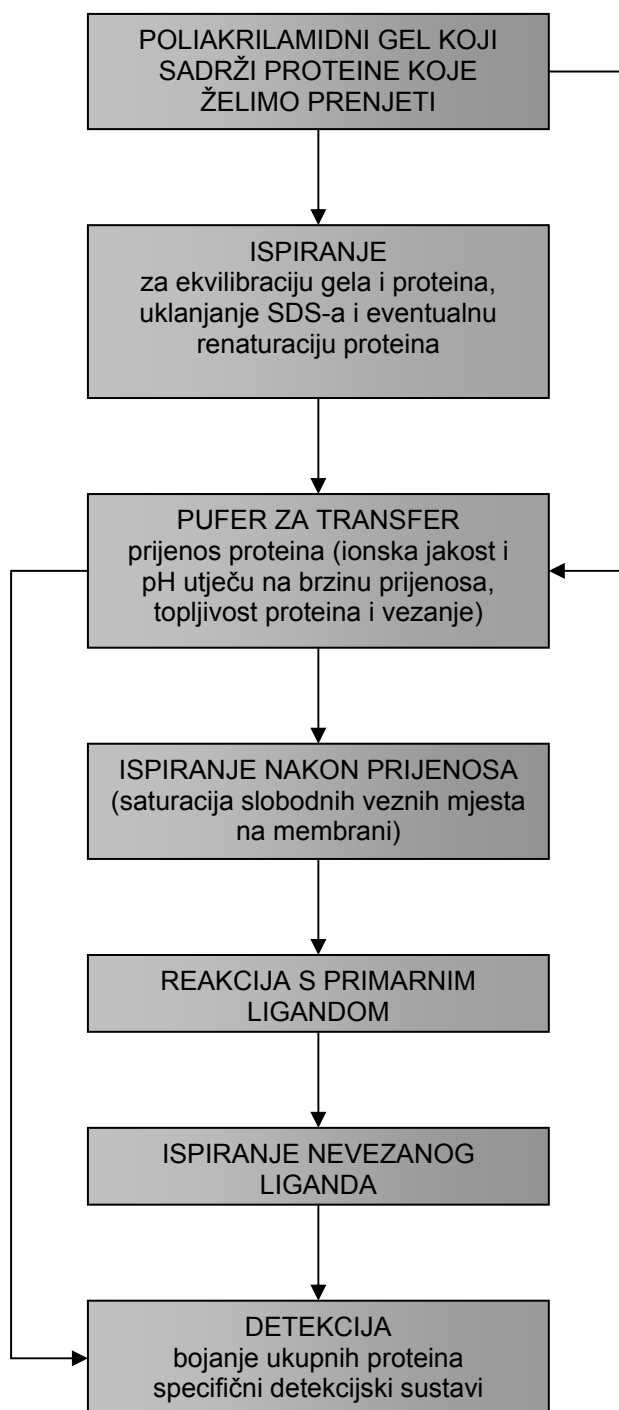
Pojedini visoko specifični liganadi, kao što su antitijela (poliklonalna i monoklonalna) i lektini, vrlo su osjetljivi reagensi za identifikaciju i karakterizaciju proteina nakon njihova razdvajanja. Uzorci mogu reagirati s odgovarajućim antiserumom prije elektroforeze - nastali se imunoprecipitat može izdvojiti, a proteini koji su reagirali analiziraju se elektroforetski. Alternativno je moguće analizirati proteine koji ostanu nakon uklanjanja imunoprecipitata, a takva se tehnika zove **imunodelecija**.

Pri **imunofiksaciji** proteini se nakon elektroforeze istalože vezivanjem protutijela. Ova tehnika daje dobre rezultate na membranama od celulozanog acetata i na agaroznim gelovima te poliakrilamidnim gelovima niske koncentracije (kakvi se upotrebljavaju za IEF). Zbog male veličine pora u gelu visoke koncentracije poliakrilamida ova tehnika ne daje zadovoljavajuće rezultate. Naime, male pore otežavaju prodiranje antitijela i drugih velikih sonda u gel, a osim toga tijekom ulaska probe dolazi i do difuzije razdvojenih proteinskih zona u gelu.

Problemi vezani uz imunofiksaciju riješeni su razvojem "blotting" tehnika u kojima se razdvojeni proteini prebacuju iz gela na površinu nekog tankog nosača, kao što je nitrocelulozna membrana. Proteini su tada imobilizirani na površini membrane i lako dostupni za interakcije s antitijelima ili drugim ligandima. Ove procedure razvijene su po istom principu kao Southern i Northern blotting.

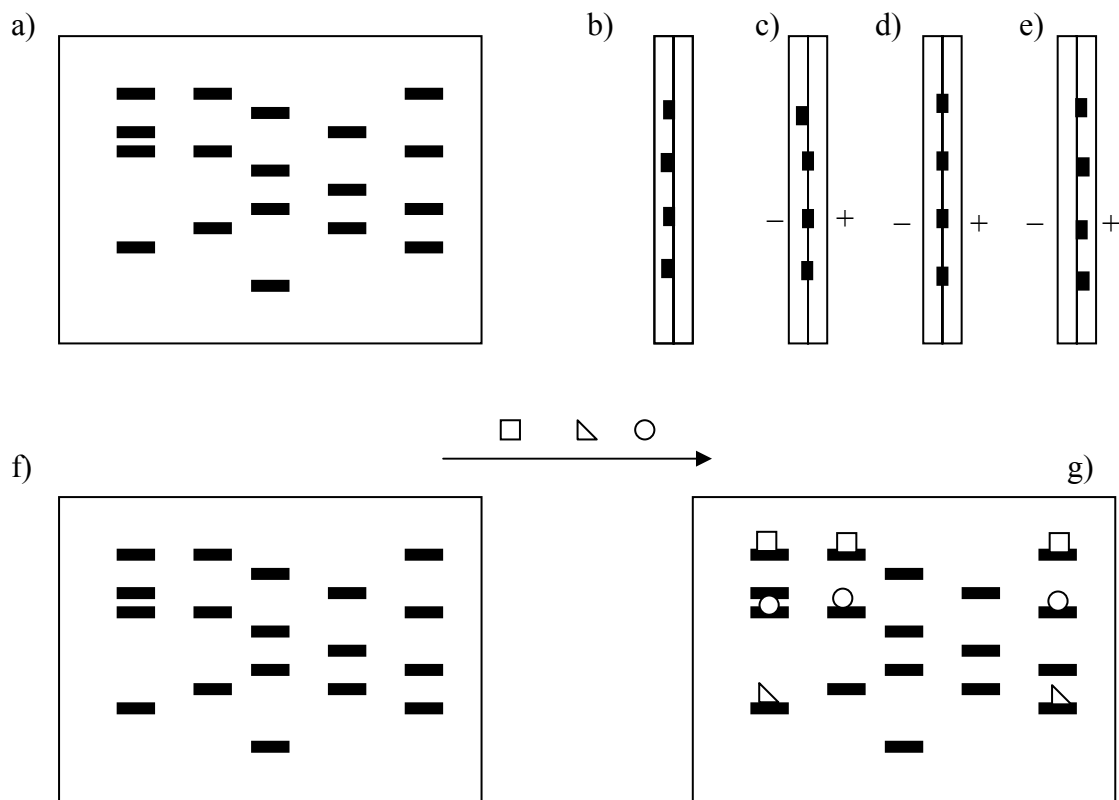
Po završetku elektroforeze gel se inkubira u odgovarajućem puferu kako bi se uklonili ostaci SDS-a (u slučaju SDS-PAGE) i drugih tvari koje bi mogle uzrokovati poteškoće pri prijenosu. Ovaj korak ujedno smanjuje stiskanje i savijanje gela pri prijenosu te omogućava renaturaciju proteina (ako do nje može doći). Nakon prijenosa proteini mogu biti prikazani primjenom neke od metoda za bojanje ukupnih proteina. Za specifičnu se detekciju, prije reakcije s antitijelima ili lektinima, moraju blokirati nespecifična vezna mjesta za ligand koja se nalaze na samoj membrani. Proteini koji vežu određenu sondu zatim se prikazuju pomoću odgovarajućih reporter-molekula.

Shematski prikaz koraka uključenih u prijenos proteina na membranu:



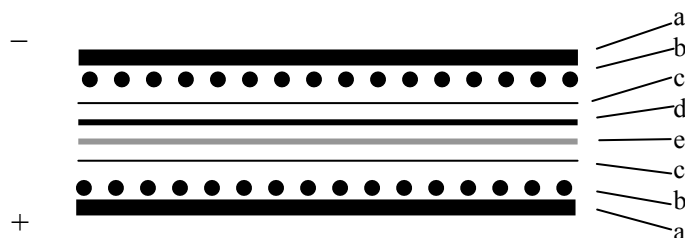
Prijenos proteina može se izvesti kontaktnom difuzijom, kapilarnim silama ili vakuumskim metodama. Znatno brži i efikasniji prijenos razdvojenih proteina s poliakrilamidnih gelova na površinu membrane postiže se primjenom električnog polja okomitog na ravninu gela. Takav se prijenos naziva "**electroblotting**".

Shematski prikaz Western blottinga:



Slika 5. (a) Gel s razdvojenim proteinima. (b-e) Elektroforetski prijenos proteina s gela na membranu. (f) Membrana s proteinima. (g) Interakcija proteinskih vrpca s odgovarajućim ligandima.

Dva su osnovna tipa uređaja za prijenos proteina iz gela na membranu. Prvi ima uspravnu kadicu u koju se između katode i anode postavlja "sandwich" složen ovim redom: spužva, filter papir, gel, membrana, filter papir, spužva. Sandwich je u čvrstom šupljikavom okviru i sve se zajedno uroni u kadicu ispunjenu puferom.



Slika 6. Struktura sendviča: a = plastični okvir b = spužva c = filter papir
d = gel e = membrana

Drugi su tip horizontalni uređaji za tzv. "semi-dry blotting" koji imaju ravne, pločaste elektrode smještene na maloj udaljenosti. Takvi uređaji trebaju male količine pufera. Gel i membrana smještaju se između dva snopa filter papira navlažena puferom za prijenos, koji su u izravnom kontaktu s elektrodama. U ovakvim se uređajima može postići veća jakost električnog polja pri manjoj jakosti struje.

Tipovi membrana

Proteini se prenose na nekoliko različitih tipova membrana. Najčešće se rabi nitrocelulozna membrana, koja je kompatibilna s većinom metoda za vizualizaciju proteina, relativno je jeftina i ima visok kapacitet vezanja proteina. Proteini se za nitroceluloznu membranu ne vežu kovalentno, nego, smatra se, adsorbiraju kombinacijom hidrofobnih i elektrostatskih interakcija.

Proteini se kovalentno vežu za diazo papire, kao što su diazobenziloksimetil celuloza i diazofeniltioeter celuloza, no oni se rijetko koriste jer ih je potrebno aktivirati neposredno prije upotrebe. Najlonske membrane nisu pogodne za Western blotting jer je blokiranje veznih mjesta za ligande neefikasno.

Nedavno su u upotrebu ušle hidrofobne poliviniliden difluoridne (PVDF) membrane, koje imaju veliku mehaničku čvrstoću, visok kapacitet vezanja proteina i kompatibilne su s većinom protokola za Western blotting. Prednost im je što se na njih vezani proteini mogu koristiti za kemijsku karakterizaciju tj. određivanje primarne strukture.

VJEŽBE

BILJNI MATERIJAL

U ovom praktikumu radi se s kalusnim linijama šećerne repe (*Beta vulgaris* L.), tkivima kaktusa (*Mammillaria gracillis* Pfeiff.) različitog organizacijskog nivoa te tumorskim linijama hrena (*Armoracia lapatifolia*). Šećerna repa raste na hranidbenoj podlozi PG0, i to bez dodatka regulatora rasta (prilagođene i tumorska linija) ili uz dodatak 2,4-D (2,4-diklorofenoksiocetna kiselina) i BA (6-benzilaminopurin) - normalni kalus. Kaktus raste na hranidbenoj podlozi MS0.

Šećerna repa

oznaka	linija	opis
1	N	neorganizirani kalus zelene boje (2,4-D, BA)
2	HNO	prilagođeno neorganizirano tkivo
3	HO	prilagođeno organizirano tkivo (izdanci)
4	Tz	crown gall tumor (neorganiziran, A.t. B6S3)
5	Tb	tumorsko tkivo, hiperprodukcija pigmenta betanina
6	Tc	tumorsko tkivo

Kaktus

oznaka	linija	opis
S	izdanak	zeleni organizirani izdanak normalnog fenotipa
C	kalus	prilagođeno neorganizirano tkivo
HR	hiperh.regenerant	regenerant okruglog oblika ispunjen vodom
TW	tumor TW	tumorsko neorganizirano tkivo

Hren

oznaka	linija	opis

EKSTRAKCIJA STANIČNIH PROTEINA

OTOPINE

1. Staples-Stahmanov (SS) pufer za ekstrakciju

Tris	2.242 g
Saharoza	34.2 g
Askorbinska kis.	0.2 g
Cistein (HCl)	0.2 g
6 M HCl	do pH 8,0
Deionizirana voda	do 200 ml

U oko 100 ml deionizirane vode otopiti sve sastojke pa pažljivim dodavanjem HCl podesiti pH na 8,0 te nadopuniti vodom do 200 ml. Razdijeliti u tikvice i čuvati na -20°C.

2. Pufer za uzorke - „Laemmli Sample buffer“

Glicerol	8 ml
SDS, 20%-tni	5 ml
0.5 M Tris/HCl (pH 6,9)	6.25 ml
β-merkaptotanol	2.5 ml
Bromphenol blue, 0.5%	0.5 ml
Deionizirana voda	do 25 ml

Pufer za uzorke zbog β-merkaptotetanol pripremati u digestoru. Čuvati na +4°C.

Prilikom ekstrakcije ukupnih topljivih staničnih proteina koristi se Staples-Stahmanov ekstrakcijski pufer. Kako bi se spriječila degradacija proteina cijeli je postupak potrebno provesti na ledu.

Tkivo je potrebno vagnuti i homogenirati u tarioniku (ohlađen i postavljen na led!) uz dodatak ekstrakcijskog pufera i polivinil pirolidona (PVP - spriječava djelovanje fenolnih komponenti). Volumen pufera prilagoditi tkivu, tj. uzeti u obzir sadržaj vode i proteina u tkivu.

1. N	1,5 g tkiva	+	1,6 ml pufera
2. HNO	1,5 g tkiva	+	1,6 ml pufera
3. HO	1,5 g tkiva	+	1,0 ml pufera
4. Tz, Tc, Tb	1,0 g tkiva	+	1,5 ml pufera

Pufer dodavati u 3 porcije, pri čemu zadnjom isprati tarionik. Homogenat uliti u eppendorf tube (ohlađene na ledu i obilježene).

Centrifugirati: 14 000 rpm 10 min. +4°C

Supernatant prelići u čistu eppendorf tubu i centrifugirati

14 000 rpm 55 min. +4°C

Odrediti sadržaj proteina u supernatantu (sirovi ekstrakt) metodom po Bradfordu, uz pomoć baždarne krivulje načinjene nizom razrijeđenja otopina albumina goveđeg seruma (BSA).

Osim ovom, koncentracija proteina može se odrediti i drugim metodama, kao što su: metoda po Lowry-u, mjerenje apsorpcije na 280 nm itd. a više o njima može se pročitati u: PROTEIN METHODS, Bollag, M.D. and Edelstein, J.S., A JOHN WILLEY & SONS INC. PUBLICATION, 1991.

Denaturirati proteine zagrijavanjem 2-5 min. na 95-100°C (vodena kupelj) uz dodatak pufera za denaturaciju (sample buffer). Volumen pufera varira ovisno o sadržaju proteina u uzorku. Praktično je izjednačiti sadržaj proteina u denaturiranim ekstraktima. Optimalno je ako on iznosi 0,6-1,0 mg/ml.

Ukoliko gel bojimo bojom Coomassie brilliant blue, po jažici se nanosi 20-30 µg proteina, dok je za bojenje srebrom dovoljno 6-10 µg. Volumen u kojem se ta količina proteina nalazi neka ne prelazi 50 µg.

PRIPREMA BAŽDARNE KRIVULJE

1. Bradford matična otopina

95%-tni etanol	100 ml
88%-tna H ₃ PO ₄	200 ml
Coomassie BB G-250	350 mg

Ova je otopina na sobnoj temperaturi stabilna neograničeno dugo.

2. Bradford radna otopina

95%-tni etanol	15 ml
88%-tna H ₃ PO ₄	30 ml
Bradford stock	30 ml
Deionizirana voda	do 500 ml

Filtrirati kroz Whatman No.1 papir i čuvati u tamnoj boci na sobnoj temperaturi. Otopinu se može koristiti nekoliko tjedana, ali je povremeno potrebno ponovo filtrirati.

3. Otopine BSA

BSA	20 mg
SS pufer	10 ml

Otapanjem 20 mg albumina goveđeg seruma u 10 ml Staples-Stahmanovog pufera priredi se otopina koncentracije 2 mg/ml iz koje se priprema niz razrijeđenja prema sljedećoj tablici:

V otopine BSA (2 mg/ml) u ml	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
V SS pufera u ml	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Konačna konc. (mg/ml)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0

Otopine se mogu neko vrijeme čuvati zamrznute na -20°C.

Rad sa spektrofotometrom

Intenzitet plavog obojenja nastalog pri reakciji proteina u uzorku s Bradfordovim reagensom proporcionalan je koncentraciji proteina, a mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 595 nm.

Za rad sa spektrofotometrom (Unicam UV/Vis) preko računala potrebno je najprije pokrenuti Vision program pa tek onda uključiti uređaj. Desetak je minuta potrebno za inicijalizaciju optike spektrofotometra. Tek nakon toga prilazi se izradi baždarnog pravca.

Priredi se po dvije replike svakog standarda, a kao slijepa proba koristi se ekstrakcijski pufer.

20 µl standarda + 1 ml Bradford reagensa

Pri izradi baždarne krivulje postupiti prema sljedećim koracima:

1. Popuniti tablicu CALIBRATION METHOD, Page 1 i Page 2
2. Popuniti STANDARDS TABLE
3. Stisnuti COMMAND, pa ZERO
4. Stisnuti QUANT, pa CALIBRATE
5. Unijeti standarde kako to zahtijeva računalo
6. Za mjerenje uzoraka nepoznate koncentracije popuniti tablicu SAMPLE METHOD
7. Stisnuti ikonu ili riječ RUN
8. Unijeti uzorke kako to zahtijeva računalo
9. Spremiti baždarni pravac pod CALIBRATION, a mjerenje uzoraka pod SAMPLE METHOD

Baždarnu krivulju treba pripremati neposredno prije mjerenja koncentracije proteina u uzorku, s istim puferom i pod istim uvjetima.

Nakon mjerenja korištene kivete i epruvete ispiru se metanolom.

PRIPREMA IZVANSTANIČNIH PROTEINA

Izvanstanični proteini izoliraju se iz tekuće hranidbene podloge na kojoj je tkivo raslo nekoliko dana (2-5). Stoga je na početku eksperimenta potrebno tkiva uzgajati u suspenziji.

Po 20 ml tekuće hranidbene podloge razdijeliti u tikvice.

Šećerna repa

Svako tkivo nasaditi u po dvije tikvice s 20 ml medija i to:

N	10 g	PG + 2,4-D; BA
HNO	10 g	PG0
HO	10 g	PG0
Tz	10 g	PG0
Tb	10 g	PG0
Tc	10 g	PG0

KONCENTRIRANJE PROTEINA

Kako je količina proteina izlučenih u podlogu jako mala, potrebno ih je na neki način koncentrirati da bi ih se moglo dalje analizirati. To je moguće napraviti pomoću Sephadexa ili precipitacijom acetonom.

Podloga se filtriranjem odvoji od tkiva (koje se koristi za ekstrakciju staničnih proteina).

Filtrirati uz pomoć vakuum sisaljke prvo kroz filter većih pora, a zatim kroz Millipore filter s porama promjera 45 µm.

Sephadex

U ohlađene i obilježene eppendorf tube uliti filtrat i uz lagano miješanje dodavati Sephadex G-25. Podesiti količinu Sephadex-a tako da se volumen educira na 1/3.

Ostaviti sat vremena u frižideru uz povremeno miješanje.

Centrifugirati: 14 000 rpm 10 min. +4°C

Supernatante denaturirati 2 min. na 96-100°C uz dodatak 1/4 volumena pufera za denaturaciju (sample buffer) ili dalje koncentrirati acetonom.

Za uzorke izvanstaničnih proteina bundeve koncentriranje Sephadex-om je dovoljno.

Aceton

Proteini se iz filtrirane tekuće hranidbene podloge precipitiraju acetonom ohlađenim na -20°C. Aceton se ne smije dodavati mikropipetom, jer je njegove pare oštećuju. Stoga se dodaje staklenom pipetom.

Po 5 ml profiltrirane tekuće hranidbene podloge ulije se u tube za Sorwall centrifugu i precipitira laganim dodavanjem 1,5-2 volumena (8-10 ml) hladnog acetona uz povremeno miješanje.

Ostaviti najmanje 2 sata (ili preko noći) na -20°C.

U Sorwall centrifugi istaložiti precipitat

10 000 rpm

10 min

+4°C

Odliti aceton i talog posušiti na zraku.

Resuspendirati talog u malom volumenu SS pufera (200-500 µl). Pufer dodavati u malim porcijama uz stalno miješanje.

Denaturirati dodatkom 1/4 volumena sample buffera.

SDS-PAGE

OTOPINE

1. Akrilamid/bisakrilamid

Akrilamid	29.2 g
Bis	0.8 g
Deionizirana voda	do 100 ml

Akrilamid je izuzetno toksičan, pa je njime potrbno jako pažljivo rukovati. Važe se s rukavicama i maskom na licu, u digestoru, kako bi se eventualni kontakt sveo na minimum. I kasnije, prilikom pipetiranja akrilamida i izlijevanja gelova, potrbno je raditi u rukavicama.

Nakn pripreme filtrirati i čuvati na +4°C.

2. 1.5 M Tris-HCl pH 8,8

Tris	18.2 g
6.0 M HCl	do pH 8,8
Deionizirana voda	do 100 ml

Nakn pripreme filtrirati i čuvati na +4°C.

3. 0.5 M Tris-HCl pH 6,8

Tris	6 g
6.0 M HCl	do pH 6,8
Deionizirana voda	do 100 ml

Nakn pripreme filtrirati i čuvati na +4°C.

4. 10%-tni amonij-peroksisulfat (APS)

APS	500 mg
Deionizirana voda	do 5 ml

Otopinu podijeliti u alikvote od 0.5 ml i čuvati u ependorficama na - 20°C. Odmrznuti neposredno prije izlijevanja gelova. Odmrznuti APS može se koristiti tjedan dana.

5. 10 × elektrodni pufer

Tris	24 g
Glicin	114 g
SDS	10 g
6.0 M HCl	do pH 8,3
Deionizirana voda	do 1 L

Prije upotrebe razrijediti pufer 10 puta. Može se koristiti više puta.

6. Gelovi za Mini-Protean II (mali uređaj)

Gel za razdvajanje, 12%-tni

Deionizirana H ₂ O	3.35 ml
Tris-HCl pH 8,8	2.5 ml
AA/Bis (30%)	4.0 ml
	vakuuum
10%-tni SDS	100 µl
10%-tni APS	50 µl
TEMED	5 µl

Gel za koncentriranje, 4%-tni

Deionizirana H ₂ O	3.05 ml
Tris-HCl pH 8,8	1.25 ml
AA/Bis (30%)	665 µl
	vakuuum
10%-tni SDS	50 µl
10%-tni APS	35 µl
TEMED	8 µl

U gelu za koncentriranje može se izostaviti SDS.

METODE

Izlijevanje gelova

Prije izlijevanja gela za razdvajanje potrebno je staklene ploče i razmaknice dobro učvrstiti i vodom provjeriti da li cure. Ukoliko je sve u redu, voda se odlije, a stakla se posuše filter papirom.

Neposredno nakon dodavanja APS-a i TEMED-a smjesa za gel se uvuče u špricu i pažljivo, ali brzo (da ne dođe do polimerizacije u šprici) ulije između ploča, pazeći da ne ostanu mjehurići zraka. Gel se nadsvođi vodom ili izobutanolom (jer kontakt sa zrkom spriječava polimerizaciju) i polimerizira oko 45 minuta.

Nanošenje uzoraka

Voda se odlije (ako je nadsvođeno izobutanolom površinu gela valja dobro isprati) i izlije se gel za koncentriranje, koji s također polimerizira 45 minuta.

U jažice može stati maksimalno 40 µl uzorka, a uzorci se nanose pomoću Hamilton šprice, a potrbno ih je nanositi relativno brzo, da se spriječi lateralna difuzija.

Elektroforeza

Elektroforeza traje 45 minuta pri 200 V.

BOJANJE SREBROM

1. Fiksiranje	50% metanol 12% octena kiselina 0.5 H ₂ O do 1 L	1 h ili dulje
2. Ispiranje	30% etanol	3 × 20 min
3. <u>Prethodna obrada</u>	Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O (0,2 g/l) 50 mg/250 ml deionizirane H ₂ O	1 min.
4. Ispiranje	de H ₂ O	3 × 20 s
5. <u>Impregniranje</u>	AgNO ₃ (2g/l) 500 mg/250 ml deion. H ₂ O 37% HCOH (0,75 ml/l) 0,188 ml/250 ml deion. H ₂ O	20 min
6. Ispiranje	de H ₂ O	2 × 20 s
7. <u>Razvijanje</u>	Na ₂ CO ₃ (60 g/l) 15 g/250 ml deion. H ₂ O 37% HCOH (0,75 ml/l) 0,125 ml/250 ml deion. H ₂ O Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O (0,2 g/l) 1 mg/250 ml deion. H ₂ O* (*uzeti 5 ml otopine 3)	10 min. ili kraće (dok se ne pojave smeđe vrpce)
8. Stop	50% metanol 12% octena kiselina	

Otopine **3**, **5** i **7** potrebno je pripremiti neposredno prije upotrebe. Razvijanje se zaustavlja naglim zakiseljavanjem, i to tako da se najprije odsisa otopina za razvijanje a zatim ulije otopina Stop na gel.

Gelovi se neko vrijeme mogu čuvati u otopini Stop, u frižideru.

2-D ELEKTROFOREZA

OTOPINE

1. Pufer za rehidraciju

Urea (8M)	2,4 g
CHAPS (2%)	0,1 g
Amfoliti 3-10	26 μ l
DTT	10 mg
Deionizirana voda	do 5 ml

Prvo izvagati 2,4 g uree u čašicu od 20 ml, staviti magnetič i dodati 2,5 ml vode te čašicu s ureom staviti u veću čašu od 150 ml u kojoj se nalazi topla voda (30-40 °C). Staviti na magnetsku mješalicu dok se urea ne otopi, te dodati ostale sastojke.

Napomena: uvijek pripremiti svježi rehidracijski pufer.

2. Pufer za uzorke za prvu dimenziju

Urea	5,4 g
CHAPS	0,4 g

Ureu otopiti u 4 ml deionizirane vode u čaši s toplom vodom (na prethodno opisani način), te dodati CHAPS. Nadopuniti do 10 ml s deioniziranom vodom, razdijeliti u Eppendorf tube u alikvotne od po 1 ml i spremite na -18°C .

Prije upotrebe otopiti potreban broj alikvota i u svaki dodati

DTT	10 mg
Amfoliti 3-10	25 μ l
Bromphenol blue	2 μ l

3. Pufer za ekvibraciju

Urea (6 M)	18 g
Tris/HCl pH 6.8	5 ml
Glicerol	15 ml
20%-tni SDS	5 ml
Deionizirana voda	do 50 ml

4. 0,5%-tna otopina agaroze

Agaroz	50mg
Bromfenol blue	40 μ l
Deionizirana voda	10 ml

Prije upotrebe zagrijati u mikrovalnoj pećnici.

METODE

Dvodimenzionalna elektroforeza ukupnih topivih proteina provodi se po metodi koju su opisali Pearce i Svendsen (1999), a slijede se upute proizvođača za elektroforezu, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden.

1. DIMENZIJA – izoelektrično fokusiranje (IEF)

Priprema uzoraka:

1. Volumenu sirovog ekstrakta koji sadrži oko 100 µg proteina dodati dvostruki volumen hladnoga acetona i ostaviti ih na temperaturi -18 °C barem dva sata, kako bi se istaložili proteini
2. centrifugirati 10 min na 20.000 g,
3. talog osušiti na zraku i preko noći ostaviti na -18 °C
4. osušene taloge resuspendiranjem otopiti u u 50 µl sample buffera za prvu dimenziju
5. otopljeni talog centrifugirati 1-2 min na 15.000 g.

Priprema Imobilina:

1. nelinearne imobiline (Immobiline DryStrip, pH 3-10 NL, 13 cm, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) položiti s gelom prema donjoj strani u 300 µl svježe pripremljenog rehidracijskog pufera u posudu za rehidraciju
2. imobiline prekriti s 900 µl mineralnog ulja i ostaviti preko noći da se rehidriraju na sobnoj temperaturi
3. nakon rehidracije imobiline isprati s deH₂O s obje strane i položiti u kadicu za izoelektrično fokusiranje
4. uz rubove imobilina s katodne i s anodne strane postaviti dvije papirnate elektrodne trake duljine 110 mm prethodno namočene s 500 µl deH₂O
5. elektrode postaviti tako da sredinom sjednu na elektrodne trake.
6. na filter papiriće nanijeti po 25 µl uzorka (100 µg proteina po imobilinu) pripremljenog na prethodno opisani način, te papiriće položiti na anodnu stranu imobilina.
7. površinu kadice prekriti s mineralnim uljem, spojiti na izvor napajanja i pokrenuti izoelektrično fokusiranje ukupnog trajanja od 32000 Vh.

Uvjeti izoelektričnog fokusiranja	1h	300 V
	1h	600 V
	1h	2100 V
	6h	3200 V
	3h	3400 V

Nakon završetka izoelektričnog fokusiranja imobiline položiti na para-film i spremi na -80 °C.

2. DIMENZIJA – SDS-PAGE

1. dva imobilina inkubirati 15 min u 5 ml pufera za ekvilibraciju u koji se prethodno doda 2% DTT (100 mg)
2. imobiline isprati s deH₂O
3. imobiline inkubirati 15 min u 5 ml pufera za ekvilibraciju u koji se prethodno doda 2,5%-tni jodoacetamid (125 mg).
4. Svaki imobilin pojedinačno umočiti u 1x SDS elektrodni pufer i položiti uz rub SDS-poliakrilaminog gela
5. na filter-papirić nanijeti 3 µl markera molekulskih masa te sve zaliti 0,5%-tnom otopinom agaroze
6. Ostaviti da se agarozna skrutna te pokrenuti elektroforezu na prethodno opisani način

Gelove bojiti srebro-nitratom ili s Coomassie brilliant blue.

PRIJENOS PROTEINA NA NITROCELULOZNU MEMBRANU

I. OTOPINE ZA "WET BLOTTING"

1. Pufer za prijenos

Tris 25 mM (3.35 g/L)
 glicin 192 mM (14.4 g/L)
 metanol 10%
 pH 8,3

2. TBS pufer

Tris 20 mM (2.42 g/L)
 NaCl 500 mM (29.2 g/L)
 pH 7,5

3. Rouge Ponceau S

4. TTBS pufer

TWEEN 20 0.1% u TBS

TTBS + CaCl₂ 1mM matična ot. 0.111 g/ml, uzeti 1 ml na L

TTBS + MgCl₂ 1 mM matična ot. 0.203 g/ml, uzeti 1 ml na L

II. OTOPINE ZA "SEMI-DRY BLOTTING"

1. Anodni pufer za prijenos

Glicin 2.93 g
 Tris 5.81 g
 SDS 0.375 g
 Metanol 200 ml nadopuniti do 1000 ml s deH₂O

2. Katodni pufer za prijenos

Glicin 2.93 g
 Tris 5.81 g
 SDS 0.375 g nadopuniti do 1000 ml s deH₂O

3. TBS pufer

4. Rouge Ponceau S

5. TTBS pufer

METODE

I. MOKRI PRIJENOS (WET BLOTTING)

- 1.** Neposredno prije upotrebe nitroceluloznu membranu treba staviti na par minuta u vruću destiliranu vodu. U posudu s puferom za prijenos postavi se plastični okvir uređaja (tamnom stranom prema dolje) i na njega položi spužvica, dva Whatmann 3 mm filter papira (odrezana na veličinu spužvi) i druga spužvica, te se sve dobro natopi.
- 2.** Na donji filter papir položi se membrana.
- 3.** Nakon SDS-PAGE gel se nasloni na membranu tako da među njima nema mjehurića zraka, pokrije drugim filter papirom i pritisne da se sve dobro navlaži. Položi se gornja spužvica, preklopi okvir i sve dobro stisne i učvrsti.
- 4.** Ovako pripremljeni "sandwich" postavi se u uređaj tako da membrana bude okrenuta prema + elektrodi (jer su svi proteini zbog SDS-a negativno nabijeni)
- 5.** Transfer traje 1 sat na 60 V.
- 6.** Po završenom prijenosu membrana se oboji bojom Rouge Ponceau S koja se veže za sve proteine, što nam omogućava ucrtavanje markera olovkom na membranu, jer markeri nisu glikozilirani pa se nakon inkubacije s lektinima neće vidjeti. U boji se membrana inkubira 1-2 minute, a zatim se ispere vodom dok proteinske vrpce ne budu jasno uočljive.
- 7.** Nakon ucrtavanja markera membrana se dodatno ispere vodom i TBS-om sve dok se potpuno ne odboji, a zatim se saturira u TTBS-u.

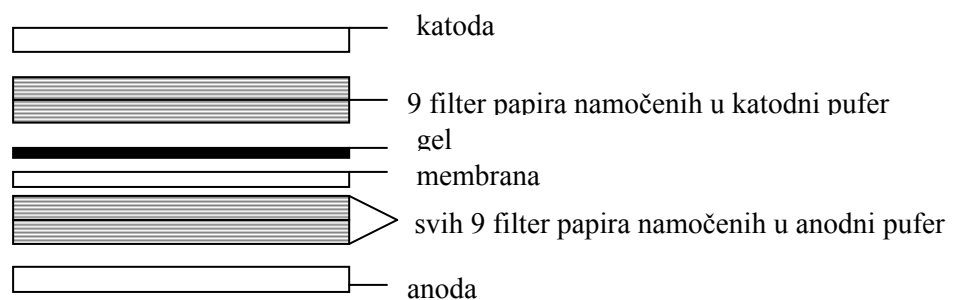
II. POLUSUHI PRIJENOS (SEMI-DRY BLOTTING)

1. Namočiti grafitnu anodnu ploču s deH₂O, a višak vode upiti filter-papirom.
2. Staviti anodnu ploču u kadicu i priključiti anodu s desne strane kadice.
3. Filter-papir i membranu izrezati na veličinu gela (kako bi struja prolazila samo kroz gel).

13 x 16 cm za 1-D gel

13 x 18 cm za 2-D gel

4. 9 filter-papira namočiti polaganim uranjanjem jednog po jednog u **ANODNI PUFER** i omogućiti im da postanu mokri kapilarnim silama. **VAŽNO**: Izbjeći hvatanje mjehurića zraka.



5. Nitroceluloznu membranu namočiti u **ANODNI PUFER** i staviti na filter-papire .
6. Na membranu staviti gel.
7. 9 filter-papira namočiti u **KATODNI PUFER** i staviti na gel.
8. Namočiti grafitnu katodnu ploču s deH₂O, a višak vode upiti filter-papirom.
9. Staviti katodu na transfer sandwich i spojiti elektrodu.
10. Staviti poklopac i uključiti power-supply.
11. Transfer ide **1h** pri konstantnoj struji od **150 mA** (0.8 mA/cm²)
12. Nakon završetka transfera, tretirati membrane prethodno opisani način, a elektrode isprati s deH₂O.

VAŽNO: sve raditi u rukavicama!

TRETIRANJE NITROCELULOZNE MEMBRANE LEKTINIMA

I. TRETIRANJE NITROCELULOZNE MEMBRANE LEKTINOM Con A

- | | | |
|---|--|--|
| 1. Saturacija | TTBS | 60 min ili duže |
| 2. Inkubacija | TTBS
CaCl ₂ 1 mM
MgCl ₂ 1 mM
ConA 25µg/ml | 90 min |
| | za jednu membranu je potrebno 50 ml otopine | |
| 3. Ispiranje | TTBS
CaCl ₂ 1 mM
MgCl ₂ 1 mM | 4 x 15 min
(ili 6 x 5 min) |
| 4. Inkubacija | TTBS
CaCl ₂ 1 mM
MgCl ₂ 1 mM
peroksidaza 50 µg/ml | 60 min |
| | za jednu membranu je potrebno 50 ml otopine | |
| 5. Ispiranje | TTBS
CaCl ₂ 1 mM
MgCl ₂ 1 mM | 4 x 15 min
(ili 6 x 5 min) |
| 6. Ispiranje | TBS | 15 min |
| 7. Razvijanje | | |
| | otopina A | TBS 50 ml
H ₂ O ₂ 30% 30µl |
| | otopina B | metanol 10 ml
4-chloro-1-naphtol 30 mg
(ili 3,3'-diaminobenzidine 30 mg) |
| | otopine AiB pomiješati neposredno prije upotrebe | |
| 8. Razvijanje se zaustavlja ispiranjem u većoj količini destilirane vode. Membrana se suši između dva lista Whatman papira. | | |

Napomena: sa supstratima u otopini B treba pažljivo rukovati jer su vrlo toksični i kancerogeni.

II. TRETIRANJE NITROCELULOZNE MEMBRANE LEKTINIMA OBILJEŽENIM BIOTINOM (RCA₁₂₀ i UEA I)

nakon prijenosa 1h na 60V:

1. fiksiranje	octen kis. 10% izopropanol 25%	15 min
2. ispiranje	deH ₂ O	2X kratko
3. bojanje	Rouge Ponceau	5 min ili kraće
4. ispiranje	deH ₂ O	1X kratko (ucrtati markere)
5. odbojavanje	TBS	3-4X (do odbojenja)
6. blocking buffer	TTBS	preko noći na +4°C
7. ispiranje	TTBS	3x15 min -15 ml/membrani
8. inkubacija	TTBS s MgCl ₂ i CaCl ₂ 10 ml + biotin-RCA (1:4000 – 2,5 µl) biotin-UEA (1:1000 – 10 µl) biotin-SNA (1:2000 – 5 µl) biotin-MAA (1:500 – 20 µl)	75 min
9. ispiranje	TTBS	3x15 min -15 ml/membrani
10. inkubacija	TBS 10 ml + streptavidin-alkalna fosfataza 1,5 µl	75 min
11. ispiranje	TTBS	3x15 min -15 ml/membrani
12. vizualizacija	BCIP/NBT 3 ml/membrani	do pojave vrpce (u tami)

zaustavljanje bojanja u većoj količini deH₂O

III. TRETIRANJE NITROCELULOZNE MEMBRANE LEKTINIMA OBILJEŽENIM DIGOKSIGENINOM (DSA, GNA, PNA, SNA i MAA)

nakon prijenosa 1h na 60V:

1. fiksiranje	octen kis. 10% izopropanol 25%	15 min
2. ispiranje	deH ₂ O	2X kratko
3. bojanje	Rouge Ponceau	5 min ili kraće
4. ispiranje	deH ₂ O	1X kratko (ucrtati markere)
5. odbojavanje	TBS	3-4X (do odbojenja)
6. blocking buffer	TTBS	preko noći na +4°C
7. ispiranje	TBS TTBS s MgCl ₂ i CaCl ₂	2x10 min -15 ml/membrani 1x10 min -15 ml/membrani
8. inkubacija	TTBS s MgCl ₂ i CaCl ₂ 10 ml + DIG-GNA (10 µl) DIG-SNA (10 µl) DIG-DSA (10 µl) DIG-MAA (50 µl) DIG-PNA (100 µl)	60 min
9. ispiranje	TBS	3x10 min -15 ml/membrani
10. inkubacija	TBS 10 ml + antiDIG-alkalna fosfataza 10 µl	60 min
11. ispiranje	TBS	3x10 min -15 ml/membrani
12. vizualizacija	BCIP/NBT 3 ml/membrani	do pojave vrpce (u tami)

zaustavljanje bojanja u većoj količini deH₂O

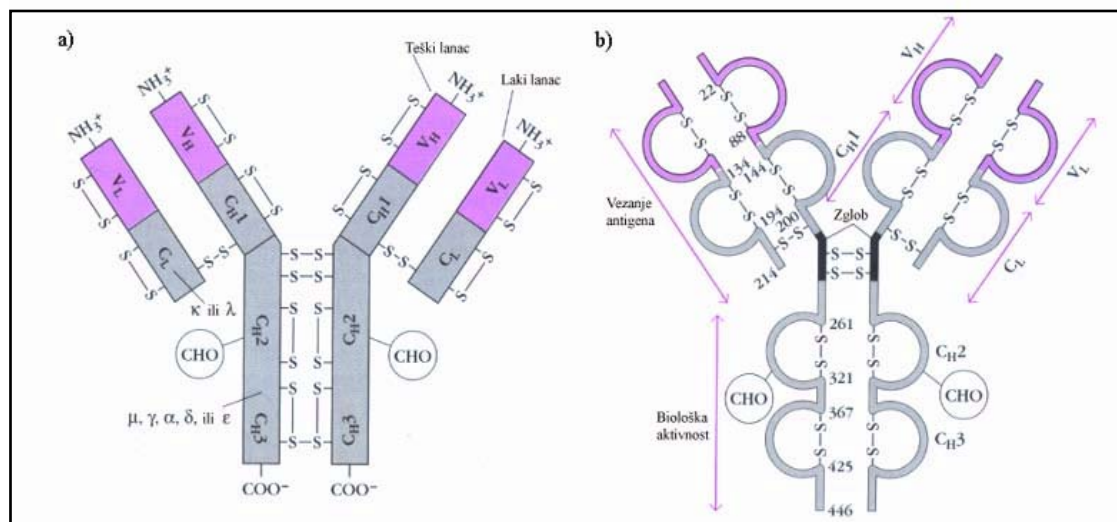
IZOLACIJA I ANALIZA IMUNOGLOBULINA G IZ SERUMA ŠTAKORA (*Rattus sp.*)

Struktura imunoglobulina G

Imunoglobulin G (IgG) je najzastupljeniji od pet tipova imunoglobulina koje proizvode aktivirani B limfociti, odnosno plazma stanice. Udio mu u ukupnim protutijelima u humanom serumu iznosi 80 %, a koncentracija oko 13,5 mg/ml.

IgG je monomer, molekulske težine 150 kD, koji se sastoji od dva identična teška i dva laka lanca. Teški lanci (50 kD) su isključivo γ tipa, dok laki lanci (25 kD) mogu biti κ ili λ . S obzirom na γ lanac, postoje četiri podklase IgG ($\gamma 1-4$), koje su različito zastupljene u serumu, a razlikuju se i u nekim biološkim svojstvima.

Primarnu strukturu i lakih i teških lanaca karakteriziraju varijabilna regija (100 - 110 aminokiselina), koja se uvijek nalazi na N-terminusu i služi za vezanje antigena, i konstantna regija koja čini ostatak molekule (Slika 1a). I laki i teški lanci posjeduju unutarlančane disulfidne mostove (Slika 1b), koji su u lakih odgovorni za stvaranje dviju (V_L i C_L), a u teških četiri domena (V_H , C_{H1} , C_{H2} i C_{H3}).



Slika 1: Shematski prikaz molekule IgG. a) primarna struktura, b) sekundarna struktura

Osobito je važan dio molekule zglobna regija (*eng.* “hinge region”), koja povezuje Fab_2 (*eng.* “antibody-binding fragment”), s Fc (*eng.* “crystallizing fragment”) fragmentom. To je zapravo produženi peptidni slijed između C_{H1} i C_{H2} domena, bogat prolinom i fleksibilan, tako da omogućava Fab fragmentima zauzimanje određenih kutova pri vezanju antigena. Ovdje se također nalaze i ostaci cisteina, koji sudjeluju u stvaranju disulfidnih mostova između dva teška lanca.

Također je važan dio molekule i $C_{H2}:C_{H2}$ regija. Za razliku od ostalih susjednih domena koje su tijesno priljubljene jedna uz drugu, između susjednih C_{H2} domena nalazi se šupljina, koja je posljedica steričkih utjecaja disulfidnih mostova u zglobnoj regiji s jedne, i $C_{H3}:C_{H3}$ regije s druge strane. U ovoj se šupljini nalaze oligosaharidni lanci, a zbog pojačane izloženosti okolini cijela je regija odgovorna za važne biološke funkcije molekule IgG (npr. aktivaciju komplementa, vezanje za Fc receptore na monocitima i makrofagima) (slika 3).

Glikozilacija molekule IgG

Kao i kod svih glikoproteina, glikozilacija IgG odvija se pretežno u lumenu endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata, dijelom kotranslacijski, a dijelom posttranslacijski. Različite subpopulacije B limfocita sadrže različite omjere enzima koji sudjeluju u biosintezi oligosaharida, što dovodi do velike varijabilnosti u njihovim strukturama. Također valja naglasiti da mnogi od ovih enzima kao supstrat imaju jedino IgG molekulu, a ne i druge glikoproteine.

Molekula IgG prosječno sadrži 2.8 N-vezana oligosaharidna lanca raspodijeljena između Fc i Fab fragmenata. Mjesna nespecificnost i relativno malen broj oligosaharidnih lanaca (prosječno 0.8 od 2.8 na cijeloj molekuli IgG), dvije su glavne značajke glikozilacije Fab fragmenata. Njihova je glikozilacija ograničena na hipervarijabilne regije u kojima su glikozilacijski motivi malobrojni i podložni čestim promjenama u položaju. Iz ovih razloga teško ih je i proučavati, tako da im je funkcija još nepoznata. Postoje indicacije da sudjeluju u procesu vezanja antigena i to povećavajući specifičnost protutijela.

Osnovna značajka glikozilacije Fc fragmenta je mjesna specifičnost: oligosaharidne strukture uvijek se vežu na Asn₂₉₇ u sačuvanom glikozilacijskom motivu Asn-Xaa-Ser(Thr) na teškom lancu IgG, tako da svaki Fc fragment posjeduje ukupno dva oligosaharidna lanca.

Za razliku od Fab fragmenta, funkcija oligosaharida na Fc fragmentu molekule IgG bolje je upoznata; cijela regija ima važnu ulogu u stabilizaciji i prostornoj organizaciji molekule pa na taj način utječe i na važna svojstva IgG: aktivaciju komplementa, indukciju citotoksičnosti ovisne o protutijelima i vezanje za Fc receptor monocita i makrofaga. Kako su i neke autoimune bolesti povezane s poremećenom glikozilacijom upravo na tom mjestu, njegova je struktura dobro proučena.

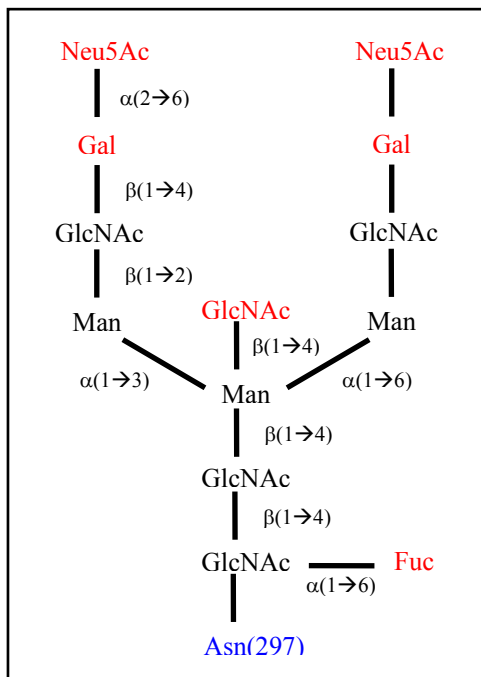
Vrlo važna značajka dva oligosaharida na Fc fragmentu jest da na svim molekulama IgG u serumu oni nisu jednakih struktura. Nakon odvajanja oligosaharidnog od polipeptidnog dijela poliklonalnih molekula IgG detektirano je više od trideset različitih glikoformi koje se mogu naći na Asn₂₉₇, od kojih je najveća prikazana na slici 2.

Razlike u strukturama su relativno male i očituju se u prisustvu ili odsustvu jednog ili oba ostatka galaktoze (Gal 6,6'), N-acetilglukozamina (GlcNac 4") ili fukoze (Fuc 1'). Uzrok je ovoj varijabilnosti, kao što je već spomenuto, činjenica da različite subpopulacije B limfocita posjeduju različite skupine i omjere glikoziltransferaza koje sudjeluju u posttranslacijskoj modifikaciji oligosaharidnih struktura novosintetizirane molekule IgG. Tome u prilog ide i činjenica da središnji dio oligosaharidne strukture ne podliježe promjenama, tako da sve detektirane oligosaharidne strukture na Fc fragmentu posjeduju trimanoznu jezgru (prisutna je i kod drugih N-glikoziliranih proteina) i "biantenarnu" strukturu, tj. posjeduju dva kraka, $\alpha(1,6)$ i $\alpha(1,3)$.

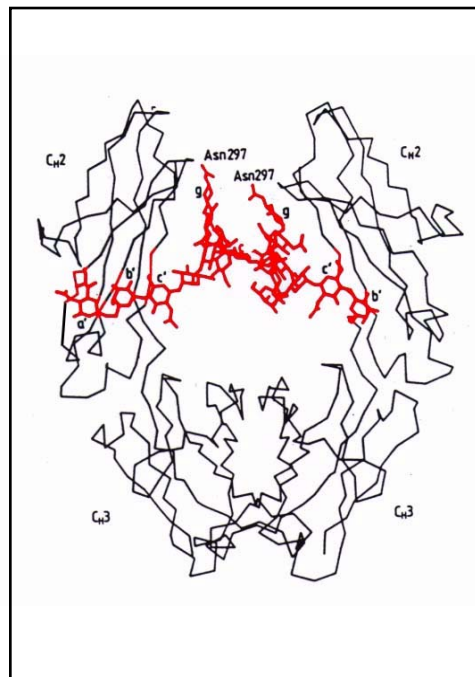
Unatoč velikom broju struktura oligosaharida prisutnih na različitim molekulama IgG, u normalnim su okolnostima udjeli pojedinih struktura u serumu konstantni. Tako se zna da u zdravom serumu npr. 75 % oligosaharidnih struktura posjeduje Gal 6 i/ili 6', 18 % GlcNac 4" i 85 % Fuc 1'. Dva se oligosaharidna lanca na Fc fragmentu nalaze u šupljini između susjednih C_{H2} domena teških lanaca, dakle u blizini zglobne regije molekule (Slika 3).

Svaki je od ta dva lanca dugačak gotovo kao i sama C_{H2} domena, tako da ulazi u niz interakcija s polipeptidnim dijelom molekule, ali i sa susjednim oligosaharidom. Zbog manjeg afiniteta $\beta(1,4)$ -galaktoziltransferaze prema $\alpha(1,3)$ ogranku, on je prosječno manje galaktoziliran od $\alpha(1,6)$ ogranka i terminalnim ostatkom GlcNac ulazi u

interakciju s trimanoznom jezgrom drugog oligosaharida, dok $\alpha(1,6)$ ogranak ulazi u interakciju s polipeptidnim dijelom, i to sa slijedećim aminokiselinama: Phe₂₄₃ (Man 5', GlcNac 6'), Pro_{244/245} (Gal 7') i Thr₂₆₀ (GlcNac 6', Gal 7'). Te interakcije uključuju stvaranje van der Waalsovih i vodikovih veza i na taj način lokalno znatno utječu na stabilnost i konformaciju molekule. To se jako dobro očituje u povećanoj podložnosti digestiji enzimima pepsinom i papainom, aglikoziliranih odnosno pogrešno glikoziliranih molekula IgG.



Slika 2: Najveća oligosaharidna struktura detektirana na Fc fragmentu IgG; Neu5Ac=sijalinska kiselina, Gal=galaktoza, GlcNac=N-acetil-glukozamin, Man=manoza, Fuc=fukoza



Slika 3: Položaj oligosaharida unutar CH₂:CH₂ šupljine na Fc fragmentu IgG

VJEŽBA 1: Pročišćavanje imunoglobulina G iz seruma, određivanje koncentracije i N-deglikozilacija

Proteini seruma istalože se amonij-sulfatom, talog se otopi u fosfatnom puferu (pH=6.8) i izvrši se gel-filtracija (odvajaju se proteini od molekula amonij-sulfata). Slijedi kromatografija na ionskom izmjenjivaču, u uvjetima u kojima se IgG ne veže za kolonu i prolazi kao “flow-through”. Koncentracija izoliranog IgG određuje se spektrofotometrijom pri $\lambda=280$ nm, a čistoća SDS-PAGE elektroforezom.

Taloženje amonij-sulfatom

Otopine:

4 M otopina amonij-sulfata

za 20 ml: 10.6 g amonij-sulfata
(podložan kristalizaciji tijekom vremena, bolje pripremiti prije upotrebe)

10 mM fosfatni pufer (pH=6.8)

za 1000 ml: 4.97 ml K_2HPO_4 1M
5.03 ml KH_2PO_4 1M
dodati vode do 1000 ml

U 350 μ l seruma doda se 595 μ l 4 M otopine amonij-sulfata (volumeni su podešeni tako da konačna koncentracija amonij-sulfata bude 2.38 M). Talog se obori centrifugiranjem 5 minuta na 5000 rpm i, nakon odlijevanja supernatanta, otopi u 350 μ l 10 mM fosfatnog pufera (pH=6.8).

Gel-filtracija (odsoljavanje)

Gel-filtracija se izvodi na koloni Sephadex G-25. Određivanje praznog volumena kolone izvodi se nanošenjem otopine plavog dekstrana (1 mg/ml) na kolonu i bilježenjem vremena njegova prolaska. Prije upotrebe kolona se ispiru u nekoliko (vlastitih) volumena H_2O i ekvilibrira u najmanje pet volumena 10 mM fosfatnog pufera (pH=6.8).

Kromatografija na ionskom izmjenjivaču

Otopine:

2 M NaCl

za 0.5 L: otopiti 58.44 g NaCl u vodi do konačnog volumena 500 ml
(sporo se otapa, postupno dodavati NaCl u vodu, miješati preko noći)

Koristi se kolona s jakim anionskim izmjenjivačem trimetilaminoetil (TMAE)-celulozom, koja se ekvilibrira s najmanje pet (vlastitih) volumena 10 mM fosfatnog pufera (pH=6.8). Ukupni volumen uzorka prikupljen nakon gel-filtracije (oko 2 ml) aplicira se na vrh kolone, a nakon njegova ulaska u kolonu kontinuitet tekućine održava se istim puferom. IgG se u ovim uvjetima ne veže za kolonu – vrijeme

njegova izlaska iz kolone prati se redovitim prikupljanjem frakcija od 1 ml i mjerenjem njihove apsorbancije na $\lambda=280$ nm. Proteini vezani za kolinu eluiraju se 2M otopinom NaCl.

Određivanje koncentracije IgG

Pripremi se serija od deset razrjeđenja liofiliziranog standarda IgG u rasponu od 0.1 – 2 mg/ml. Na $\lambda=280$ nm izmjere se apsorbancije različitih koncentracija standarda IgG i konstruira se baždarna krivulja. Određivanjem apsorbancija uzoraka pročišćenog IgG, iz baždarne se krivulje odrede njihove koncentracije.

N-deglikozilacija imunoglobulina G

Otopine:

10% SDS

za 1 ml: 0.1 g se otopi u vodi do volumena 1 ml

0.4 M EDTA

za 50 ml: 5.845 g otopiti u najprije u 20 ml vode

oprez: EDTA se teško otapa – prilikom otapanja treba dodavati NaOH i na kraju dodati vode do 50 ml

N-vezani oligosaharidi uklanjaju su s proteinskog dijela molekule enzimom peptid-N-glikozidazom F (PNG-aza F), iz *Flavobacterium meningosepticum*. Prije N-deglikozilacije, volumen uzorka koji sadrži 50 μg IgG se dopuni 10 mM fosfatnim puferom do 200 μl i denaturira kuhanjem pet minuta uz dodatak 2.1 μl 10%-tne otopine SDS (0.1%), 2.1 μl 2-merkaptetanola (1%) i 5.8 μl 0.4 M EDTA (konačno 0.01 M). Nakon kuhanja uzorak se naglo ohladi na +4° C i doda se detergent Nonidet® P40 do konačne koncentracije 0.7% (3 μl 50%-tne otopine).

Uzorak se inkubira s 0.025 jedinica¹ PNG-aze F / μg IgG, najmanje 16 sati na 25° C. Učinkovitost enzima provjerava se inkubacijom N-deglikoziliranih molekula IgG lektinima (vidi str. 34).

VJEŽBA 2: SDS-PAGE

Vidi skripta (isto kao i kod biljnih proteina)

Bojanje gelova

Otopine:

Coomassie stainer

za 100 ml: 0.25 g CBB R250

45 ml metanol

10 ml ledene octene kiseline

dopuniti do 100 ml vodom, filtrirati

¹ “jedinica” - oznaka proizvođača koja označava količinu enzima koja hidrolizira 1 nmol dansyl-fetuin glikoproteina u jednoj minuti, pri pH 7.2 i 37° C

Coomassie destainer

(10% octena kiselina, 20% metanol)

za 1 L: 100 ml koncentrirane octene kiseline

200 ml metanola

dopuniti vodom do 1000 ml

Nakon elektroforeze, gel se uroni u otopinu boje Coomassie Brilliant Blue R250 i inkubira preko noći na zibajućoj platformi, pri sobnoj temperaturi.

Odbojavanje gela izvodi se inkubacijom u smjesi metanola (20%) i ledene octene kiseline (10%), najmanje 4 sata na zibajućoj platformi pri sobnoj temperaturi.

Nakon odbojavanja, gel se konzervira.

VJEŽBA 3: Prijenos na nitroceluloznu membranu

Vidi skripta (isto kao i kod biljnih proteina)

Blokiranje membrane**Otopine:****TBSTween**

(TBS, 0.1% Tween 20)

na 1L TBS dodati 1 ml Tweena 20

Nakon prijenosa proteina, nitrocelulozna membrana se inkubira (blokira) preko noći s 0.1%-tnom otopinom detergenta Tween 20 u TBS puferu.

VJEŽBA 4: Inkubacija s lektinima i razvijanje blotova

Vidi skripta (isto kao i kod biljnih proteina)

VJEŽBA 5: Izrezivanje proteinskih vrpca iz gela i digestija proteina u gelu**Otopine:**

A) 25 mM amonij-hidrogenkarbonat u vodi (HPLC-stupanj čistoće)

B) acetonitril (HPLC-stupanj čistoće)

C) 10 mM ditiotritol otopljen u A (1.55 mg/ml)

D) 55 mM jodoacetamid otopljen u A (10 mg/ml)

E) 15 ng/μl modificiranog tripsina za sekvenciranje (otopi 20 μg tripsina u 40 μl pufera za otapanje; razrjedi 3/97 u otopini A)

F) metanol (HPLC-stupanj čistoće)

Napomena: zbog moguće kontaminacije uzoraka keratinom iz kože, kose i odjeće, tijekom cijele vježbe obavezno nositi kutu i zaštitne rukavice.

Na čistoj staklenoj podlozi, čistim se skalpelom precizno izrežu željene proteinske vrpce iz gela i pohrane u prethodno obilježenu plastičnu epruvetu. Također se izreže i pohrani «prazan» komadić gela na istoj visini kao i jedna od izrezanih vrpca.

Izrezani komadići gela ispiru se prema sljedećem protokolu:

- 1) komadići gela inkubiraju se i skupljaju 8 minuta u 100 μ l acetonitrila (otopina B) na termo-miješalici; potom se tekućina odstrani
- 2) komadići gela inkubiraju se i bubre 12 minuta u 100 μ l amonij-hidrogenkarbonata (otopina A), na miješalici; potom se tekućina odstrani
- 3) ponove se koraci 1 i 2
- 4) ponovi se prvi korak
- 5) komadići gela suše se u vakuum-centrifugi 10-tak minuta

Nakon ispiranja provodi se redukcija i alkilacija (karbamidometilacija) cisteina prema sljedećem protokolu:

- 6) komadići gela inkubiraju se u 100 μ l DTT (otopina C), 45 minuta pri 57° C na termo-miješalici; potom se tekućina odstrani
- 7) komadići gela inkubiraju se u 100 μ l acetonitrila (otopina B), 8 minuta pri 57° C; uzorci se potom kratko centrifugiraju na stolnoj centrifugi pri 2000 rpm, nakon čega se potpuno odstrani tekućina a temperatura na termo-miješalici se podesi na 25° C
- 8) komadići gela inkubiraju se (svaki) u 100 μ l jodoacetamida (otopina D), 45 minuta na sobnoj temperaturi u mraku (bez miješanja); potom se tekućina odstrani

Slijedi ispiranje komadića gela od ostataka DTT-a i jodoacetamida:

- 9) ponove se koraci 1-5

Na poslijetku slijedi digestija proteina u gelu:

- 10) svakom komadiću gela doda se 10 μ l tripsina (otopina E); komadići se ostave 10 minuta na sobnoj temperaturi da nabubre – ukoliko je nakon tog vremena upijena sva tekućina, na komadiće gela doda se 10 do 20 μ l amonij-hidrogenkarbonata (otopina A)
- 11) uzorci se inkubiraju preko noći na 37° C

VJEŽBA 6: Ekstrakcija peptida iz gela

Otopine:

- A) acetonitril/voda/mravlja kiselina 70/20/10 (v/v/v) (HPLC-stupanj čistoće)
 B) acetonitri (HPLC-stupanj čistoće)
 C) voda/metanol/mravlja kiselina 93/02/05 (v/v/v) (HPLC-stupanj čistoće)

Triptički peptidi se ekstrahiraju iz komadića gela prema sljedećem protokolu:

- 1) uzorci se izvade iz termo-miješalice (37° C)
- 2) svakom se uzorku doda 50 μ l otopine A; sonicira se 15 minuta i potom kratko odcentrifugira
- 3) supernatant se prenese u obilježenu čistu plastičnu epruvetu i čuva se
- 4) svakom se uzorku doda 50 μ l otopine B; sonicira se 15 minuta i potom kratko odcentrifugira

- 5) supernatant se pažljivo skupi i doda prethodnom ekstraktu u plastičnu epruvetu; sadržaj epruvete kratko se odcentrifugira
- 6) ekstrakti se osuše u vakuum-centrifugi
- 7) peptidi se otope u 10 μ l otopine C i čuvaju na -20° C do analize

VJEŽBA 7: Analiza ekstrahiranih peptida iz gela tekućinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom

VJEŽBA 8: Analiza masenih spektara i bioinformatička obrada podataka – identifikacija proteina iz gela