

STRUKTURA PROTEINOV (primarna struktura)

VAJE – SKRIPTA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM BIOKEMIJA
na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo
Univerze v Ljubljani.

prof. dr. Igor Križaj
Odsek za biokemijo in molekularno biologijo
Institut Jožef Stefan
Jamova 39
1000 Ljubljana, Slovenia
tel.: +386 1 477 36 26
faks: +386 1 257 35 94
e-mail: igor.krizaj@ijs.si

Kazalo

Seznam okrajšav	4
Aminokisliline – oznake in relativne molekulske mase	5
Kako bodo potekale vaje?	6
Varnost v laboratoriju	7
Pregled vaj po skupinah	8
Opis vaj po skupinah:	
Skupina A	9
Skupina B	13
Skupina C	17
Metode in materiali	
1. Gelska kromatografija	21
1.1. Določanje navidezne relativne molekulske mase (M_r)	21
1.2. Razsoljevanje proteinov z gelsko filtracijo na koloni PD10	21
2. NaDS-PAGE	22
2.1. Barvanje PA gela z barvilom CBB R250	25
2.2. Barvanje PA gela s $ZnCl_2$ v prisotnosti imidazola	25
2.3. Barvanje PA gela s koloidnim srebrom	26
2.4. Barvanje s perjudno kislino in Schiffovim reagentom	26
3. Polsuhi (semidry) prenos proteinov iz PA gela na PVDF membrano v električnem polju (western prenos)	27
3.1. Detekcija polipeptidov na PVDF membrani z barvilom CBB R250	28
3.1.1. Priprava PVDF vzorca za sekvenčno analizo	29
4. Določitev števila prostih in disulfidno vezanih cisteinov v proteinu z Ellmanovim reagentom	29
4.1. Izdelava umeritvene krivulje za kvantitativno določitev Cys	29
4.2. Določitev števila prostih Cys v nativnem (A) in denaturiranem (B) proteinu	30
4.3. Določitev števila vseh Cys v proteinu	30
5. Visokotlačna tekočinska kromatografija na obrnjenih fazah (RP HPLC)	32
6. Čiščenje oborjenega proteinskega vzorca s spiranjem oborine	33
7. Alkiliranje proteinskega vzorca	34
7.1. Denaturacija in redukcija proteina	34
7.2. Piridiletiranje proteina s 4-vinilpiridinom	34
7.3. Karboksimetiliranje proteina z jodoacetatom	35

8. Razgradnja proteinov z encimi in na kemijski način	35
8.1. Razgradnja proteinov v raztopini s proteinazami	35
8.1.1. Razgradnja proteina s tripsinom	35
8.1.2. Razgradnja proteina s proteinazo <i>Staphylococcus aureus</i> V-8	36
8.2. Razgradnja proteina v PA gelu s proteinazo <i>Staphylococcus aureus</i> V-8 ali endoproteinazo Lys-C	36
8.3. Kemijska razgradnja proteina s CNBr	37
9. Aminokislinska analiza proteina	38
9.1. Kislinska hidroliza vzorca	38
9.2. Analiza rezultatov	39
10. Določitev N-terminalne aminokislinske sekvence proteina	39
10.1. Priprava vzorca za sekveniranje	39
10.2. Analiza rezultatov	41
11. ES masna spektrometrija	41
11.1. Priprava vzorca za analizo	41
11.2. Postopek masnospektrometrične meritve	41
11.3. Analiza rezultatov	41
Vprašanja in naloge	43

Kazalo slik

Slika 1: Shematski prikaz osnovnih principov elektroforeze.	23
Slika 2: Priprava modela za vlivanje poliakrilamidnega gela.	23
Slika 3: Sistemi za elektroforezni prenos proteinov iz poliakrilamidnih gelov.	28
Slika 4: Diagram komponent izokratskega HPLC sistema.	33
Slika 5: HPLC injektor.	34
Slika 6: Cepitev disulfidne vezi.	35
Slika 7: Reakcija piridiletiliranja s 4-vinilpiridinom.	35
Slika 8: Karboksimetiliranje cisteina.	36
Slika 9: CNBr cepitev.	38
Slika 10: Kemija Edmanove degradacije.	42

Seznam okrajšav

APS - amonijev persulfat

ATZ - anilintiazolinon

CBB - Coomassie brilliant blue

CM - karboksimetil

CNBr - cianogen bromid

DTT - ditiotreititol

EDTA - etilen diamin tetraacetat

ES - elektrosprej

GvHCl - gvanidinijev hidroklorid

HEPES - N-(2-hidroksietil)piperazin-N`-2-etansulfonska kislina

HPLC - visokotlačna tekočinsaka kromatografija

m/z - razmerje mase in naboja

β-ME - β-merkaptometanol

NaDS - natrijev dodecil sulfat

NaDS-PAGE - poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata

PA - poliakrilamid

PAGE - poliakrilamidna gelska elektroforeza

PE - piridiletal

PITC - fenilizotiocianat

PTC - feniltiocarbamoil

PTH - feniltiohidantoin

PVDF - poliviniliden difluorid

RP HPLC - visokotlačna tekočinsaka kromatografija na obrnjenih fazah

TCA - trikloroocetna kislina

TEMED - N,N,N`,N`-tetrametil etilen diamin

TFA - trifluoroocetna kislina

Tris - Tris(hidroksimetil)aminometan

Triton X-100 – polietilen glikol-mono-[p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil] eter

Aminokisljine – oznake in relativne molekulske mase

			M_r	$M_r(-H_2O)$
Alanin	Ala	A	89,1	71,1
Arginin	Arg	R	174,2	156,2
Asparagin	Asn	N	132,1	114,1
Asparaginska kislina	Asp	D	133,1	115,1
Cistein	Cys	C	121,1	103,1
Fenilalanin	Phe	F	165,2	147,2
Glutaminska kislina	Glu	E	147,1	129,1
Glutamin	Gln	Q	146,1	128,1
Glicin	Gly	G	75,1	57,1
Histidin	His	H	155,1	137,1
Izolevcin	Ile	I	131,2	113,2
Karboksimetil-cistein	CM-Cys		193,2	175,2
Levcin	Leu	L	131,2	113,2
Lizin	Lys	K	146,2	128,2
Metionin	Met	M	149,2	131,2
Piridilet-il-cistein	PE-Cys		226,1	208,1
Prolin	Pro	P	115,1	97,1
Serin	Ser	S	105,1	87,1
Tirozin	Tyr	Y	181,2	163,2
Treonin	Thr	T	119,1	101,1
Triptofan	Trp	W	204,2	186,2
Valin	Val	V	117,1	99,1

Kako bodo potekale vaje?

Vsaka skupina študentov bo razdeljena na tri podskupine (3-4 študentje) od katerih bo vsaka dobila po en neznan protein (A, B ali C). V prvi vaji boste določili osnovne lastnosti dobljenega proteina, to je njegovo molekulsko maso, izoelektrično točko, število in vrsto podenot, ki ga sestavlja, posttranslacijske modifikacije (glikozilacija). V vajah, ki bodo sledile, se boste najprej seznanili z metodami za modifikacijo specifičnih aminokislinskih ostankov v proteinu. Analizirani protein boste reducirali in mu zaščitili –SH skupine (piridiletiranje, karboksimetiliranje). Vzorec boste nato razsoljevali bodisi z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC) na koloni z obrnjeno fazo, z gelsko filtracijo na PD10 koloni ali s spiranjem oborjenega proteina (veliko proteinov po denturaciji ni več dobro topnih, kar lahko tudi s pridom izkoristimo). Alkiliran protein boste razgradili s proteinazami različnih specifičnosti (tripsin, *Staphylococcus aureus* V-8 proteinaza, endoproteinaza Lys-C) ali na kemijski način (cianogen bromid) in nastale fragmente ločili s HPLC na koloni z obrnjeno fazo ali z poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE) v prisotnosti detergenta natrijevega dodecil sulfata (NaDS). Nekaterim peptidom bomo določili aminokislinsko zaporedje s postopkom Edmanove razgradnje na avtomatskem proteinskem sekvenatorju. Peptide čiščene z NaDS-PAGE boste pred sekvenčno analizo iz gela prenesli na za sekveniranje primeren nosilec - poliviniliden difluoridno (PVDF) membrano (western prenos). Po detekciji peptidov na PVDF membrani, boste lise izrezali in jih sekvenčno analizirali. S pomočjo računalnika boste dobljena aminokislinska zaporedja primerjali s sekvenčnimi bazami in tako identificirali protein, ki ste ga dobili v analizo. To je tudi rezultat, ki ga od vas zahtevamo v poročilu. Poleg tega v poročilu podrobno opišite pot po kateri ste prišli do končnega rezultata, kar pomeni tako, da lahko kdorkoli po vašem poročilu in brez dodatnih informacij analizo natančno ponovi.

Poročila boste napisali po 1. 2. in 5. vaji, po 6. vaji samo preostale odgovore, po 7. vaji pa še končno poročilo.

Varnost v laboratoriju

Pred začetkom dela v laboratoriju osvežite že pridobljeno znanje iz varnega dela v laboratoriju. Ponovno si preberite skripta: "Zbirka pravil varnega dela za študente na FKKT".

V laboratoriju za določanje primarne strukture proteinov še posebej pazite na naslednje nevarne snovi:

- zelo strupene kemikalije:
cianogen bromid (CNBr), acetonitril, akrilamid, fenilizotiocianat (PITC), jodocetna kislina, triklorocetna kislina (TCA);
- strupene kemikalije:
amonijev persulfat (APS), formaldehid, β -merkapto etanol (β -ME), metanol, ocetna kislina, srebrov nitrat, trifluorocetna kislina (TFA), 4-vinil piridin;
- zdravju škodljive kemikalije:
butanol, ditionitrat (DTT), gvanidinijev hidroklorid (GvHCl), natrijev dodecil sulfat (NaDS);
- jedke kemikalije:
CNBr, jodocetna kislina, metanojska kislina, ocetna kislina, srebrov nitrat, TCA, TEMED, TFA;
- dražilne kemikalije:
etilendiamintetraacetat (EDTA);
- mutagene kemikalije:
akrilamid;
- vnetljive kemikalije:
acetonitril, etanol, metanol, N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED).

Pregled vaj po skupinah

Vaja	Skupina A	Skupina B	Skupina C
1	Gelska kromatografija in NaDS-PAGE proteina A. Barvanje gela s CBB R250 in Schiffovim reagentom.	Gelska kromatografija in NaDS-PAGE proteina B. Barvanje gela s CBB R250 in Schiffovim reagentom.	NaDS-PAGE proteina C. Barvanje gela s CBB R250 in Schiffovim reagentom.
2	Določitev števila prostih in disulfidno vezanih Cys v proteinu.	Določitev števila prostih in disulfidno vezanih Cys v proteinu.	Določitev števila prostih in disulfidno vezanih Cys v proteinu.
3	Piridiletiliranje proteina A; Razsoljevanje PE-A s HPLC;	Karboksimetiliranje proteina B; Razsoljevanje CM-B s HPLC;	Piridiletiliranje proteina C; Razsoljevanje s spiranjem oborine; Cepitev PE-C s CNBr.
4	Razgradnja PE-A z <i>S. aureus</i> V8 proteinazo in endoproteinazo Lys-C v PA gelu; Analiza produktov cepitev z NaDS-PAGE; Western prenos proteinov iz gela na PVDF membrano.	Razgradnja CM-B z <i>S. aureus</i> V8 proteinazo in tripsinom; Analiza nastalih fragmentov s HPLC; Cepitev CM-B s CNBr.	Analiza PE-C in produktov CNBr cepitve PE-C z NaDS-PAGE; Western prenos CNBr-peptidov iz gela na PVDF membrano; Barvanje polovice gela s ZnCl ₂ v prisotnosti imidazola.
5	Barvanje gela po prenosu s koloidnim srebrom, Barvanje PVDF membrane s CBB R250; Cepitev PE-A s CNBr.	Analiza produktov CNBr cepitve CM-B z NaDS-PAGE; Western prenos peptidov iz gela na PVDF membrano; Barvanje polovice gela s ZnCl ₂ v prisotnosti imidazola.	Barvanje gela po prenosu proteinov s koloidnim srebrom; Barvanje PVDF membrane s CBB R250; Razgradnja PE-C z <i>S. aureus</i> V8 proteinazo in endoproteinazo Lys-C v PA gelu; Barvanje gela s CBB R250.
6	Analiza produktov CNBr cepitve PE-A z NaDS-PAGE; Barvanje gela s ZnCl ₂ v prisotnosti imidazola; N-terminalna sekvenčna analiza in identifikacija proteina A po bazi podatkov s pomočjo računalnika.	Barvanje gela po prenosu s koloidnim srebrom, Barvanje PVDF membrane s CBB R250; N-terminalna sekvenčna analiza in identifikacija proteina B po bazi podatkov s pomočjo računalnika.	Analiza produktov CNBr cepitve PE-C s HPLC; N-terminalna sekvenčna analiza in identifikacija proteina C po bazi podatkov s pomočjo računalnika.
7	Masna spektrometrija, določanje aminokislinskega zaporedja, x-žarkovna kristalografija.	Masna spektrometrija, določanje aminokislinskega zaporedja, x-žarkovna kristalografija.	Masna spektrometrija, določanje aminokislinskega zaporedja, x-žarkovna kristalografija.

SKUPINA A

1. VAJA - Analiza osnovnih lastnosti proteina

Poznavanje osnovnih lastnosti proteina, ki mu določamo primarno strukturo, to je molekulske mase (M_r), izoelektrične točke (pI), števila in vrste podenot ter načina povezave med njimi, je osnovna informacija in vodilo za oblikovanje strategije sekvenčne analize.

V prvi vaji določite osnovne lastnosti proteina A.

1. Navidezno molekulsko maso nativnega proteina določite z gelsko kromatografijo pod nedestruktivnimi pogoji (1.1.).

2. S poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE) v prisotnosti detergenta natrijevega dodecilsulfata (NaDS), pod neredukcijskimi in redukcijskimi pogoji (2.), določite navidezno molekulsko maso denaturiranega proteina in ugotovite, če je protein sestavljen iz ene ali več podenot – enakih ali različnih – barvanje PA gela s CBB R250 (2.1). Vse 3 skupine pripravite 1 gel skupaj in ga pobarvajte s CBB R250. Vsaka skupina pripravi 2 vzorca svojega proteina: 5 μg proteina s koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ zmešate s 5 μL 2x nanašalnega pufru z reducentom, drugemu vzorcu pa dodate 2x nanašalni pufer brez reducenta. Na gela vzorce nanesite tako, da poleg standarda velikosti nanesete protein A z in brez reducenta, nato protein B in še C.

3. Iz gela (predhodno pripravljen), pobarvanega s perjudno kislino in Schiffovim reagentom določite, ali je protein posttranslacijsko modificiran (glikoziliran).

4. Izoelektrično točko proteina A določite iz priloženega gela.

Odgovorite na vprašanja št. 1-5!

2. VAJA – Analiza cisteina in cistina v proteinu

Podatek o prisotnosti cisteinov v proteinu je pomemben, saj zahteva posebno pripravo vzorca za nadaljnjo sekvenčno analizo (vaja 3). Ugotovitev prisotnosti disulfidnih mostičkov (cistina) v proteinu zahteva določitev njihovega poteka.

Z uporabo Ellmanovega reagenta neznanemu proteinu določite število prostih in disulfidno vezanih Cys (4.). Delate v paru.

Odgovorite na vprašnji št. 6 in 7!

3. VAJA - Priprava proteinskega vzorca za sekvenčno analizo in aminokislinska analiza

Protein ponavadi pred določanjem primarne strukture razvijemo - denaturiramo. Če so v proteinu prisotne disulfidne vezi, le-te prekinemo z redukcijo. Proste -SH skupine potem alkiliramo. Tako

preprečimo njihovo re-oksidacijo, hkrati pa prevedemo cisteinske ostanke v derivate, ki jih lahko analiziramo. Z linearizacijo proteinske molekule se izpostavijo vsa potencialna cepitvena mesta. Z ustrezno modifikacijo lahko vnesemo tudi nova cepitvena mesta v molekulo. Podatek o aminokislinski sestavi proteina, ki mu določamo primarno strukturo, je zelo pomemben pri določanju strategije njegove fragmentacije.

Denaturirajte in reducirajte 400 µg proteina A (7.1.) ter ga alkilirajte s 4-vinil piridinom (7.2.). Piridiletiliran protein A (PE-A) ločite od reagentov na RP HPLC (5.). Vzorec nato razdelite v tri alikvote (dvakrat po 100 µg in enkrat 200 µg). Alikvote bo asistent liofiliziral.

Odgovorite na vprašanja št. 13 in 16-18!

4. VAJA - Fragmentacija proteinov in analiza produktov

Metode določanja primarne strukture proteinov so omejenega dosega. V večini primerov so proteini tako dolgi, da jim ni mogoče z eno analizo določiti celotnega aminokislinskega zaporedja. Potrebno jih je razgraditi na manjše dele – peptide. Protein lahko razgradimo na encimatski način, s proteinazami, v raztopini ali v poliakrilamidnem gelu, in kemijski način (tekem vaje 5 boste izvedli cepitev s CNBr). Peptide v zmesi nato očistimo s pomočjo različnih kromatografskih in elektroforetskih metod ter jim določimo aminokislinsko zaporedje. Pravilno razvrščeni nam podajo celotno aminokislinsko sekvenco analiziranega proteina.

PE-A inkubirajte s proteinazo *Staphylococcus aureus* V-8 in endoproteinazo Lys-C v PA gelu (8.2.): alikvot z 200 µg PE-A (liofilizirano od prejšnje vaje) raztopite v 16 µL dH₂O in dodate 16 µL 2x nanašalnega pufra brez reducenta (skupaj je 32 µL). Na gel nanese po 10 µL te mešanice v 3 žepke: 1. za kontrolo, 2. za cepitev z V-8 in 3. za cepitev z Lys-C proteinazo. Po končani reakciji izvedite elektroforezo (2.) in prenos peptidov v tanku iz PA gela na PVDF membrano v električnem polju – western prenos (3.). Gel in membrano shranite do naslednje vaje, ko boste izvedli detekcijo peptidov v gelu in na membrani.

Odgovorite na vprašanja št. 8, 10, 11, 19 in 20!

5. VAJA - Detekcija peptidov v PA gelu in na PVDF membrani

Z barvanjem PA gelov (spoznali boste metodo barvanja s koloidnim srebrom, pri vaji 6 pa še s cinkovim kloridom v prisotnosti imidazola) in PVDF membran (CCB R250) lociramo proteine/polipeptide v gelu ali na membrani, ocenimo množino

materiala v gelu ali na membrani, analiziramo pa lahko tudi učinkovitost western prenosa.

Ocenite uspešnost western prenosa iz vaje 4 tako, da peptide, preostale v PA gelu po prenosu, detektirate s koloidnim srebrom (2.3.), peptide prenešene na PVDF membrano pa z barvilom CBB R250 (3.1.). Obarvane peptidne lise izrežite iz PVDF membrane in jih pripravite za sekvenčno analizo (3.1.1.).

Nastavite CNBr cepitev 100 μg PE-A (liofiliziran alikvot iz 3. vaje) (8.3.).

Odgovorite na vprašanja št. 9, 14 in 15!

6. VAJA – N-terminalna sekvenčna analiza proteinov

Sukcesivna razgradnja peptidov z N-terminalnega konca po Edmanovi metodi temelji na reakciji α -amino skupine peptida s PITC v alkalnem in selektivni cepitvi nastalega PTC-peptida z brezvodno trifluoroacetno kislino (TFA). Odcepi se anilintiazolinon (ATZ) N-terminalne aminokislina, skrajšan peptid pa v naslednjem ciklusu ponovno reagira s PITC. ATZ-aminokislina pred HPLC analizo na RP C18 koloni prevedemo v kislem v bolj stabilen derivat feniltiohidantoin (PTH) (Slika 10).

Vaše vzorce (peptide) smo analizirali na aminokislinskem sekvenatorju (10) in dobili določeno aminokislinsko zaporedje peptidov. Sekvenco boste s pomočjo računalnika primerjali z bazami sekvenc in na ta način identificirali protein, ki ste ga analizirali.

S pomočjo NaDS-PAGE (2.) analizirajte produkte cepitve PE-A s CNBr, ki ste jo nastavili v vaji 5. Za kontrolo nanesite na gel 100 μg izhodnega vzorca PE-A (liofiliziran alikvot iz 3. vaje) in standard velikosti. PA gel obarvajte s ZnCl_2 v prisotnosti imidazola (2.2.).

Odgovorite na vprašanje št. 12!

7. VAJA - Masna spektrometrija

Ionizacija velikih, polarnih, temperaturno občutljivih biomolekul z elektrosprejem (ES) in uporaba masnega spektrometra omogoča občutljivo in selektivno določanje molekulske mase in strukture peptidov, proteinov in drugih makromolekul. Ioni se tvorijo v ES z razprševanjem raztopljenih biomolekul v močnem električnem polju (4000 V). Pri tem se tvorijo ioni z več naboji. Z masnim spektrometrom ne izmerimo neposredno molekulske mase (M), ampak razmerje mase in naboja (m/z) posameznih ionov.

V tej vaji vam bomo predstavili masni spektrometer. Iz rezultatov meritev - masnih spektrov, boste izračunali molekularno maso nativnega in piridiletiranega proteina (11.3.) ter nato določili še število disulfidnih mostičkov v nativnem proteinu.

Ogledali si boste še laboratorija za določanje primarne in 3D strukture proteinov na IJS.

Odgovorite na vprašanji št. 21 in 22!

SKUPINA B

1. VAJA - Analiza osnovnih lastnosti proteina

Poznavanje osnovnih lastnosti proteina, ki mu določamo primarno strukturo, to je molekulske mase (M_r), izoelektrične točke (pI), števila in vrste podenot ter načina povezave med njimi, je osnovna informacija in vodilo za oblikovanje strategije sekvenčne analize.

V prvi vaji določite osnovne lastnosti proteina A.

1. Navidezno molekulsko maso nativnega proteina določite z gelsko kromatografijo pod nedestruktivnimi pogoji (1.1.).

2. S poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE) v prisotnosti detergenta natrijevega dodecilsulfata (NaDS), pod neredukcijskimi in redukcijskimi pogoji (2.), določite navidezno molekulsko maso denaturiranega proteina in ugotovite, če je protein sestavljen iz ene ali več podenot – enakih ali različnih – barvanje PA gela s CBB R250 (2.1). Vse 3 skupine pripravite 1 gel skupaj in ga pobarvajte s CBB R250. Vsaka skupina pripravi 2 vzorca svojega proteina: 5 μg proteina s koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ zmešate s 5 μL 2x nanašalnega pufru z reducentom, drugemu vzorcu pa dodate 2x nanašalni pufer brez reducenta. Na gela vzorce nanosite tako, da poleg standarda velikosti nanese protein A z in brez reducenta, nato protein B in še C.

3. Iz gela (predhodno pripravljen), pobarvanega s perjudno kislino in Schiffovim reagentom določite, ali je protein posttranslacijsko modificiran (glikoziliran).

4. Izoelektrično točko proteina A določite iz priloženega gela.

Odgovorite na vprašanja št. 1-5!

2. VAJA – Analiza cisteina in cistina v proteinu

Podatek o prisotnosti cisteinov v proteinu je pomemben, saj zahteva posebno pripravo vzorca za nadaljnjo sekvenčno analizo (vaja 3). Ugotovitev prisotnosti disulfidnih mostičkov (cistina) v proteinu zahteva določitev njihovega poteka.

Z uporabo Ellmanovega reagenta neznanemu proteinu določite število prostih in disulfidno vezanih Cys (4.). Delate v paru.

Odgovorite na vprašnji št. 6 in 7!

3. VAJA - Priprava proteinskega vzorca za sekvenčno analizo in aminokislinska analiza

Protein ponavadi pred določanjem primarne strukture razvijemo - denaturiramo. Če so v proteinu prisotne disulfidne vezi, le-te prekinemo z redukcijo. Proste -SH skupine potem alkiliramo. Tako

preprečimo njihovo re-oksidacijo, hkrati pa prevedemo cisteinske ostanke v derivate, ki jih lahko analiziramo. Z linearizacijo proteinske molekule se izpostavijo vsa potencialna cepitvena mesta. Z ustrezno modifikacijo lahko vnesemo tudi nova cepitvena mesta v molekulo. Podatek o aminokislinski sestavi proteina, ki mu določamo primarno strukturo, je zelo pomemben pri določanju strategije njegove fragmentacije.

500 µg proteina B denaturirajte in reducirajte (7.1.) ter vzorec alkilirajte z natrijevim jodoacetatom (7.3.). Karboksimetiliran protein B (CM-B) ločite od reagentov z RP HPLC (5.). Nanesite enkrat 200 µg vzorca, drugič 300 µg proteina. Prvi vzorec po HPLC analizi razdelite na dva dela, drugega pa na 3 dele. Vzorce bo asistent liofiliziral.

Odgovorite na vprašanja št. 13 in 16-18!

4. VAJA - Fragmentacija proteinov in analiza nastalih produktov

Metode določanja primarne strukture proteinov so omejenega dosega. V večini primerov so proteini tako dolgi, da jim ni mogoče z eno analizo določiti celotnega aminokislinskega zaporedja. Potrebno jih je razgraditi na manjše dele – peptide. Protein lahko razgradimo na encimatski način, s proteinazami, v raztopini ali v poliakrilamidnem gelu, in kemijski način. Peptide v zmesi nato očistimo s pomočjo različnih kromatografskih in elektroforetskih metod ter jim določimo aminokislinsko zaporedje. Pravilno razvrščeni nam podajo celotno aminokislinsko sekvenco analiziranega proteina.

Dvakrat 100 µg CM-B inkubirajte s tripsinom (8.1.1.). Reakcijo prekinite po 10 in 30 minutah. Tretji alikvot 100 µg CM-B inkubirajte s proteinazo *Staphylococcus aureus* V-8 (8.1.2.). Po končani reakciji reakcijsko zmes analizirajte na RP HPLC (5.) Zbirane frakcije vseh treh cepitev liofilizirajte in shranite za kasnejšo sekvenčno analizo.

Nastavite CNBr cepitev 100 µg CM-B (liofiliziran alikvot iz prejšnje vaje (8.3.).

Odgovorite na vprašanja št. 19 in 20!

5. VAJA - Analiza produktov cepitve proteina - detekcija peptidov

Z barvanjem PA gelov (spoznali boste metodo barvanja s cinkovim kloridom v prisotnosti imidazola, pri vaji 6 pa še s koloidnim srebrom) in PVDF membran (CCB R250) lociramo

proteine/polipeptide v gelu ali na membrani, ocenimo množino materiala v gelu ali na membrani, analiziramo pa lahko tudi učinkovitost western prenosa.

CM-B pred (100 µg liofiliziran alikvot iz 3. vaje) in po cepitvi s CNBr analizirajte z NaDS-PAGE (2.). Vzorca raztopite v 10,5µL dH₂O in vsakemu dodajte še 10µL 2x nanašalnega pufra (končni volumen posameznega vzorca je 21µL). Vzorca naneste dvakrat, na vsako polovico gela po 50 µg (to je 10µL) CM-B in polovico vzorca CM-B po cepitvi s CNBr (10µL). Na vsako stran gela nanese še standard velikosti. Po končani elektroforezi gel razrežite na dva dela. Eno polovico gela obarvajte s ZnCl₂ v prisotnosti imidazola (2.2.). Iz druge polovice gela prenesite proteine na PVDF membrano v električnem polju – prenos v tanku (3.). Po western prenosu gel in membrano shranite do naslednje vaje, ko boste izvedli detekcijo peptidov na obeh.

Odgovorite na vprašanja št. 8, 10, 11!

6. VAJA – N-terminalna sekvenčna analiza proteinov

Sukcesivna razgradnja peptidov z N-terminalnega konca po Edmanovi metodi temelji na reakciji α-amino skupine peptida s PITC v alkalnem in selektivni cepitvi nastalega PTC-peptida z brezvodno trifluoroacetno kislino (TFA). Odcepi se anilintiazolinon (ATZ) N-terminalne aminokislina, skrajšan peptid pa v naslednjem ciklusu ponovno reagira s PITC. ATZ-aminokislina pred HPLC analizo na RP C18 koloni prevedemo v kislem v bolj stabilen derivat feniltiohidantoin (PTH) (Slika 10).

Vaše vzorce (peptide) smo analizirali na aminokislinskem sekvenatorju (10) in dobili določeno aminokislinsko zaporedje peptidov. Sekvenco boste s pomočjo računalnika primerjali z bazami sekvenc in na ta način identificirali protein, ki ste ga analizirali.

Ocenite uspešnost western prenosa iz vaje 5 tako, da peptide, preostale v PA gelu po prenosu, detektirate s koloidnim srebrom (2.3.), peptide prenešene na PVDF membrano pa z barvilom CBB R250 (3.1.).

Odgovorite na vprašanja št. 9, 12, 14 in 15!

7. VAJA - Masna spektrometrija

Ionizacija velikih, polarnih, temperaturno občutljivih biomolekul z elektrosprejem (ES) in uporaba masnega spektrometra omogoča občutljivo in selektivno določanje molekulske mase in strukture peptidov, proteinov in drugih makromolekul. Ioni se tvorijo v ES z razprševanjem raztopljenih biomolekul v močnem električnem

polju (4000 V). Pri tem se tvorijo ioni z več naboji. Z masnim spektrometrom ne izmerimo neposredno molekulske mase (M), ampak razmerje mase in naboja (m/z) posameznih ionov.

V tej vaji vam bomo predstavili masni spektrometer. Iz rezultatov meritev - masnih spektrov, boste izračunali molekulsko maso nativnega in piridiletiranega proteina (11.3.) ter nato določili še število disulfidnih mostičkov v nativnem proteinu.

Ogledali si boste še laboratorija za določanje primarne in 3D strukture proteinov na IJS.

Odgovorite na vprašanji št. 21 in 22!

SKUPINA C

1. VAJA - Analiza osnovnih lastnosti proteina

Poznavanje osnovnih lastnosti proteina, ki mu določamo primarno strukturo, to je molekulske mase (M_r), izoelektrične točke (pI), števila in vrste podenot ter načina povezave med njimi, je osnovna informacija in vodilo za oblikovanje strategije sekvenčne analize.

V prvi vaji določite osnovne lastnosti proteina C.

1. S poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE) v prisotnosti detergenta natrijevega dodecilsulfata (NaDS), pod neredukcijskimi in redukcijskimi pogoji (2.), določite navidezno molekulsko maso denaturiranega proteina in ugotovite, če je protein sestavljen iz ene ali več podenot – enakih ali različnih – barvanje PA gela s CBB R250 (2.1). Vse 3 skupine pripravite 1 gel skupaj in ga pobarvajte s CBB R250. Vsaka skupina pripravi 2 vzorca svojega proteina: 5 μg proteina s koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ zmešate s 5 μL 2x nanašalnega pufru z reducentom, drugemu vzorcu pa dodate 2x nanašalni pufer brez reducenta. Na gela vzorce nanosite tako, da poleg standarda velikosti nanese protein A z in brez reducenta, nato protein B in še C.

2. Iz gela (predhodno pripravljen), pobarvanega s perjudno kislino in Schiffovim reagentom določite, ali je protein posttranslacijsko modificiran (glikoziliran).

3. Izoelektrično točko proteina C določite iz priloženega gela.

Odgovorite na vprašanja št. 1-5!

2. VAJA – Analiza cisteina in cistina v proteinu

Podatek o prisotnosti cisteinov v proteinu je pomemben, saj zahteva posebno pripravo vzorca za nadaljnjo sekvenčno analizo (vaja 3). Ugotovitev prisotnosti disulfidnih mostičkov (cistina) v proteinu zahteva določitev njihovega poteka.

Z uporabo Ellmanovega reagenta neznanemu proteinu določite število prostih in disulfidno vezanih Cys (4.). Delate v paru.

Odgovorite na vprašanja št. 6 in 7!

3. VAJA - Priprava proteinskega vzorca za sekvenčno analizo in aminokislinska analiza

Protein ponavadi pred določanjem primarne strukture razvijemo - denaturiramo. Če so v proteinu prisotne disulfidne vezi, le-te prekinemo z redukcijo. Proste -SH skupine potem alkiliramo. Tako preprečimo njihovo re-oksidacijo, hkrati pa prevedemo cisteinske ostanke v derivate, ki jih lahko analiziramo. Z linearizacijo

proteinske molekule se izpostavijo vsa potencialna cepitvena mesta. Z ustrezno modifikacijo lahko vnesemo tudi nova cepitvena mesta v molekulo. Podatek o aminokislinski sestavi proteina, ki mu določamo primarno strukturo, je zelo pomemben pri določanju strategije njegove fragmentacije.

Denaturirajte in reducirajte 400 µg proteina C (7.1.) ter vzorec alkilirajte s 4-vinil piridinom (7.2.). Vzorec nato razdelite v tri alikvote (2x100 µg in 200 µg). Piridiletilirani protein C (PE-C) je v vodnih raztopinah slabo topen, kar izkoristite za odstranitev reagentov s spiranjem oborine z vodo (6.).

Nastavite cepitev 100 µg PE-C s CNBr (vzamete alikvot 100µg) (8.3.).

Odgovorite na vprašanja št. 13 in 16-18!

4. VAJA - Analiza produktov cepitve proteina

*Metode določanja primarne strukture proteinov so omejenega dosega. V večini primerov so proteini tako dolgi, da jim ni mogoče z eno analizo določiti celotnega aminokislinskega zaporedja. Potrebno jih je razgraditi na manjše dele – peptide. Protein lahko razgradimo na kemijski način in encimatski način, s proteinazami, v raztopini ali v poliakrilamidnem gelu (tekem vaje 5 boste izvedli cepitev s *Staphylococcus aureus* V-8 proteinazo in endoproteinazo Lys-C v PA gelu). Peptide v zmesi nato očistimo s pomočjo različnih kromatografskih in elektroforetskih metod ter jim določimo aminokislinsko zaporedje. Pravilno razvrščeni nam podajo celotno aminokislinsko sekvenco analiziranega proteina.*

PE-C in PE-C po cepitvi s CNBr analizirajte z NaDS-PAGE (2.). Na eno polovico gela nanesite 3x po 50 µg PE-C (200µg alikvot iz prejšnje vaje raztopite v 21µL dH₂O in dodajte 21µL 2x NaDS neredukcijskega nanašalnega pufra, na gel nanesete po 10µL/žepek). Na drugo polovico gela nanesite polovico PE-C vzorca po cepitvi s CNBr in 50 µg izhodnega vzorca PE-C (10µL). Po končani elektroforezi gel razdelite na dva dela. Prvo polovico gela obarvajte s ZnCl₂ v prisotnosti imidazola (2.2.). Izrežite del gela s fragmentom največje mase pri vseh 3 vzorcih PE-C in jih shranite za naslednjo vajo na -20°C. Iz druge polovice gela prenesite proteine na PVDF membrano v električnem polju – western prenos v tanku(3.). Gel in membrano shranite do naslednje vaje, ko boste izvedli detekcijo peptidov na obeh.

Odgovorite na vprašanja št. 8, 10, 11, 12!

5. VAJA - Detekcija peptidov v PA gelu in na PVDF membrani ter fragmentacija proteinov v PA gelu

Z barvanjem PA gelov (spoznali boste metodo barvanja s koloidnim srebrom, pri vaji 4 pa ste že spoznali metodo barvanja s cinkovim kloridom v prisotnosti imidazola) in PVDF membran (CBB R250) lociramo proteine/polipeptide v gelu ali na membrani, ocenimo množino materiala v gelu ali na membrani, analiziramo pa lahko tudi učinkovitost western prenosa.

Ocenite uspešnost western prenosa iz vaje 4 tako, da peptide, preostale v PA gelu po prenosu, detektirate s koloidnim srebrom (2.3.), peptide prenešene na PVDF membrano pa z barvilom CBB R250 (3.1.). Obarvane peptidne lise izrežite iz PVDF membrane in jih pripravite za sekvenčno analizo (3.1.1.).

Izvedite razgradnjo PE-C v PA gelu s proteinazo *Staphylococcus aureus* V-8 in endoproteinazo Lys-C (8.2.). Za vsako cepitev uporabite po 50 μ g PE-C – protein, ki ste ga v prejšnji vaji izrezali iz gela, tretji košček gela je kontrola, ki jo tudi nanesete na gel. Po končani elektroforezi gel pobarvajte s CBB R250 (2.1.).

Odgovorite na vprašanja št. 9, 14, 15, 19 in 20!

6. VAJA – N-terminalna sekvenčna analiza proteinov

Sukcesivna razgradnja peptidov z N-terminalnega konca po Edmanovi metodi temelji na reakciji α -amino skupine peptida s PITC v alkalnem in selektivni cepitvi nastalega PTC-peptida z brezvodno trifluoroacetno kislino (TFA). Odcepi se anilinoiazolinon (ATZ) N-terminalne aminokislina, skrajšan peptid pa v naslednjem ciklusu ponovno reagira s PITC. ATZ-aminokislina pred HPLC analizo na RP C18 koloni prevedemo v kislem v bolj stabilen derivat feniltiohidantoin (PTH) (Slika 10).

Vaše vzorce (peptide) smo analizirali na aminokislinskem sekvenatorju (10) in dobili določeno aminokislinsko zaporedje peptidov. Sekvenco boste s pomočjo računalnika primerjali z bazami sekvenc in na ta način identificirali protein, ki ste ga analizirali.

Analizirajte drugo polovico vzorca PE-C po CNBr cepitvi s HPLC (5.). ZA primerjavo med cepljenim in necepljenim vzorcem pred tem na RP HPLC nanesite še 50 μ g PE-C po obarjanju. Suh vzorec raztopite v 10 μ L dH₂O, odpipetirajte 5 μ L (50 μ g) in mu dodajte 500 μ L topila A, odcentrifugirajte in nanesite na kolono. PE-C po CNBr cepitvi (50 μ g) raztopite v 10 μ L dH₂O in dodajte 500 μ L topila A.

7. VAJA - Masna spektrometrija

Ionizacija velikih, polarnih, temperaturno občutljivih biomolekul z elektrosprejem (ES) in uporaba masnega spektrometra omogoča

občutljivo in selektivno določanje molekulske mase in strukture peptidov, proteinov in drugih makromolekul. Ioni se tvorijo v ES z razprševanjem raztopljenih biomolekul v močnem električnem polju (4000 V). Pri tem se tvorijo ioni z več naboji. Z masnim spektrometrom ne izmerimo neposredno molekulske mase (M), ampak razmerje mase in naboja (m/z) posameznih ionov.

V tej vaji vam bomo predstavili masni spektrometer. Iz rezultatov meritev - masnih spektrov, boste izračunali molekulsko maso nativnega in piridiletiranega proteina (11.3.) ter nato določili še število disulfidnih mostičkov v nativnem proteinu.

Ogledali si boste še laboratorija za določanje primarne in 3D strukture proteinov na IJS.

Odgovorite na vprašanji št. 21 in 22!

Metode in materiali

1. Gelska kromatografija

1.1. Določanje navidezne relativne molekulske mase (M_r)

V ločitvenem območju kolone sta logaritem M_r proteina in njegov elucijski volumen v linearni zvezi ($\log M_r \propto V_{el}$).

Materiali

- gel: Sephacryl S-300;
- mobilna faza: 0.1 M Na_3PO_4 , pH 7.0, 0.2 M NaCl;
- vzorec: 200 μL raztopine proteina s koncentracijo ~ 10 mg/mL.

Kolona, napolnjena z gelom Sephacryl S-300, je predhodno umerjena s proteini znanih molekulskih mas.

1. Stehtajte 20 epruvet in nanje napišite maso.
2. Z vrha kolone s Pasteurjevo pipeto odstranite čimveč mobilne faze – pufra nad gelom, nato pa odprite iztok in pustite, da pufer ponikne v gel.
3. Zaprite iztok iz kolone. Na gel s Pasteurjevo pipeto previdno nanesite 200 μL raztopine neznanega proteina (koncentracija proteina 10 mg/mL), odprite iztok in počakajte, da vzorec ponikne v gel.
4. Zaprite iztok in na gel nanesite 200 μL pufra. Iztok ponovno odprite. V tem trenutku začnite loviti frakcije v stehtane epruvete.
5. Ko bo v gel poniknil ves pufer, previdno dodajte novega, nato pa napolnite celoten rezervoar nad gelom. Pufer med kromatografijo sproti dodajajte. Prvih 5 mL tekočine lovite kar v eno epruveto, nato pa zbirajte frakcije na 3.5 minute (≈ 800 μL). Poberite glede na umeritev zadostno število frakcij. *Pri koloni z volumnom ≈ 20 mL je potrebno zbrati okoli 20 epruvet.*
6. Po končani kromatografiji stehtajte polne epruvete, odštejte maso praznih in tako določite maso oziroma volumen tekočine v njih.
7. Ko zaključite s tehtanjem, izmerite absorbanco posameznih frakcij pri 280 nm. Iz dobljenih podatkov in umeritvene krivulje za dano kolono, določite navidezno molekulske maso neznanega proteina.

1.2. Razsoljevanje proteinov z gelsko filtracijo na koloni PD10

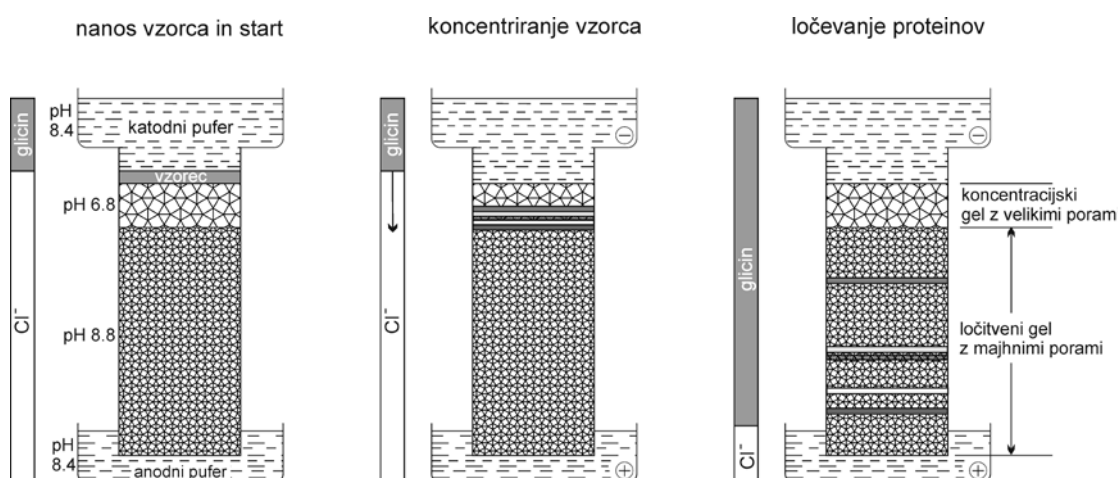
Materiali

- gelska kolona PD10;
- pufrska raztopina željene sestave (mobilna faza);
- proteinski vzorec.

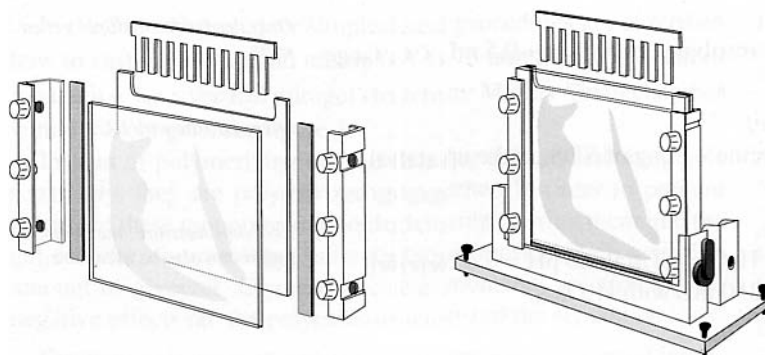
1. Odstranite zgornji in spodnji pokrov kolone.
2. Kolono uravnajte s približno 25 mL pufrske raztopine.
3. Na kolono nanesite proteinski vzorec. Če je volumen vzorca manjši od 2.5 mL, ga pred nanosom do tega volumna dopolnite s pufrom. Eluat s kolone zavržite.
4. Proteine eluirajte s 3.5 mL pufra.

2. NaDS-PAGE

Ta vrsta elektroforeze ločuje proteine na osnovi njihove velikosti oziroma mase (M_r). Poleg proteina neznane M_r na gelu analiziramo zmes proteinov z znanimi M_r (standardi M_r). Umeritvena krivulja predstavlja razmerje med $\log M_r$ standardnih proteinov in razdaljami, ki jih pod danimi pogoji le ti prepotujejo. S to metodo določimo M_r proteina v območju od 10 000 do 300 000 ($\pm 5 - 10 \%$). Ta metoda se v praksi pogosto uporablja, saj je enostavno izvedljiva, občutljiva in poceni.



Slika 1: Shematski prikaz osnovnih principov elektroforeze.



Slika 2: Priprava modela za vlivanje poliakrilamidnega gela.

Materiali

- ločitveni gel (15 %):

Za 2 gela Hofer SE 250, debeline 0.75 mm pripravite 10 mL raztopine:

dH ₂ O	3,6 mL
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	2,5 mL
10 % (m/v) NaDS	100 µL
40 % (m/v) akrilamid/bisakrilamid	3,75 mL
10 % (m/v) APS	50 µL
TEMED	5 µL

- koncentracijski gel (4 %):

Za 2 gela Hofer SE 250, debeline 0.75 mm pripravite 5 mL raztopine:

dH ₂ O	3,175 mL
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	1,25 mL
10 % (m/v) NaDS	50 µL
40 % (m/v) akrilamid/bisakrilamid	0,5 mL
10 % (m/v) APS	25 µL
TEMED	5 µL

- 10 x koncentriran NaDS elektroforezni pufer: 10 g NaDS, 144 g glicin, 30.3 g Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) na 1 L dH₂O;

- 2 x koncentriran nanašalni pufer (redukcijski): 2.5 mL 0.5 M Tris-HCl, pH = 6.8, 4 mL 10 % (m/v) NaDS, 2 mL glicerol, 2 mg bromfenol modro, 310 mg DTT, dopolnite do 10 mL z dH₂O;

- 2 x koncentriran nanašalni pufer (neredukcijski): 2.5 mL 0,5 M Tris-HCl, pH = 6.8, 4 mL 10 % (m/v) NaDS, 2 mL glicerol, 2 mg bromfenol modro, dopolnite do 10 mL z dH₂O;

- proteinski vzorec;

- proteinski standardi.

Priprava gela:

Obvezno delajte v rokavicah!

1. Po navodilih proizvajalca sestavite model za vlivanje gela.
2. Pripravite raztopino akrilamida ustrezne sestave, jo razplinite s pomočjo vodne črpalke in ji tik pred vlitjem v model dodajte še iniciator, APS, in katalizator polimerizacije, TEMED.

Kisik raztopljen v raztopini akrilamida inhibira reakcijo polimerizacije, ker zajema proste radikale.

Najprej vlijte ločitveni gel do ustrezne višine. Preverite, če model dobro tesni!

3. Na raztopino akrilamida s kapalko nanesite plast nasičene raztopine n-butanola v vodi, kar uravna površino gela ob straneh (meniskus) in prepreči inhibicijo polimerizacije akrilamida na površini z zračnim kisikom.

Gel polimerizira v ~1 uri kar ugotoviš s pojavom ostre meje med gelom in raztopino n-butanola v vodi nad njo.

Odlijte plast nasičene raztopine n-butanola v vodi, sperite prostor nad gelom z vodo in ga posušite. Vlijte koncentracijski gel, vanj pa vstavite glavniček za formiranje nanašalnih žepkov. Po ~1 uri je gel pripravljen za elektroforezo.

Elektroforeza:

1. Pripravljen gel (15 %) vpnite v elektroforezno aparaturo.
2. V katodni del aparature nalijte elektroforezni pufer. Preverite, če tesnila dobro tesnijo. Nalijte pufer še v anodni del. Prepričajte se, če sta obe elektrodi popolnoma potopljeni v pufer. Previdno izvlecite glavniček iz koncentracijskega gela in pazite, da ne deformirate nanašalnih žepkov.
3. Priprava vzorcev in nanos:
 - Proteinski vzorci morajo biti raztopljeni v vodi ali nanašalnem pufri, če ne jih je potrebno pred elektroforezo dializirati.
 - a) *Določevanje molekulske mase proteina:*
 - Koncentrirano raztopino neznanega proteina (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 10 x razredčite z vodo (končna koncentracija proteina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).
 - Za analizo pod redukcijskimi pogoji 5 μL vzorca (5 μg proteina) dodajte 5 μL 2 x koncentriranega vzorčnega redukcijskega pufra.
 - Za analizo pod neredukcijskimi pogoji 10 μL vzorca (10 μg proteina) dodajte 10 μL 2 x koncentriranega vzorčnega neredukcijskega pufra.
 - Meja detekcije je pod neredukcijskimi pogoji analize ponavadi nekoliko višja!*
 - b) *Analiza produktov kemijske cepitve (CNBr) proteinov:*
 - Vzorcju dodajte 5 μL vode in 5 μL 2 x koncentriranega vzorčnega neredukcijskega pufra.
 - Masne standarde pripravite tako, da 1 μL koncentrirane raztopine standardov dodate 19 μL vzorčnega pufra (redukcijskega ali neredukcijskega).
 - Vzorce denaturirajte s 5 minutnim segrevanjem v vreli vodi.
 - Centrifugirajte vzorce z namizno ependorf centrifugo (14000 min^{-1} , 2 minuti).
 - Vzorce s pipeto, s primerno tankim nastavkom, nanesite v žepke nanašalnega gela.
 - Pri nanašanju si lahko pomagata s šablono, saj so žepki včasih zelo slabo vidni. Vzorce nanašajte čim hitreje - tako preprečite večjo difuzijo vzorca. Če je vzorec manj kot je nanašalnih žepkov, zaradi lepšega potovanja, v preostale nanesite vzorčni pufer. Če na istem gelu analizirate vzorce pod redukcijskimi in neredukcijskimi pogoji, naj bo med njimi vsaj za dve liniji razmika.*
4. Poženite analizo. Začetni tok naj bo 25 mA. Če hkrati analizirate dva gela, mora biti tok dva-kraten. Ko fronta oziroma barvilo, ki je sestavni del vzorčnega pufra, doseže dno gela, prekinite analizo.
5. Razstavite aparaturo. Pri razstavljanju sendviča z gelom pazite, da ne razbijete stekel in ne raztrgate gela. Z geli, ki so močno zamreženi (>10 %) ponavadi ni težav, manj zamreženi geli pa se zelo radi trgajo.

Da čimbolj zmanjšate verjetnost N-terminalnega blokiranja proteina med elektroforezo, kar je bistvenega pomena za uspešno sekvenčno analizo, naredite naslednje:

1. Starajte PA gel pred nanosom vzorcev pri sobni temperaturi čez noč ali v hladilniku 24 h.
 - Tako se uničijo vsi prosti radikali, ki drugače blokirajo N-terminal proteina.*

- Uporabljajte glicerol HPLC-čistoče za pripravo vzorčnega pufra. Če je možno, vzorca pred nanosom ne kuhajte, ampak le segrevajte 10 min pri 37°C.
Tako minimizirate vsebnost aldehida v vzorcu, ki blokira N-terminal proteina.
- Raztopini akrilamida naj bo dodan anionski izmenjevalec (1 mg/100 mL) (napr. Servin Serdolit MB-6).
Nase veže akrilno kislino, ki postopoma nastaja iz akrilamida in lahko blokira N-terminal proteina.
- Pri pripravi gela uporabite najmanjšo možno količino APS-a in TEMED-a, da minimizirate kemijsko oksidacijo aminokislin.

2.1. Barvanje PA gela z barvilom CBB R250

Meja detekcije metode je 0.3 - 1 µg proteina na liso.

Materiali

- raztopina barvila Coomassie brilliant blue R250 (CBB R250): 30 % (v/v) EtOH, 7 % (v/v) AcOH, 0.025 % (m/v) CBB R250;
- razbarvalna raztopina: 30 % (v/v) EtOH, 7 % (v/v) AcOH.

- Po končani elektroforezi gel barvajte 20 minut v raztopini CBB R250.
- Gel prenesite v razbarvalno raztopino. Razbarvalno raztopino večkrat zamenjajte, dokler lise ne postanejo jasno vidne.

2.2. Barvanje PA gela s ZnCl₂ v prisotnosti imidazola

Meja detekcije metode je 1 - 10 ng proteina na liso.

Materiali

- 0.2 M raztopina imidazola v 0.1 % (m/v) NaDS [0.68 g imidazola / 50 mL 0.1% (m/v) NaDS];
- 0.2 M raztopina ZnCl₂ [1.36 g ZnCl₂ / 50 mL vode].

- Po končani elektroforezi gel namakajte 2-3 minute v 50 mL vode.
- Vodo odlijte, dodajte 50 mL 0.2 M raztopine imidazola, ki vsebuje 0.1% (m/v) NaDS in rahlo stresajte 15 minut.
Pri tem se topne sestavine iz elektroforeznega pufra (glicin, Tris) odstranijo iz gela in zamenjajo z imidazolom. Čas inkubacije je lahko tudi daljši. Če je krajši (5 - 10 minut), ostane občutljivost metode nespremenjena, toda ozadje je manj intenzivno obarvano (manjši je kontrast).
- Odlijte imidazolno raztopino, dodajte 50 mL 0.2 M ZnCl₂ in intenzivno stresajte 30-60 s oziroma dokler se ne pojavijo prozorne in brezbarvne proteinske lise na belem motnem ozadju.
Cink tvori topne komplekse z NaDS-proteinskim kompleksom in nastanejo prozorne proteinske lise, medtem ko je ozadje motno zaradi nastajanja netopnega kompleksa imidazol-NaDS-cink. Nastajanje proteinskih lis lažje spremljate, če posodo z gelom položite na temno podlago.

4. Razvijanje prekinete tako, da raztopino odlijete. Prekomernemu obarvanju gela se izognete s 3-4-kratnim spiranjem gela po 15 sekund s 50 mL vode.
5. Gel hranite v vodi. Proteinske lise lahko izrežete in shranite pri +4 °C.

2.3. Barvanje PA gela s koloidnim srebrom

Metoda temelji na visoki afiniteti proteinov do kationov, v tem primeru Ag^+ ionov in visoki avtokatalitičnosti redukcije srebra. Meja detekcije metode je 2-5 ng proteina na liso.

Materiali

- fiksirna raztopina: 30 % (v/v) EtOH, 7 % (v/v) AcOH;
- razvijalec: 50 μL formalina / 100 mL 3 % (m/v) Na_2CO_3 ;
Formalin je 38 % (v/v) formaldehid v vodi.
- raztopina DTT (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$);
- 0.1 % (m/v) sveža raztopina AgNO_3 [0.1 g AgNO_3 / 100 mL vode];
- citronska kislina.

1. Gel potopite v fiksirno raztopino za 20-30 minut.
2. Gel sperite z večimi menjavami vode (20-60 minut), da odstranite kislino in topne komponente, ki imajo visoko afiniteto do Ag^+ ionov.
Bolje sperete, bolj prozorno je ozadje in večja je občutljivost. Temeljito spiranje je nujno, saj imajo NaDS, Cl⁻ ioni in aminokislina visoko afiniteto do Ag^+ ionov.
3. Dodajte okoli 100 mL raztopine DTT in stresajte 30 minut (senzibilizacija).
4. Gel 2 x sperite z vodo (vsakič po 1 minuto).
5. Gel stresajte 1.5 ure v 0.1 % (m/v) raztopini AgNO_3 , ki jo pripravite tik pred uporabo.
6. Vmes pripravite razvijalec (sestavo glej zgoraj). Zatehtajte tudi 5-10 g trdne citronske kisline.
7. Odlijte raztopino AgNO_3 , sperite gel z vodo in nato še 2 x na hitro z razvijalcem.
8. Dolijte razvijalec in ob stresanju razvijajte. Razvijalec zamenjajte, ko (če) postane rumen.
9. Ko so lise dovolj intenzivne, prekinite razvijanje z dodatkom 5-10 g trdne citronske kisline.

2.4. Barvanje s perjudno kislino in Schiffovim reagentom

Po PAGE v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata s to metodo specifično detektiramo proteine, ki so glikozilirani. Perjudna kislina oksidira ogljikove hidrate, tvorijo se aldehidi, ki reagirajo s Schiffovim reagentom (fuksin = 4-((aminofenil)(4-imino-2,5-cikloheksadien-1-iliden)metil)-2-metil-benzenamin), tako da nastane produkt rožnate barve.

Materiali

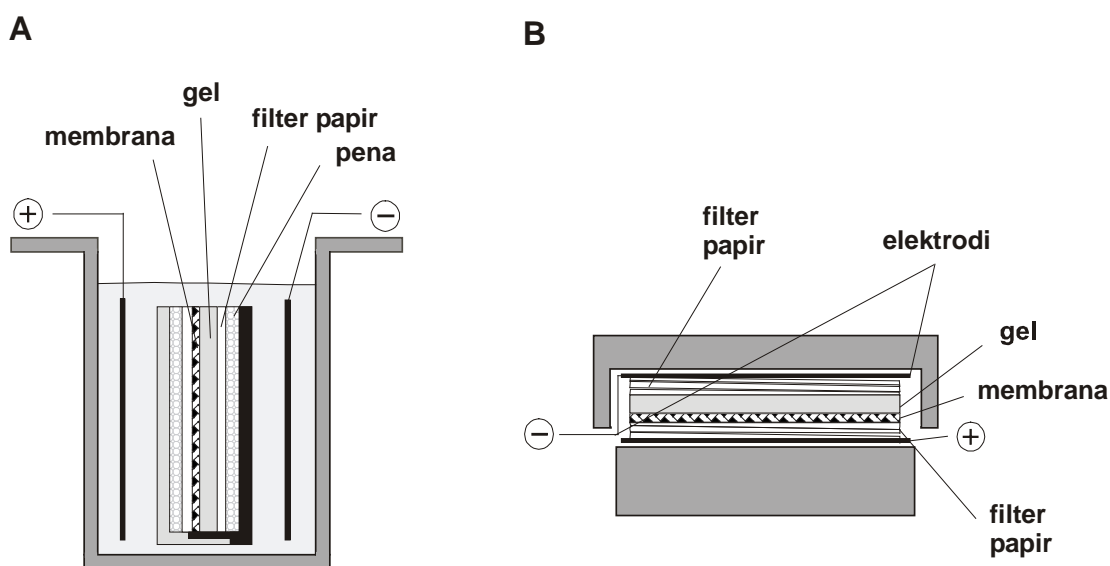
- 20 % (m/v) raztopina trikloroacetne kisline
- 0.7 % (m/v) perjudna kislina, 5 % (v/v) očetna kislina
- Schiffov reagent
- 5 % (m/v) kalijev disulfit, 5 % (v/v) očetna kislina

- 5 % (v/v) etanol, 7.5 % (v/v) očetna kislina

1. Po končani elektroforezi proteine v gelu fiksirajte v 20 % (m/v) raztopini trikloroocetne kisline - stresajte 20 min.
2. Gel spirajte v destilirani vodi 10 min.
3. Tik pred uporabo pripravite 50 mL 0.7 % (m/v) perjodne kisline v 5 % (v/v) očetni kislini. V tej raztopini stresajte gel 30 min.
4. Nato gel dvakrat po 2 min spirajte v destilirani vodi.
5. Gel prenesite v petrijevko z raztopino Schiffovega reagenta - stresajte 30 min.
6. Gel prenesite v 50 mL sveže pripravljene raztopine 5 % (m/v) kalijevega disulfita v 5 % (v/v) očetni kislini - stresajte 10 min.
7. Gel stresajte v 5 % (v/v) etanolu in 7.5 % (v/v) očetni kislini 10 min. Postopek ponovite s svežo raztopino. Po 5 min prenesite gel v destilirano vodo. Mesta, kjer se v gelu nahajajo glikoproteini so obarvana rožnato.

3. Prenos proteinov iz PA gela na PVDF membrano v električnem polju (western prenos)

Elektroforetska separacija proteinov je metoda z zelo visoko ločljivostjo, še zlasti, če jo izvajamo v dveh dimenzijah. Neposredno določanje aminokislinskega zaporedja proteinskega vzorca v PA gelu z Edmanovo degradacijo pa ni možno. Ena od poti za izvedbo analize vodi preko prenosa proteina iz gela na inertni nosilec, PVDF membrano, ki je kemijsko odporna na reagente in topila Edmanove razgradnje. Prenos proteina na membrano (western prenos) je lahko kapilaren ali hitrejši, v električnem polju. Kvaliteta prenosa v električnem polju je odvisna od precej dejavnikov. Na prenos vplivajo lastnosti polipeptida (velikost, naboj), zamreženost gela, trajanje prenosa, sestava in pH prenašalnega pufra ter električna napetost oz. tok pri prenosu. Poznamo dve izvedbi: prenos v tanku in polsuhi (semidry) prenos.



Slika 3: Sistemi za elektroforezni prenos proteinov iz poliakrilamidnih gelov. (a) Prenos v tanku. (b) Polsuhi prenos.

3.a Prenos proteinov v tanku

Materiali

- Towbinov prenašalni pufer: 25 mM Tris (3.03g/L), 192 mM Gly (14.41 g/L), 0.1 % (m/v) NaDS (1 g/L), voda do 800 mL; 200 mL MeOH (20 %), dopolni z vodo do 1L; izmeri pH - brez uravnavanja naj bi znašal 8.2-8.4;
- fiksirna raztopina: 30 % (v/v) EtOH, 7 % (v/v) AcOH;
- Whatmann 3MM filter papir;
- PVDF membrana;

Za prenos proteinov z namenom sekveniranja so primerne PVDF membrane: Sequi-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad) ali IMMOBILON PSQ (MILLIPORE). Nitroceluloza ni primeren nosilec za sekveniranje, ker ni kemijsko inertna.

1. PA gel po elektroforezi ustrezno obrežite in izmerite njegove dimenzije. Odrežite zgornji desni vogal gela, da boste pravilno orientirali gel.
2. Gel prenesite v Towbinov pufer (glej zgoraj) in ga namakajte 5-15 minut, da zavzame končne dimenzije.
Predolgo namakanje ni dobro, ker lahko pride do difuzije vzorcev.
3. Izrežite 2 kosa Whatmann 3MM filter papirja in 1 kos PVDF membrane, vse v dimenzijah gela.
PVDF membrano prijemaj na konceh s pinceto.
4. Whatmann 3MM filter papirje in 2 blazinici iz tanka namočite v Towbinovem pufru.
5. PVDF membrano omočite v MeOH, nato jo namočite v Towbinov pufer. PVDF membrano za orientacijo zarežite na istem koncu kot gel.
6. Plastično mrežo iz tanka razprite. Na črni del položite omočeno blazinico, nanjo položite omočen filter papir, nanj postavite gel tako, da se sprednja stran dotika filter papirja (odrezani rob je zgoraj levo), na gel položite pravilno orientirano membrano (odrezan zgornji rob), nanjo položite omočen filter papir in se omočeno blazinico. Vmes večkrat povaljajte s stekleno epruveto ali plastično pipeto, da odstranite vse zračne mehurčke med plastmi. Ti bi namreč preprečili prenos proteinov.
7. Plastično mrežo zaprete in jo postavite v tank tako, da je črni del mreže ob črnem delu tanka. V tank daste magnetni mešalček in posodico z ledom, da se pufer med prenosom ne segreva preveč. Do vrha dolijete Towbinov pufer.
Proteini so v Towbinovem pufru negativno nabiti in v električnem polju potujejo proti anodi (+).
8. Tank pokrijete tako, da sta elektrodi na ustreznem delu (rdeča na rdečo, črna na črno) in priključite električno napetost (tok na začetku je 300mA). Prenos poteka 60 minut pri sobni T.
9. Po izteku časa razstavite sendvič. Gel dajte v fiksirno raztopino. Sledilo bo barvanje s koloidnim srebrom.
10. PVDF membrano dobro sperite z vodo in jo posušite na zraku. Pobarvali jo boste s CBB R250.

3.b Polsuhi (semidry) prenos proteinov

Materiali

- Towbinov prenašalni pufer: 25 mM Tris (3.03g/L), 192 mM Gly (14.41 g/L), 0.1 % (m/v) NaDS (1 g/L), voda do 800 mL; 200 mL MeOH (20 %), dopolni z vodo do 1L; izmeri pH - brez uravnavanja naj bi znašal 8.2-8.4;
- fiksirna raztopina: 30 % (v/v) EtOH, 7 % (v/v) AcOH;
- Whatmann 3MM filter papir;
- PVDF membrana;

Za prenos proteinov z namenom sekveniranja so primerne PVDF membrane: Sequi-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad) ali IMMOBILON PSQ (MILLIPORE). Nitroceluloza ni primeren nosilec za sekveniranje, ker ni kemijsko inertna.

1. PA gel po elektroforezi ustrezno obrežite in izmerite njegove dimenzije. Označite en vogal gela tako, da ga odrežete.
2. Gel prenesite v Towbinov pufer (glej zgoraj) in ga namakajte 5-15 minut, da zavzame končne dimenzije.
Predolgo namakanje ni dobro, ker lahko pride do difuzije vzorcev.
3. Izrežite 2 x po 3 kose Whatmann 3MM filter papirja in PVDF membrano, vse v dimenzijah gela.
PVDF membrano prijemaj na konceh s pinceto.
4. Whatmann 3MM filter papir namočite v Towbinovem pufru.
5. PVDF membrano omočite v MeOH, nato jo namočite v Towbinov pufer. PVDF membrano za orientacijo zarežite na istem koncu kot gel.
6. Z anode, ki jo omakate nekaj minut z vodo, le-to odlijte, in jo omočite s Towbinovim pufrom.
Proteini so v Towbinovem pufru negativno nabiti in v električnem polju potujejo proti anodi (+).
7. Na grafitno anodo položite tri Whatmann 3MM filter papirje namočene v Towbinovem pufru, na te pa PVDF membrano.
8. Na PVDF membrano položite gel, tako da sta odrezana konca na istem mestu, na vrh pa še tri namočene Whatmann 3MM filter papirje.
9. Sendvič narahlo povaljajte s čisto pipeto ali epruvetko, da izženete ves zrak med plastmi.
Tam kjer je zrak, ne pride do prenosa!
10. Na sendvič enakomerno položite ploščato grafitno katodo (pokrijete aparaturo). Obtežite jo s polno litrsko steklenico, kar izboljša prenos. Priključite napetost. Pogoji prenosa so: tok = površina gela x 0.8 mA/cm², 60 minut, sobna T.
11. Po izteku časa razstavite sendvič. Gel dajte v fiksirno raztopino. Sledilo bo barvanje s koloidnim srebrom.
12. PVDF membrano dobro sperite z vodo in jo posušite na zraku. Pobarvali jo boste s CBB R250.

3.1. Detekcija polipeptidov na PVDF membrani z barvilom CBB R250.

Materiali

- 50 % (v/v) MeOH;
- barvalna raztopina: 1 g/L CBB R250 (0.1 %), 400 mL/L MeOH (40 %), 5 mL/L AcOH (0.5%), 595 mL/L H₂O (59.5 %);

Barvalna raztopina je lahko tudi brez AcOH!

- razbarvalna raztopina: 400 mL/L EtOH (40 %), 600 mL/L H₂O (60 %).

1. PVDF membrano omočite v 50 % (v/v) MeOH.
2. Membrano barvajte na stresalniku največ 1 minuto v 30-50 mL barvalne raztopine (sestavo glejte zgoraj).
3. Odlijte barvalno raztopino in membrano razbarvajte z razbarvalno raztopino (sestavo glejte zgoraj), ki jo večkrat zamenjate, dokler ozadje ni belo in lise lepo vidne.
4. Membrano dobro sperite z več menjavami vode in jo posušite na zraku.

3.1.1. Priprava PVDF vzorca za sekvenčno analizo

1. Iz PVDF membrane z britvico izrežite lise, ki jih nameravate sekvenirati. *Vzorci na PVDF so na -20 °C stabilni mesece brez opaznega vpliva na začetni in stopenjski izkoristek sekveniranja. Pogoji za uspešno sekveniranje vzorca na PVDF membrani je, da so proteini na membrani vidni po barvanju s CBB R250, Ponceau S ali Amido Black.*
2. PVDF membrano z vzorcem pred nanosom na sekvenator dobro sperite (odstranitev prašnih delcev in soli) in temeljito razbarvajte tako, da jo najprej spirate v 1 mL H₂O, nato v 1 mL 0.2 % (v/v) trietilamina v 50 % (v/v) MeOH in nazadnje še v 1 mL MeOH.

4. Določitev števila prostih in disulfidno vezanih cisteinov v proteinu z Ellmanovim reagentom

4.1. Izdelava umeritvene krivulje za kvantitativno določitev Cys

Delate v paru. En študent naredi umeritveno krivuljo, drugi prične z nalogo 4.3.

Materiali

- 10 mM sveža raztopina Cys;
- 10 M urea v 0.5 M Tris/HCl, pH 8;
- 0.5 M Tris/HCl, pH 8;
- 6 mM Ellmanov reagent (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojska kislina) ali DTNB) v etanolu

1. Pripravite 10 mM svežo raztopino Cys.
2. Z razredčevanjem izhodne raztopine z destilirano vodo pripravite po 150 µL standardne raztopine koncentracij: 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 in 2.1 mM. Za izdelavo umeritvene krivulje boste porabili po 0.1 mL posamezne raztopine.
3. Pripravite 8 epruвет, eno za slep vzorec, ostalih sedem pa za standardne raztopine Cys. V vsako epruveto odmerite po 2.3 mL 10 M uree v 0.5 M Tris/HCl, pH 8, nato pa še 0.1 mL 6 mM Ellmanovega reagenta v etanolu in 0.5 mL destilirane vode. Nazadnje dodajte v vsako epruveto po 0.1 mL standardnih raztopin Cys. V epruveto s slepim vzorcem dajte namesto

raztopine s Cys 0.1 mL destilirane vode. Vrstni red dodajanja sestavin reakcijske zmesi ne vpliva na rezultat meritve.

4. Po 10 minutah inkubacije na sobni temperaturi izmerite absorbanco vzorcev pri 412 nm (A_{412}) proti slepemu vzorcu. Na osnovi rezultatov meritev izdelajte umeritveno krivuljo.

4.2. Določitev števila prostih Cys v nativnem (A) in denaturiranem (B) proteinu

Materiali

- analizirani protein (10 mg/mL);
- 0.5 M Tris/HCl, pH 8;
- 6 mM Ellmanov reagent v etanolu;
- 10 M urea v 0.5 M Tris/HCl, pH 8.

- (A)1. 0.6 mL raztopine analiziranega proteina z relativno molekularno maso 66 400 koncentracije 10 mg/mL dodajte 2.3 mL 0.5 M Tris/HCl, pH 8, nato pa še 0.1 mL 6 mM Ellmanovega reagenta. V slepo probo namesto proteina dodajte destilirano vodo.
2. Vzorca inkubirajte na sobni temperaturi 10 minut, nato pa pomerite njuni A_{412} proti slepi probi. S pomočjo umeritvene krivulje določite število prostih Cys v neznanem nativnem proteinu.
- (B)1. 0.6 mL raztopine analiziranega proteina s koncentracijo 10 mg/mL dodajte 2.3 mL 10 M uree v 0.5 M Tris/HCl, pH 8.
2. Vzorec inkubirajte na sobni temperaturi 15 minut, da protein denaturira, nato pa dodajte 0.1 mL 6 mM Ellmanovega reagenta. V slepo probo namesto proteina dodajte destilirano vodo.
3. Vzorca inkubirajte na sobni temperaturi 10 minut, nato pa pomerite njuni A_{412} proti slepi probi. S pomočjo umeritvene krivulje določite število prostih Cys v neznanem denaturiranem proteinu.

Koncentracijo proteina preverite tako, da 100 μ L raztopine proteina s koncentracijo 10 mg/mL razredčite z vodo do 1000 μ L in izmerite absorbanco pri 280 nm (A_{280}) proti vodi. A_{280} raztopine analiziranega proteina s koncentracijo 1 mg/mL je 0.67 (pozor: 10x redčen vzorec).

4.3. Določitev števila vseh Cys v proteinu

Za določitev števila vseh Cys v molekuli neznanega proteina, tako prostih kot disulfidno vezanih, je potrebno protein najprej reducirati, to je razbiti disulfidne mostičke.

Materiali

- analizirani protein (10 mg/mL);
- 10 M urea v 0.5 M Tris/HCl, pH 8;
- 0.5 M DTT;
- 0.5 M Tris/HCl, pH 8;
- 20 % (v/v), 10 % (v/v) TCA;
- 8 M urea v 0.15 M acetatnem pufri, pH 3;
- 6 mM Ellmanov reagent v etanolu.

Denaturacija in redukcija proteina:

1. V ependorf centrifugirki k 0.2 mL raztopine analiziranega proteina s koncentracijo 10 mg/mL dodajte 0.4 mL 10 M uree v 0.5 M Tris/HCl, pH 8, in 0.04 mL 0.5 M reducenta ditioneitrila (DTT).
2. Raztopino inkubirajte 20 minut na sobni temperaturi, da protein denaturira in disulfidne vezi razpadejo.
Čas inkubacije krajši od 10 minut ni priporočljiv, zaradi možne nepopolne redukcije. Ker reducent vsebuje –SH skupine s katerimi reagira Ellmanov reagent, ga je potrebno po koncu reakcije, zaradi interference z določitvijo Cys, kvantitativno odstraniti. To lahko storimo na več načinov, na primer z obarjanjem proteina s trikloroacetno kislino (TCA).
3. Denaturiranemu in reduciranemu proteinu dodajte 0.6 mL 20 % (v/v) TCA in ga pomešajte. Protein se takoj po dodatku TCA obori.
4. Vzorec pustite na sobni temperaturi približno 5 minut, da se kosmički začnejo posedati, nato pa ga centrifugirajte na namizni ependorf centrifugi (14000 min⁻¹, 3 minute), da se oborina posede na dno.
5. Supernatant odlijte v odpad. Oborina je zelo čvrsta in ni nevarnosti, da bi odlili tudi njo. Preostanek tekočine odstranite s pivnanjem na filter papirju.
6. Oborino sperite z dodatkom 1 mL 10 % (v/v) TCA in intenzivnim mešanjem. Sledi centrifugiranje in odstranjevanje supernatanta kot je opisano zgoraj.
7. Isti postopek spiranja ponovite še enkrat.
8. Oborino po končanem spiranju ob intenzivnem mešanju topite v 1 mL 8 M uree v 0.15 M acetatnem pufru, pH 3 pri 37°C.
V kislem je ponovna tvorba disulfidov onemogočena. Oborina se relativno počasi raztaplja.
9. Po 15 minutah občasnega intenzivnega mešanja bi morala biti večina oborine raztopljena. Neraztopljeno odstranite s centrifugiranjem na namizni ependorf centrifugi (14000 min⁻¹, 3 minute). Opomba: A₄₁₂ mora biti večja od 0,035, da imate dovolj proteina za nadaljnje delo.
10. 0.1 mL supernatanta razredčite z 0.9 mL 8 M uree v acetanem pufru, pH 3. Tako pripravljenemu vzorcu izmerite A₂₈₀ proti 8 M urei v acetanem pufru, pH 3.
Na osnovi izmerjene absorbance in podatka, da je A₂₈₀ raztopine analiziranega proteina s koncentracijo 1mg/mL 0.67, izračunajte, kakšen volumen raztopine proteina morate dodati v epruveto kjer boste določali koncentracijo Cys z Ellmanovim reagentom, da bo koncentracija proteina med meritvijo 0.1 mg/mL (končni volumen je 3 mL). (pozor: 10x redčen vzorec)

Določitev Cys v reduciranem proteinu:

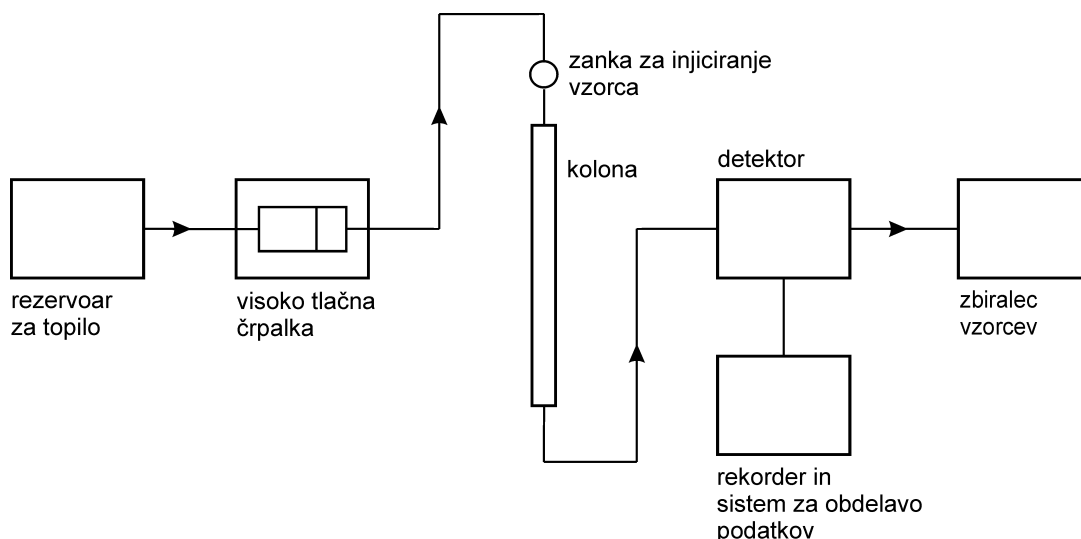
Ker v alkalnem, kjer poteka reakcija z Ellmanovim reagentom, lahko pride do ponovne tvorbe disulfidnih vezi, je potrebno pri tej meritvi vzorec dodati nazadnje.

1. V 2.3 mL 10 M uree v 0.5 M Tris/HCl, pH 8, dodajte 0.1 mL 6 mM Ellmanovega reagenta.
2. Dodajte toliko 8 M uree, da bo vsota njenega volumna in volumna raztopine reduciranega proteina, ki bo dala končno koncentracijo proteina 0.1 mg/mL (v treh mL), 0.6 mL. Raztopino reduciranega proteina dodajte nazadnje.

3. Raztopino dobro premešajte in jo inkubirajte na sobni temperaturi 10 minut, nato pa pomerite njeno A_{412} proti slepem vzorcu. Slep vzorec pripravite tako, da namesto proteinske raztopine dodate 8 M ureo v 0.15 M acetatnem pufri, pH 3. S pomočjo umeritvene krivulje določite število vseh Cys v neznanem proteinu.

5. Visokotlačna tekočinska kromatografija na obrnjenih fazah (RP HPLC)

HPLC je metoda, pri kateri preko kolone s pritiskom okoli 100 atmosfer črpamo mobilno fazo. Kolone so polnjene z različnimi polnili, premera delcev okoli μm , kar pomeni visoko število teoretičnih podov in visoko resolucijo. Hitrosti analize so velike, saj so pretoki mobilne faze v območju mL/min. Pri vaji boste uporabljali kolono t.i. obrnjene faze (Reversed Phase - RP). Običajno je pri tekočinski kromatografiji stacionarna faza polarna, mobilna pa nepolarna. Pri koloni z obrnjeno fazo je polarnost zamenjana. Stacionarno fazo ponavadi tvori nosilec iz silikagela s kovalentno vezanimi alkilnimi skupinami (C4-butyl, C8-oktil, C18-oktadecil). Mobilna faza je vodna raztopina. Interakcija med analiziranimi molekulami in stacionarno fazo je pretežno hidrofobna. Z višanjem koncentracije nepolarnega topila v mobilni fazi (acetonitrila, izopropanola, metanola) moč interakcije med analiziranimi molekulami in stacionarno fazo pada do trenutka desorpcije.

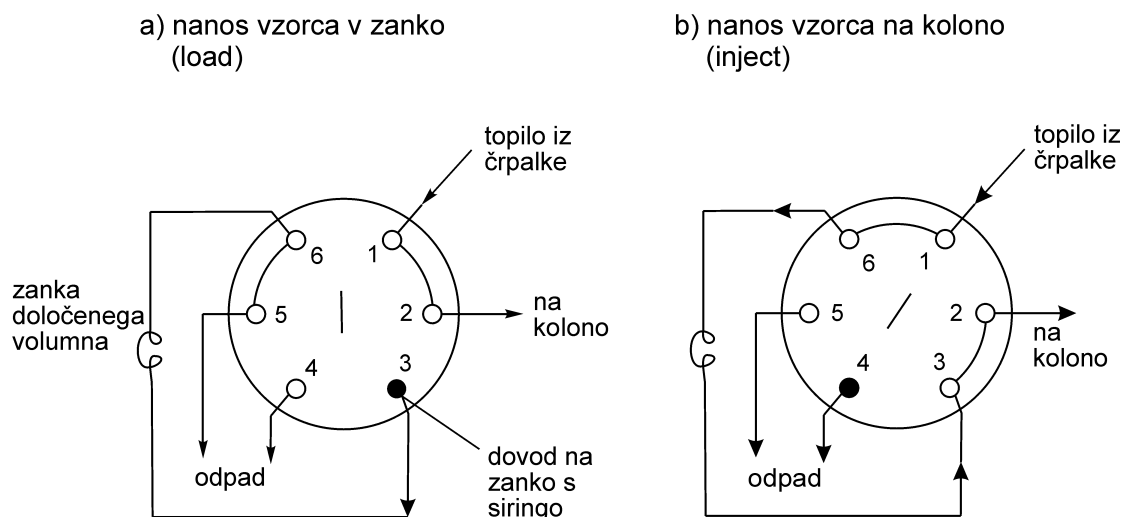


Slika 4: Diagram komponent izokratskega HPLC sistema.

Materiali

- topilo A : 0.1 % (v/v) TFA;
- topilo B : 0.1 % (v/v) TFA in 80 % (v/v) acetonitril;
- RP C4, C8 ali C18 kolona;
- HPLC sistem.

- HPLC sistem začnete pripravljati že, ko ste nastavili cepitev proteina oziroma med potekom redukcije proteina pri alkiliranju.
Pogoji analize so naslednji:
 - začetna mobilna faza: topilo A;
 - končna mobilna faza: topilo B;
 - gradient: 0-100 % topila B / 20 minut;
 - pretok mobilne faze: 1 mL/min;
 - absorbcijo zasledujte pri 215 nm (A_{215}) pri občutljivosti 1.0.
 Posnemite bazno linijo.
- Vzorcju pred HPLC analizo dodajte 500 μ L topila A.
To storite iz dveh razlogov. Analiza je namreč optimalna, če vzorec nanašate na kolono raztopljen v začetni mobilni fazi. Na ta način tudi preprečite, da bi se vzorec, ob morebitni slabi topnosti v začetni mobilni fazi, oboril na koloni in jo kontaminiral ali celo zamašil.
- PE- ali CM- protein se lahko ob dodatku topila A delno ali v celoti obori, zato vzorec pred nanosom na kolono centrifugirajte na namizni ependorf centrifugi (14000 min^{-1} , 2 minuti) in analizirajte le topni del (supernatant).



Slika 5: HPLC injektor. (a) Nanos vzorca v zanko (LOAD) na mestu 3, ostanek vzorca gre v odpad na izhodu 5. Tako potuje mobilna faza iz črpalk na kolono skozi točki 1 in 2. (b) Pri nanosu vzorca na kolono (INJECT) je topilo usmerjeno skozi zanko (mesto 1 in 6) in nato na kolono.

- Nanesite vzorec in spirajte kolono s topilom A. Potem, ko se s kolone sperejo nevezane snovi (soli ...), pričnite z elucijo proteinov/peptidov tako, da postopoma dvigate koncentracijo organskega topila v mobilni fazi (gradientna elucija).
Elucijo lahko izvajate tudi stopenjsko, tako da v skoku spremenite mobilno fazo. Resolucijska moč stopenjske elucije je nižja od gradientne.
- Zbirajte frakcije in jih liofilizirajte.

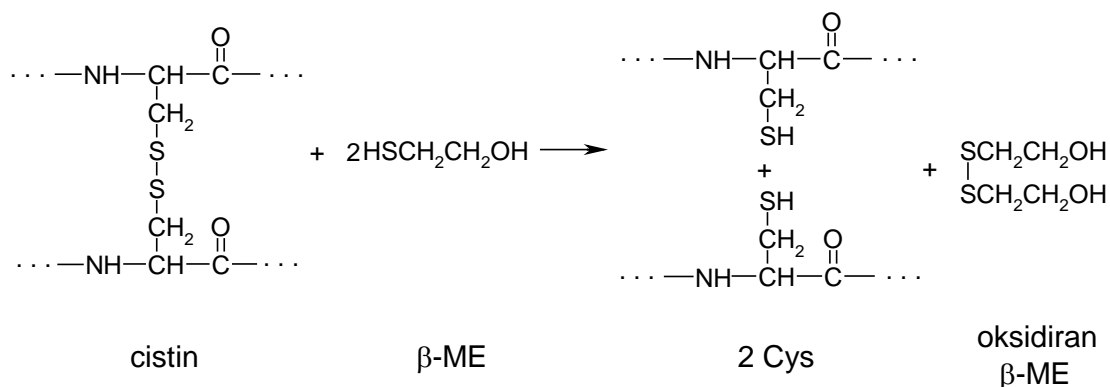
6. Čiščenje oborjenega proteinskega vzorca s spiranjem oborine

Slabo topnost proteina v določenem topilu lahko izkoristimo pri ločevanju in čiščenju.

1. Po zaključku alkiliranja proteinskemu vzorcu dodajte 500 μL ledeno hladne vode in ga dajte v hladilnik ali na led za 15 minut.
2. Vzorec centrifugirajte na namizni ependorf centrifugi (14000 min^{-1} , 2 minuti) in zavržite supernatant, ki vsebuje soli in reakcijske produkte.
3. Oborjen protein sperite z 0.5 mL vode tako, da ga intenzivno mešate, centrifugirate in odstranite supernatant.
4. Postopek ponovite še dvakrat.

7. Alkiliranje proteinskega vzorca

7.1. Denaturacija in redukcija proteina



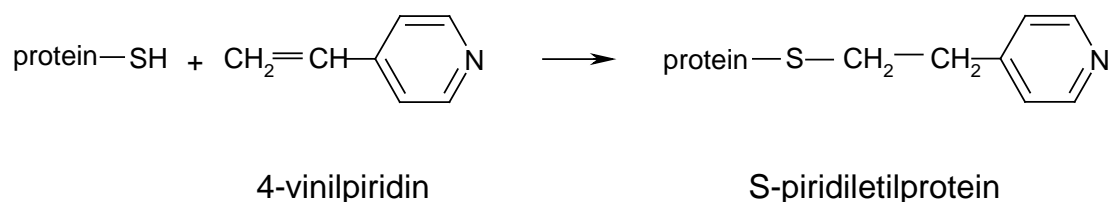
Slika 6: Cepitev disulfidne vezi.

Materiali

- denaturacijski pufer: 6 M GvHCl, 0.5 M Tris/HCl, pH 8.25, 2 mM EDTA;
- $\beta\text{-ME}$;
- 0.5 M Tris/HCl, pH 8.25.

1. Raztopite ustrezno količino analiziranega proteina v 100 μL denaturacijskega pufra.
2. V digestoriju raztopini proteina dodajte 2 μL reducenta $\beta\text{-ME}$.
3. Zmes premešajte, prepričajte reakcijsko posodo z inertnim plinom (Ar) in jo inkubirajte na 37°C 60 minut.

7.2. Piridiletiranje proteina s 4-vinilpiridinom



Slika 7: Reakcija piridiletiranja s 4-vinilpiridinom.

Materiali

- 4-vinilpiridin;
- β -ME.

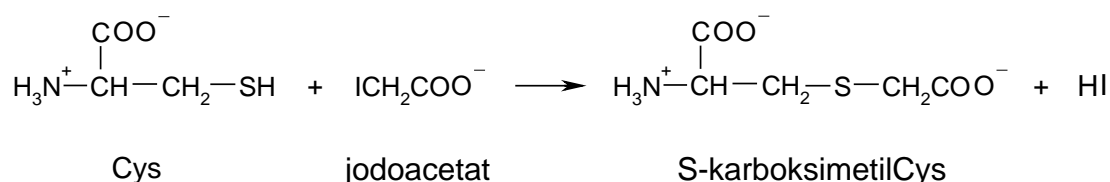
Pazite, 4-vinilpiridin je jedek in zelo strupen! Delajte v digestoriju in z rokavicami!

1. Po redukciji vzorec s proteinom ohladite na sobno temperaturo in ga centrifugirajte na namizni ependorf centrifugi (14000 min^{-1} , 2 minuti).
2. Vzorcju dodajte ekvimolarno količino 4-vinilpiridina glede na pri redukciji dodan β -ME.

Gostota 4-vinilpiridina je 0.984 g/mL, M_r pa 105.14. (β -ME: gostota 1.115 g/mL in M_r 78.13)

3. V digestoriju preprijate reakcijsko posodo z inertnim plinom (Ar).
4. Zmes inkubirajte v temi, na sobni temperaturi 90 minut.
5. Prekinite reakcijo alkiliranja z dodatkom 2 μL β -ME v digestoriju.

7.3. Karboksimetiliranje proteina z jodoacetatom



Slika 8: Karboksimetiliranje cisteina.

Materiali

- 3.15 M raztopina Na jodoacetata;
- β -ME.

1. Po redukciji vzorec s proteinom ohladite na sobno temperaturo in ga centrifugirajte na namizni ependorf centrifugi (14000 min^{-1} , 2 minuti).
2. Vzorcju dodajte Na jodoacetat. Delajte čim hitreje in na čim šibkejši svetlobi, da preprečite fotokemični nastanek joda, ki lahko modificira protein.

Preračunajte koliko μL 3.15 M raztopine Na jodoacetata (M_r 207.9) v 0.5 M Tris/HCl, pH 8.25 morate dodati, da ga boste dodali v 10%-nem molarnem prebitku glede na množino pri redukciji dodanega β -ME. Kolikšna je končna koncentracija Na jodoacetata v zmesi?

3. Kadar kot reagent uporabljate jodocetno kislino, pH raztopine naravnajte na 7-9 (z 1M NaOH), kjer poteka alkiliranje.

- Če delaš z Na jodoacetatom, je pH raztopine brez uravnavanja ~8.
4. Prepričajte reakcijsko posodo z inertnim plinom (Ar) v digestoriju.
 5. Reakcijsko zmes inkubirajte v temi na sobni temperaturi 30 minut.
 6. Prekinite reakcijo alkiliranja z dodatkom 2 μL $\beta\text{-ME}$ v digestoriju.

8. Razgradnja proteinov z encimi in na kemijski način

8.1. Razgradnja proteinov v raztopini s proteinazami

8.1.1. Razgradnja proteina s tripsinom

Tripsin (EC 3.4.21.4) je serinska proteinaza iz trebušne slinavke. β -oblika encima specifično cepi polipeptidno verigo na C-koncu bazičnih aminokislinskih ostankov, Arg in Lys.

Materiali

- 0.1 M N-metil morfolin acetatni pufer, pH 8.1;
- 1 mg/mL raztopina tripsina v vodi;
- 0.1 % (v/v) TFA;
- alkiliran protein.

1. Ustrezno količino alkiliranega in liofiliziranega proteina raztopite v 200 μL 0.1 M N-metil morfolin acetatnega pufra, pH 8.1. Pufer dodajte proteinu po kapljicah, da preverite njegovo topnost.
2. Raztopini dodajte tripsin v končni koncentraciji 1 % (m/m) in zmes inkubirajte na 37°C.
3. Če želite le omejeno fragmentacijo vzorca, reakcijo po 10 minutah prekinite z nakisanjem reakcijske zmesi s 300 μL 0.1 % (v/v) TFA. V obratnem primeru reakcijo fragmentacije z nakisanjem prekinite šele po 30-minutah.

8.1.2. Razgradnja proteina s proteinazo *Staphylococcus aureus* V-8

*V-8 proteinaza iz *S. aureus* (EC 3.4.21.19), imenovana tudi endoproteinaza Glu-C, je serinska proteinaza, ki cepi polipeptidno verigo na C-koncu kisljih aminokislinskih ostankov, Asp in Glu (pri pH 4.0), pa tudi njihovih amidov, Asn in Gln (v fosfatnem puftru pri pH 7.8).*

Materiali

- 0.1 M amon acetatni pufer, pH 4.0;
- 1 mg/mL raztopina proteinaze *S. aureus* V-8 v vodi;
- 0.1% (v/v) TFA;
- alkiliran protein.

1. Ustrezno količino alkiliranega in liofiliziranega proteina raztopite v 200 μL 0.1 M amon acetatnega pufra, pH 4.0. Pufer dodajajte proteinu po kapljicah, da preverite njegovo topnost.
2. Raztopini dodajte *S. aureus* V-8 proteinazo v končni koncentraciji 2 % (m/m) in jo inkubirajte na 37 °C 90 minut.
3. Reakcijo prekinite z nakisanjem vzorca s 300 μL 0.1% (v/v) TFA.

8.2. Razgradnja proteina v PA gelu s proteinazo *Staphylococcus aureus* V-8 ali endoproteinazo Lys-C

Endoproteinaza Lys-C (EC 3.4.21.50) je serinska proteinaza iz Lysobacter enzymogenes, ki specifično cepi polipeptidno verigo na C-koncu bazične aminokislina Lys.

Materiali

- 1 mg/mL raztopina proteinaze *S. aureus* V-8;
- 0.5 mg/mL raztopina endoproteinaze Lys-C;
- alkiliran protein;
- 2 x koncentriran nanašalni pufer (neredukcijski): 2.5 mL 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8, 4 mL 10 % (m/v) NaDS, 2 mL glicerol, 2 mg bromfenol modro, dopolni do 10 mL z dH_2O .

Pripravite poliakrilamidni gel in sestavite aparaturo za elektroforezo tako, kot je opisano pod točko 2.

1. 1 μL raztopine proteinaze *S. aureus* V-8 dodajte 1 μL neredukcijskega nanašalnega pufra in 2 μL raztopine endoproteinaze Lys-C dodajte 2 μL le-tega. Nanesite vzorce v žepke v gelu.
2. Priklopite električni tok (25 mA) in ga takoj, ko vzorci poniknejo v gel izklopite.
3. V iste žepke nato nanesite 5 μL alkiliranega proteina v neredukcijskem nanašalnem pufu. V sosednje žepke nanesite masne standarde in kontrolne vzorce (v en žepok le alkiliran protein in v drugega le proteinazo v nanašalnem pufu). V preostale žepke nanesite le pufer.
4. Priklopite električni tok (25 mA). Ko vzorci prepotujejo koncentracijski gel in pridejo na mejo med koncentracijskim in separacijskim gelom, tok izklopite in počakajte 1 uro, da poteče reakcija hidrolize vzorca s proteinazo *S. aureus* V-8 oziroma Lys-C.
5. Nadaljujte z elektroforezo, kot je opisano (2).

8.3. Kemijska razgradnja proteina s CNBr

Materiali

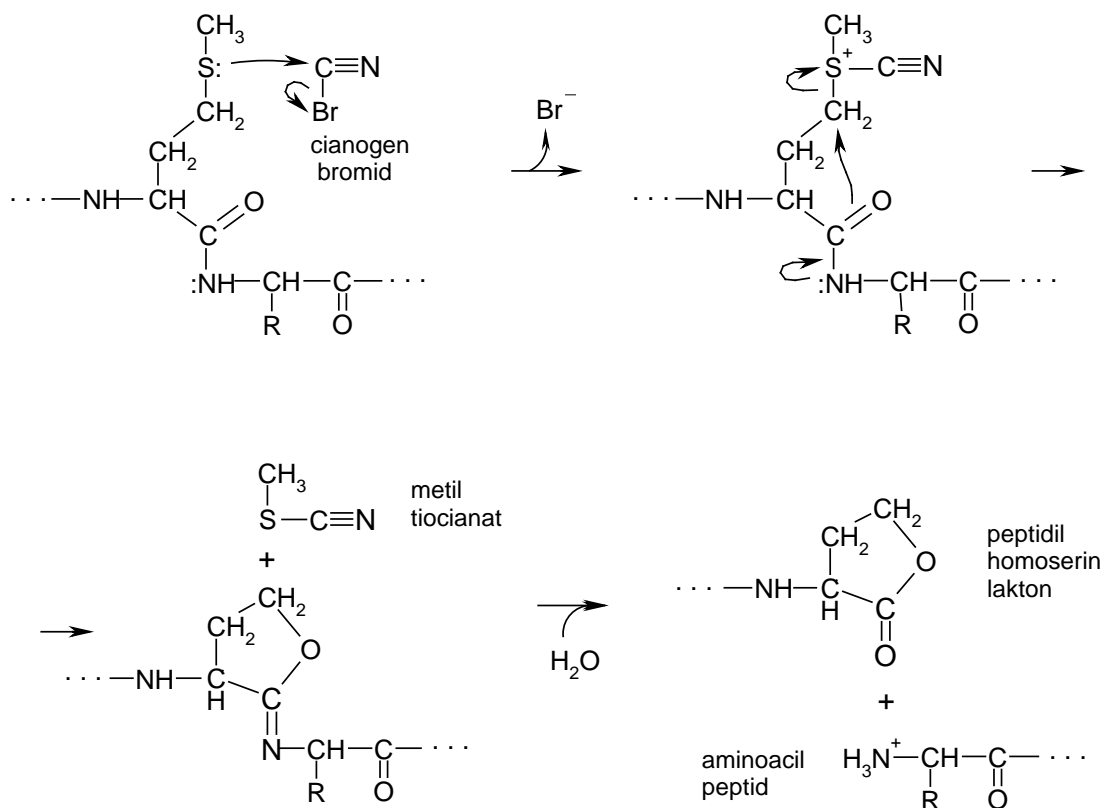
- 80 % (v/v) metanojska (mravljinčna) kislina;
- 1 mg/ μL raztopina CNBr;
- β -ME;
- alkiliran protein.

CNBr je hlapen in smrtno nevaren, zato delaj z njim izključno v digestoriju ob obvezni uporabi rokavic!

1. Pripravite 500 μL 80 % (v/v) metanojske kisline in jo prepahajte z Ar.
2. Zatehtajte CNBr.

CNBr zatehtaš tako, da najprej stehtaš prazno epico, v digestoriju daš vanjo kristalček CNBr (okoli 10 mg) in zaprto ponovno stehtaš. Iz razlike izračunaš maso CNBr v epici.

CNBr raztopite v takem volumnu acetonitrila, da dobite raztopino



koncentracije 1 mg/ μL .

Slika 9: CNBr cepitev.

3. Ustrezno količino alkiliranega in liofiliziranega proteina raztopite v 100 μL 80 % (v/v) metanojske kisline.
4. Zmesi dodajte 1 μL β -ME (prepreči morebitno izločanje broma ob dodatku CNBr), nato pa še 1 mg CNBr (1 μL raztopine v acetonitrilu). Vzorec pomešajte in centrifugirajte.

Običajno se dodaja CNBr v 100-1000-kratnem prebitku nad Met v proteinu.

Pazi, ob dodatku CNBr v kislino se sprošča močno strupeni HCN!

5. Reakcijsko zmes inkubirajte v temi, na 37°C 24 ur.
Fotokemično se iz CNBr tvori Br₂, ki lahko modificira protein.
6. Reakcijo prekinete tako, da vzorec razredčite z vodo 5-10-krat (v digestoriju dodajte 500 μL vode) in ga liofilizirate do suhega (na dnu je vijoličasta lisa od Br₂).

Prepričaj se, da je past za hlapne pri koncentradorju brezhibna, ker so hlapni cianidi smrtno nevarni!

9. Aminokislinska analiza proteina

Vzorec, ki mu bomo določali aminokislinsko sestavo ne sme vsebovati natrijevega acetata, natrijevega bikarbonata, natrijevega fosfata, Tris-a, HEPES-a in CAPS-a, vsi precej vplivajo na derivatizacijo. Prisotnost detergentov, NaDS in Tritona X-100, vpliva na analizo His in Thr (90% izkoristek) ter Cys in Lys (110% izkoristek). Kovinski ioni, četudi v zelo majhnih količinah motijo derivatizacijo s PITC. Moteči sta predvsem Ni^{2+} in Al^{3+} , pa tudi Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} in Mn^{2+} . Temu se izognemo tako, da vzorec po hidrolizi raztopimo v 0.025 % (m/v) K_3EDTA , ki veže omenjene kovinske ione.

9.1. Kislinska hidroliza vzorca

Materiali

- 6 M HCl, 0.1% (m/v) $SnCl_2$;
- steklena epruvetka;
- vakuumska črpalka;
- plinski gorilnik;
- sušilnik;
- diamantni nož.

1. Vzorec prenesemo v čisto stekleno epruvetko in ga liofiliziramo.
2. Dodamo 50 μ L 6 M HCl, ki vsebuje 0.1% (m/v) $SnCl_2$ in epruvetko s pomočjo plinskega gorilnika približno 3 cm od vrha raztegnemo v kapilaro. Počakamo, da se epruvetka ohladi.
3. Vzorec razplinimo s pomočjo vakuumske črpalke. Vakuum odpiramo zelo počasi, da ne posesamo vzorca! Ko je epruveta evakuirana (tekočina v njej je mirna, se ne peni, ni več mehurčkov) počakamo 30 sekund in epruvetko zatalimo na mestu, kjer smo jo raztegnili v kapilaro.
4. Zataljeno epruvetko damo v sušilnik na 110°C. Hidrolizo izvajamo ponavadi 24 ur, lahko pa tudi dlje (48 in 72 ur).
5. S pomočjo diamantnega noža epruvetko odpremo in hidrolizat liofiliziramo.
6. Vzorec pred aminokislinsko analizo raztopimo v 0.025% (m/v) K_3EDTA . Na analizator naneseemo lahko največ 40 μ L vzorca.

9.2. Analiza rezultatov

Kvalitativna analiza

S primerjavo HPLC analize standardov PTC-aminokislin, katerih položaj na kromatogramu je poznan, in vzorca določimo katere aminokislinske so prisotne v vzorcu.

Kvantitativna analiza

Množino posamezne aminokisliline v vzorcu (v zmesi standardov PTC-aminokislin je vsake po 250 pmolov) izračunamo iz podatkov analize po formuli:

$$\frac{\text{površina signala za } a_{k_i} \text{ v vzorcu}}{\text{površina signala za } a_{k_i} \text{ v stand.}} \times 250 \text{ pmol} = n_i \text{ [pmol]}$$

Če relativna molekulska masa polipeptida, ki mu določamo sestavo ni znana, izračunamo masne deleže aminokislin (w_i) po formuli:

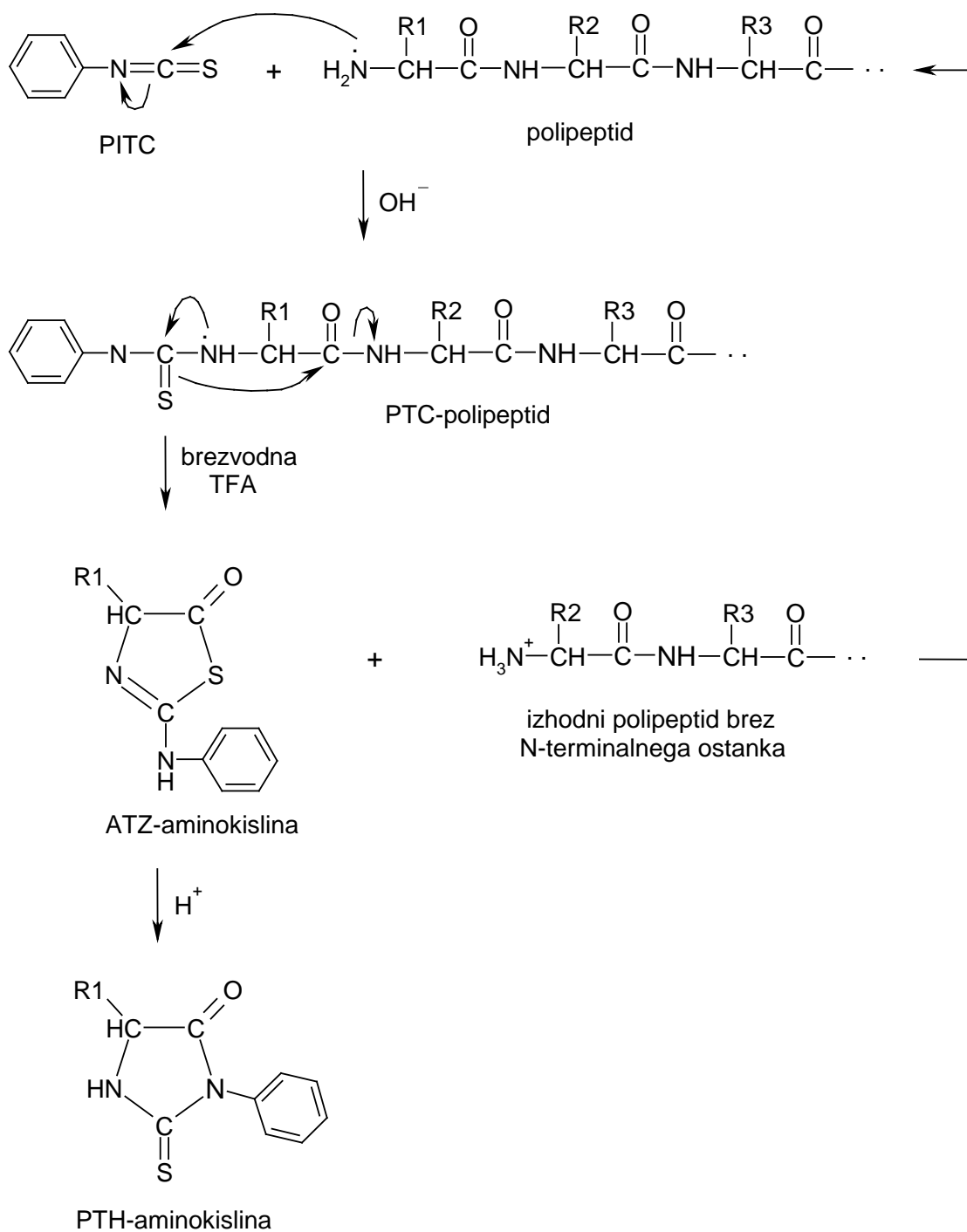
$$n_i \times M_{ri} / \sum(n_i \times M_{ri}) = w_i$$

M_{ri} - relativna molekulska masa aminokisliline i

Če je relativna molekulska masa analiziranega polipeptida znana (M_r), izračunamo število ostankov dane aminokislinske v molekuli proteina (X) po formuli:

$$w_i \times M_r = m_i \quad \Rightarrow \quad m_i / M_{ri} = X$$

10. Določitev N-terminalne aminokislinske sekvence proteina



Slika 10: Kemija Edmanove degradacije.

10.1. Priprava vzorca za sekveniranje

Vzorec v raztopini

Topilo v katerem je polipeptid naj bo hlapno. Vzorci ne smejo vsebovati soli v visokih koncentracijah (zlasti fosfatov ali sulfatov), NaDS je lahko prisoten le v koncentracijah $> 0.03\%$ (m/v), primarnih aminov (napr. Tris, glicin, amfoliti) ali spojin, ki absorbirajo v UV (Triton X-100 in druge aromatske spojine). Maksimalen volumen nanosa je $30\ \mu\text{l}$. Če vzorec še ni raztopljen, so dobrodošli podatki o njegovi topnosti.

Meja detekcije je, v primeru čistih, homogenih peptidov, sub-pikomolarna.

Vzorec na PVDF membrani

Proteine lahko očistiš z NaDS-PAGE in preneseš na PVDF membrano. Velikost koščka membrane primerna za sekvenčno analizo naj bo $\leq 40 \text{ mm}^2$. Pripravo vzorca na PVDF membrani si oglej pod točkama 2. in 3.

Zanesljive sekvenčne rezultate bomo dobili s sekveniranjem 10-50 pmol peptida/proteina. Določitev aminokislinskega zaporedja je mogoča tudi z nižjo količino vzorca (~1 pmol), če je le-ta homogen.

10.2. Analiza rezultatov

Kvalitativna analiza

S primerjavo HPLC analize standardov PTH-aminokislin, katerih položaj na kromatogramu je natančno poznan, in vzorca identificiramo aminokislino v posamezni stopnji analize. Zaporedje analiz nam da zaporedje aminokislin, kot si sledijo z N-terminalnega konca polipeptida.

Kvantitativna analiza

Množino dane aminokislino v posamezni stopnji sekvenčne analize polipeptida (v zmesi standardov PTH-aminokislin je vsake po 10 pmolov) izračunamo iz podatkov po formuli:

$$\frac{\text{površina signala za } a_k \text{ v vzorcu}}{\text{površina signala za } a_k \text{ v stand.}} \times 10 \text{ pmol} = n_i \text{ [pmol]}$$

11. ES masna spektrometrija

11.1. Priprava vzorca za analizo

Razsoljen vzorec proteina raztopimo v 500 μL topila (metanol : voda = 1 : 1) ob dodatku 1 % (v/v) očetne kisline. 100 μL raztopine posrkamo v injekcijsko iglo in s pomočjo igelne črpalke injiciramo v elektrosprej pri pretoku 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

11.2. Postopek masnospektrometrične meritve

10 μL raztopine vzorca/min vodimo skozi kapilarno kolono skupaj s čistim dušikom (30 mL/min) v razpršilno komoro ES. Na konici kapilare, ki je pod visoko napetostjo 8 kV se tvori aerosol kapljic raztopine vzorca, ki se postopno desolvatizirajo in ionizirajo. Ionski snop vodimo pri pospeševalni napetosti 4 kV v sektorski masni spektrometer. V magnetnem polju masnega analizatorja se ioni ločijo po m/z v področju od 200 do 2000. Z detektorjem masnega spektrometra zaznamo ionski tok pri določenih m/z, ki ga narišemo

v obliki masnega spektra. Masni spekter predstavlja zapis masnospektrometrične meritve, na katerem je podana relativna intenziteta ionskega toka pri posameznih m/z . Vrhovi v ES masnem spektru odgovarjajo seriji protoniranih ionov z večimi naboji. Iz razlik med masami sosednjih vrhov izračunamo molekulsko maso proteina. S programsko opremo delovne postaje Alpha (Digital) lahko transformacijo ES masnega spektra izvedemo tudi računalniško.

11.3. Analiza rezultatov

V masnem spektru spojine dobimo več vrhov, ki so med seboj oddaljeni za $M / [n \times (n+1)]$ masnih enot, kjer je n število na spojino vezanih protonov. Za izračun n določenega iona iz ES masnega spektra odčitamo vrednosti m/z za dva sosednja vrhova (ponavadi vzamemo najbolj intenziven par). Število protonov na ionu 2 (n_2) nato izračunamo iz zveze:

$$n_2 = [(m/z)_1 - 1] / [(m/z)_2 - (m/z)_1]$$

Ko poznamo število nabojev proteinskega iona z $(m/z)_2$ v spektru, izračunamo molekulsko maso proteina po formuli:

$$M = n_2 [(m/z)_2 - 1].$$

Vprašanja in naloge

1. Kakšna je navidezna masa analiziranega proteina na NaDS poliakrilamidni gelski elektroforezi pod neredukcijskimi in redukcijskimi pogoji?
2. Ali je protein, ki ste ga dobili v analizo oligomeren?
3. Koliko enakih oziroma različnih polipeptidnih verig ga sestavlja?
4. Kako so polipeptidne verige v analiziranem proteinu med seboj povezane (z disulfidnimi vezmi ali nekovalentno)?
5. Podajte sestavo raztopine za pripravo 10 %-nega ločitvenega PA gela! (Izhajamo iz 40% raztopine akrilamida.)
6. Primerjajte rezultate dobljene z meritvijo prostega Cys na nativnem in denaturiranem, nereduciranem proteinu. Ali sta rezultata enaka? Kaj bi lahko bil vzrok različnima rezultatoma?
7. Koliko prostih in disulfidno vezanih Cys je v proteinu, ki ste ga dobili v analizo? Torej, koliko disulfidnih vezi je v analiziranem proteinu?
8. Zakaj je potrebno proteinski vzorec pred analizo na sekvenatorju prenesti iz PA gela na PVDF membrano?
9. Kako lahko vplivate na kvaliteto prenosa proteina iz PA gela na PVDF membrano?
10. Zakaj proteinov ni priporočljivo barvati že pred prenosom iz PA gela na PVDF membrano?
11. Kakšne nosilce lahko uporabite pri western prenosu poleg PVDF membrane?
12. Koliko fragmentov opazite pri svojem vzorcu? Število fragmentov po CNBr cepitvi proteina je ponavadi večje od teoretično pričakovanega. Kaj bi lahko bilo vzrok temu? Kaj je v nekaterih primerih vzrok obratnemu pojavu?
13. Izračunajte koliko molov β -ME ste dodali, če je njegova gostota 1.115 g/mL in M_r 78.13?
14. Ocenite kvaliteto prenosa polipeptidnih fragmentov na PVDF membrano! Ali so se bolje prenesli težji ali lažji fragmenti? Zakaj?
15. Katera barvila so poleg CBB R250 še primerna za barvanje PVDF membran pred sekvenčno analizo?
16. Iz podatkov analize standardne zmesi aminokislin in aminokislinske analize neznanega proteina izračunajte aminokislinsko sestavo neznanega proteina! (povezava na nalogo na internetu)
17. Kakšen način hidrolize proteina bi uporabili, da bi lahko z aminokislinsko analizo določili vsebnost Trp?
18. Ali je za sekvenčno analizo Cys bolj primeren derivat z jodocetno kislino ali s 4-vinil piridinom? Utemeljite!
19. S katerim reagentom bi modificirali Cys, da bi dobili mesto, primerno za cepitev s serinsko proteinazo tripsinom?
20. Glede na izoelektrično točko svojega proteina, katero proteinazo bi izbral za fragmentacijo, da bi dobil manjše oz. večje število peptidov?
21. Zakaj so v masnem spektru denaturiranega proteina vrhovi pomaknjeni v področje nižjih mas?
22. Iz masnih spektrov nativnega in PE-amodytoxina C izračunaj koliko cisteinov je v nativni molekuli amodytoxina C!