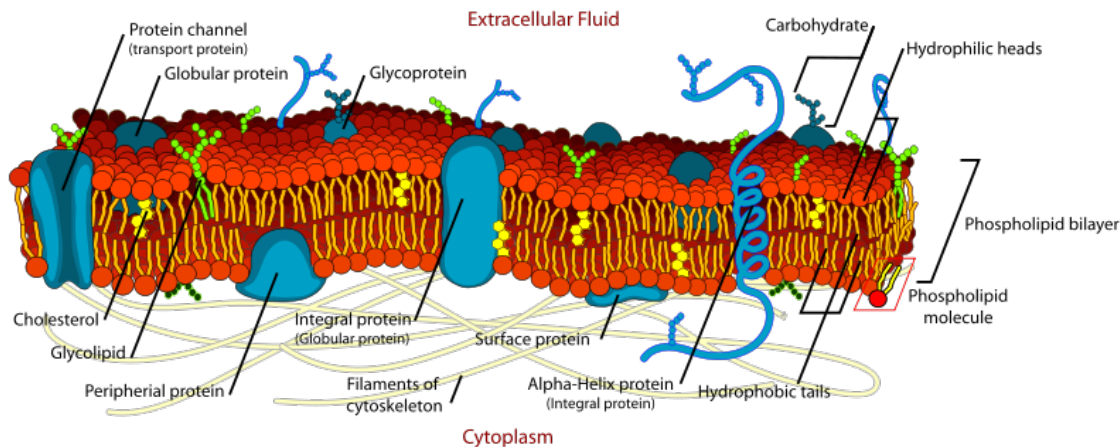


Metode za izolacijo membranskih proteinov



Izhodni material
(tkivo, celice)

Homogenizacija

Izolacija membranskih struktur
(celičnih organelov)

Ekstrakcija
(solubilizacija proteinov)

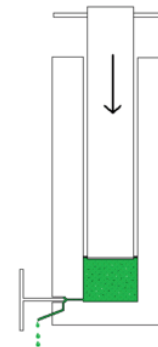
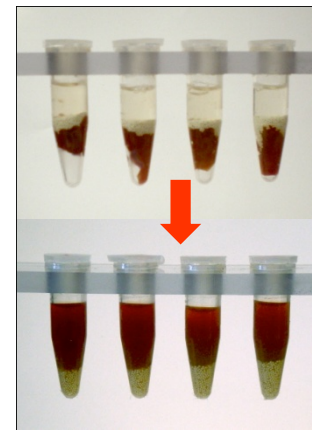
Ločba
(kromatografija)

CILJ: Čist protein v nativni (biološko aktivni) obliki, velik izkoristek

Homogenizacija

■ Fizikalni postopki

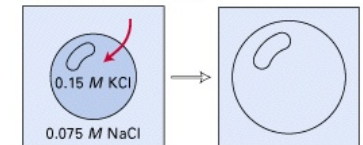
- Terilnica
- Steklene kroglice
- Zamrzovanje-tajanje
- Osmotski šok
- Teflonski homogenizatorji
- Mešala z noži
- Francoska preša



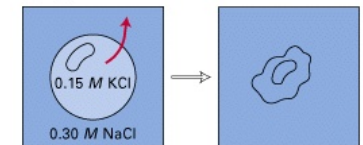
(a) Isotonic medium



(b) Hypotonic medium



(c) Hypertonic medium

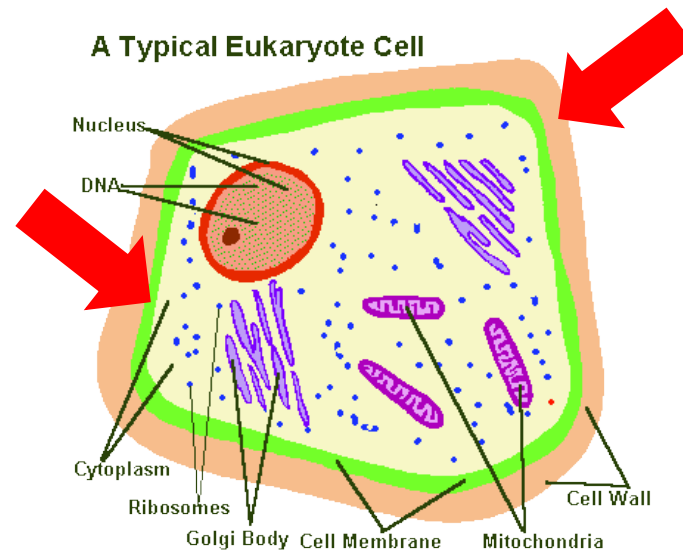


Homogenizacija

- Kemijski postopki
 - Detergenti



- Encimski postopki
 - Uporaba encimov za razgradnjo celične stene in membran
 - Lizocim, celulaze, fosfolipaze,...



Izolacija membranskih struktur

- Celični organeli imajo različne lastnosti, zato jih lahko med seboj ločimo s centrifugiranjem:
 - diferencialno centrifugiranje
zaradi različnih sedimentacijskih hitrosti se organeli posedajo različno hitro (trajanje, pospeški)
 - centrifugiranje v gostotnem gradientu
organeli se zaradi različnih gostot v vnaprej pripravljenem gradientu (npr. saharoze) posedajo do ravni z enako gostoto.

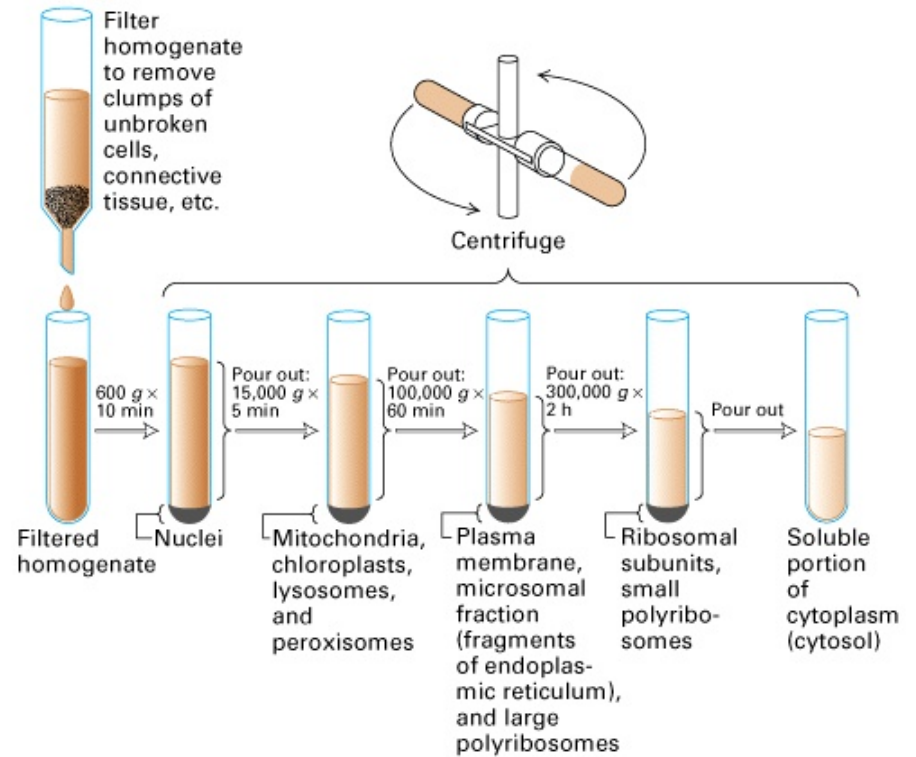
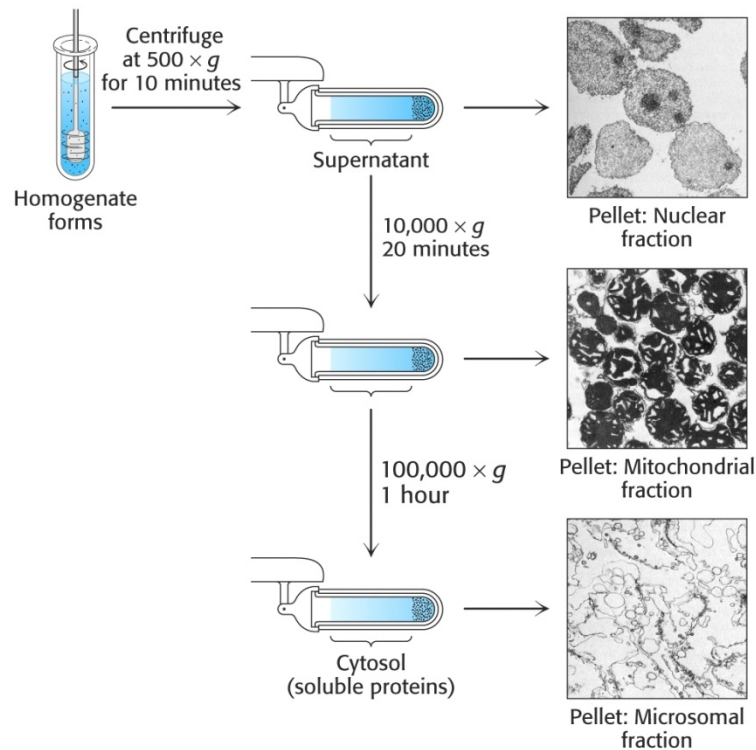
Size and density of some typical organelles*

Organelle	diameter (μm)	Density (g/cm^3)
Nuclei	5-10	1.4
Mitochondria	1-2	1.1
Ribosomes	0.02	1.6
Lysosomes	1-2	1.1

**Carolina Tips*, Nov. 1, 1973.

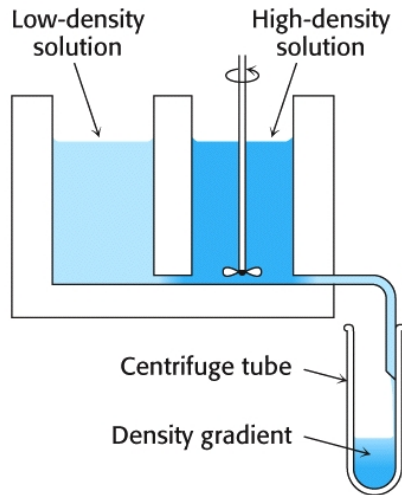
Izolacija membranskih struktur

■ diferencijalno centrifugiranje

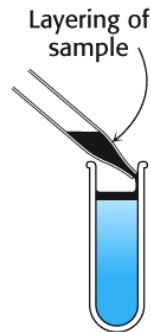


Izolacija membranskih struktur

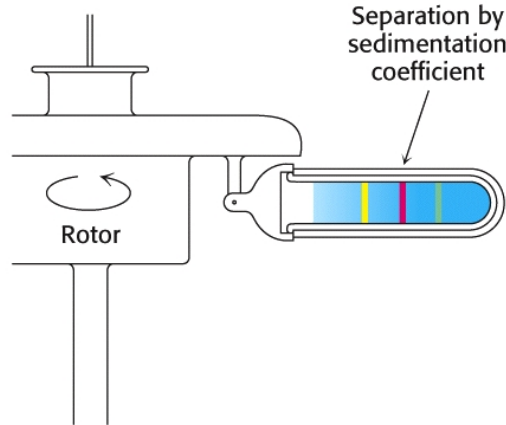
■ centrifugiranje v gostotnem gradientu



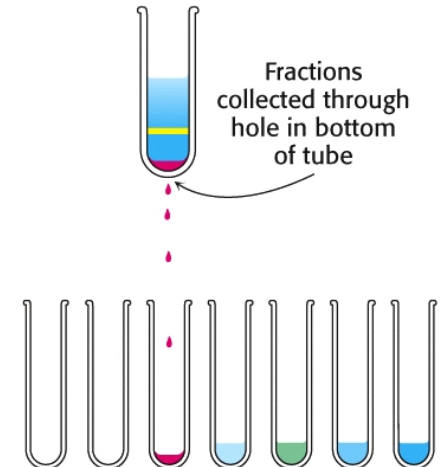
(A)



(B)

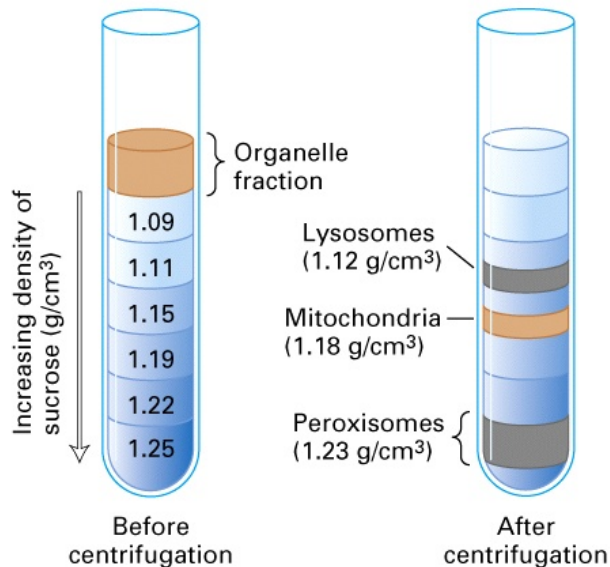


(C)



(D)

(kontinuirni gradient)

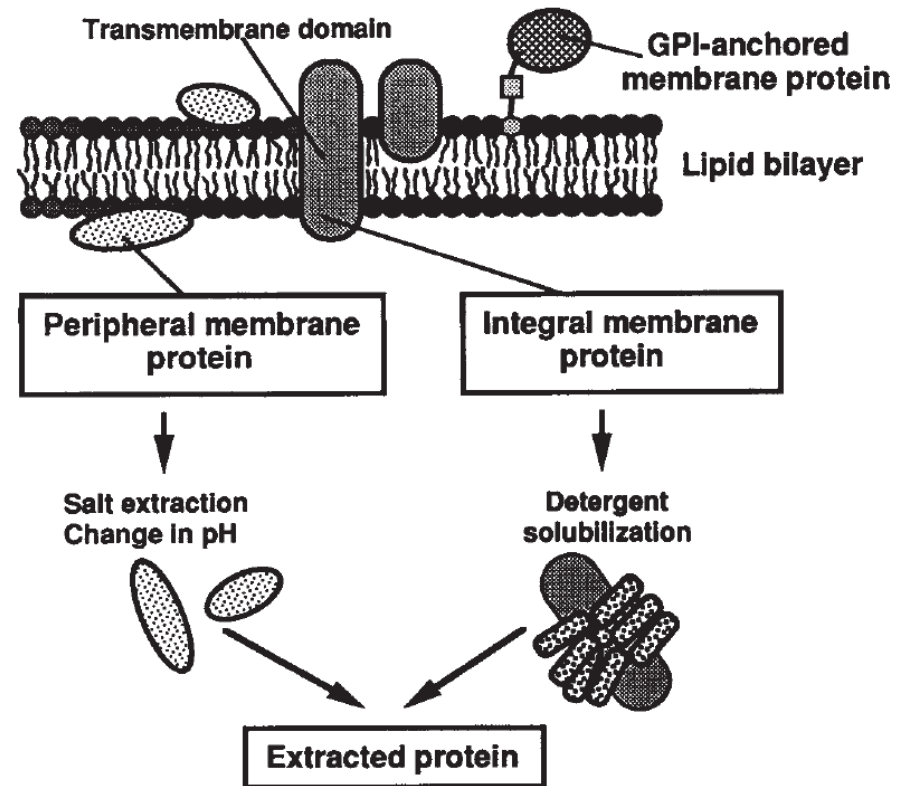


obogatitev membranske frakcije!

(diskontinuirni gradient)

Ekstrakcija membranskih proteinov

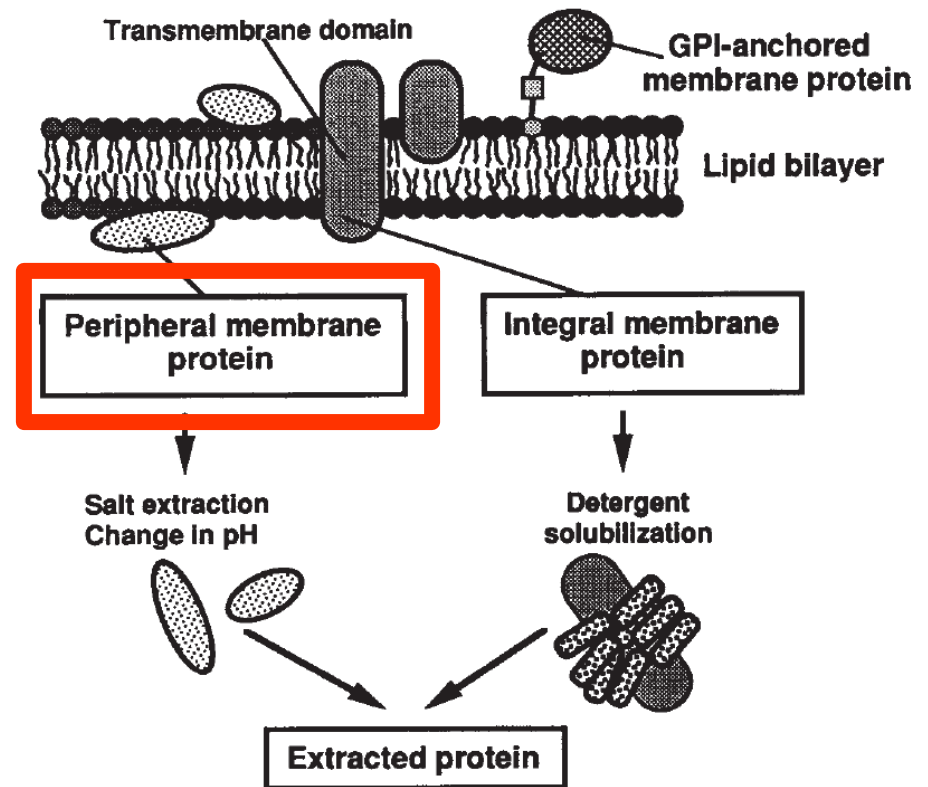
- 1. periferni membranski proteini
- 2. integralni membranski proteini
- 3. proteini, zasidrani v membrani z lipidnimi “repki”



Ekstrakcija membranskih proteinov

- periferni m. proteini

- Relativno mili pogoji za ekstrakcijo
- Porušenje šibkih elektrostatskih interakcij in vodikovih vezi med proteini in membrano



Ekstrakcija membranskih proteinov

- periferni m. proteini

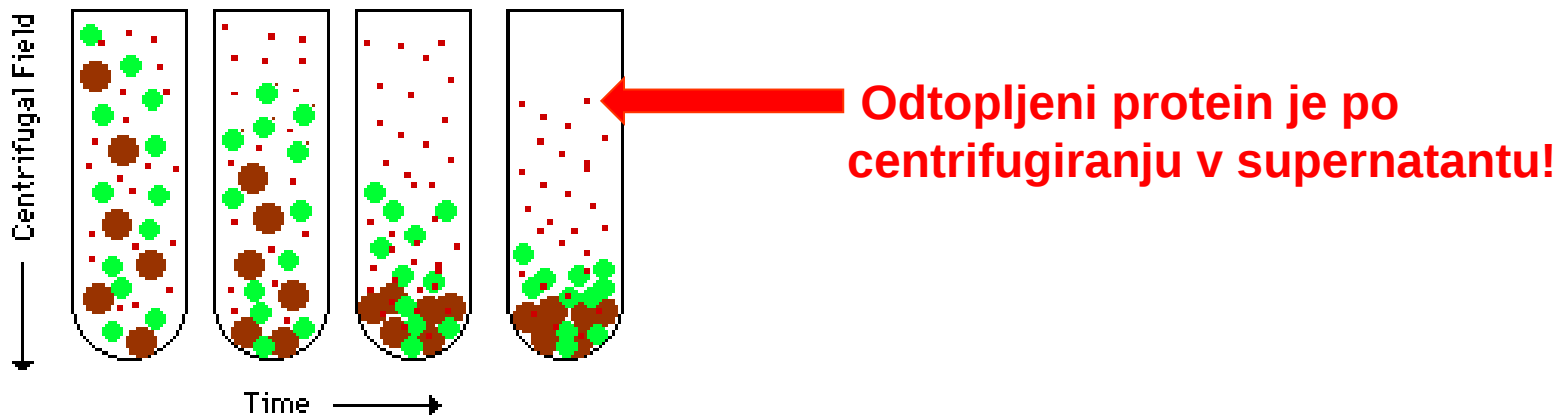
- Najpogosteje uporabljeni postopki:
 - Visoka ionska jakost (1M NaCl ali KCl)
 - Bazični pufri (pH 8-12)
 - Kisli pufri (pH 3-5)
 - Kelatorji kovinskih ionov (EGTA ali EDTA)
 - Organska topila (npr. butanol)
 - Sonifikacija membranskih frakcij

Ekstrakcija membranskih proteinov

- periferni m. proteini

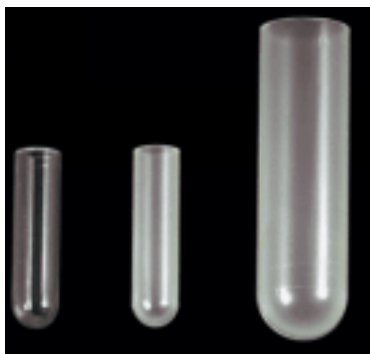
- Ekstrakcija – centrifugiranje

- (60 min, 100 000g)





Ultracentrifuga



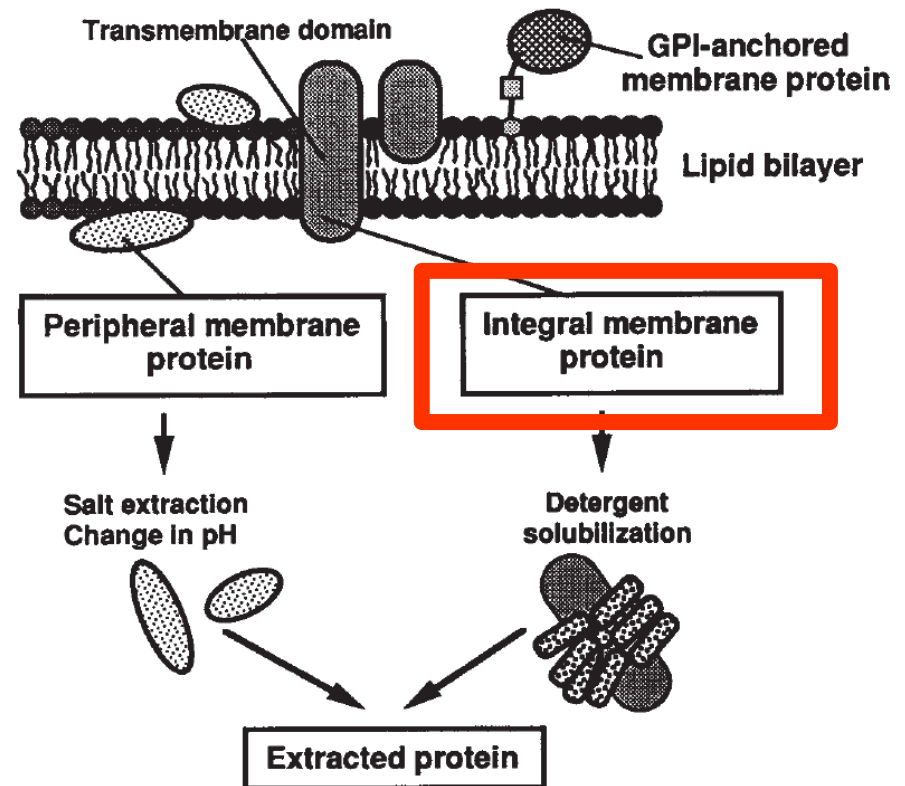
Rotorji

Centrifugirke

Ekstrakcija membranskih proteinov

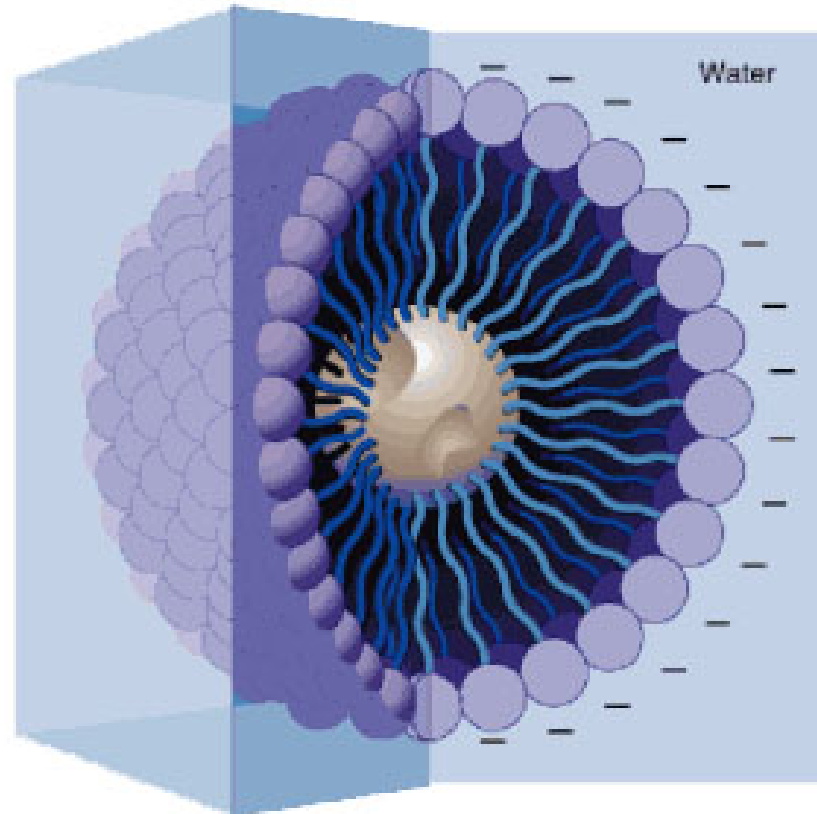
- integralni m. proteini

- Zaradi hidrofobnih površin močnejše vsidrani v lipidni dvosloj
- Za ekstrakcijo so potrebni detergenti



Detergenti

- Amfipatične molekule
 - Dvojni značaj: hidrofojni in hidrofilni del
 - Miceli



Detergenti

Table 1
Properties of Commonly Used Solubilizing Detergents

Detergent	Relative molecular mass (monomer) (M_r)	Critical micelle concentration (cmc) (M)	Aggregation number
Triton X-100	625	3.0×10^{-4}	150
Tween 20	1320	0.9×10^{-5}	60
Brij 35	1200	9.0×10^{-5}	40
Lubrol PX	1000	4.0×10^{-6}	90
Octyl- β -D-glucoside	292	2.5×10^{-2}	90
Zwittergent 3-14	364	3.0×10^{-4}	83
CHAPS	615	1.4×10^{-3}	22
Cholate	430	1.4×10^{-3}	4
Sodium dodecyl sulfate	288	7.0×10^{-3}	62

- Kritična micelna koncentracija
- Agregacijsko število
- Hidrofilno-lipofilno ravnotežje (HLB)

Detergenti

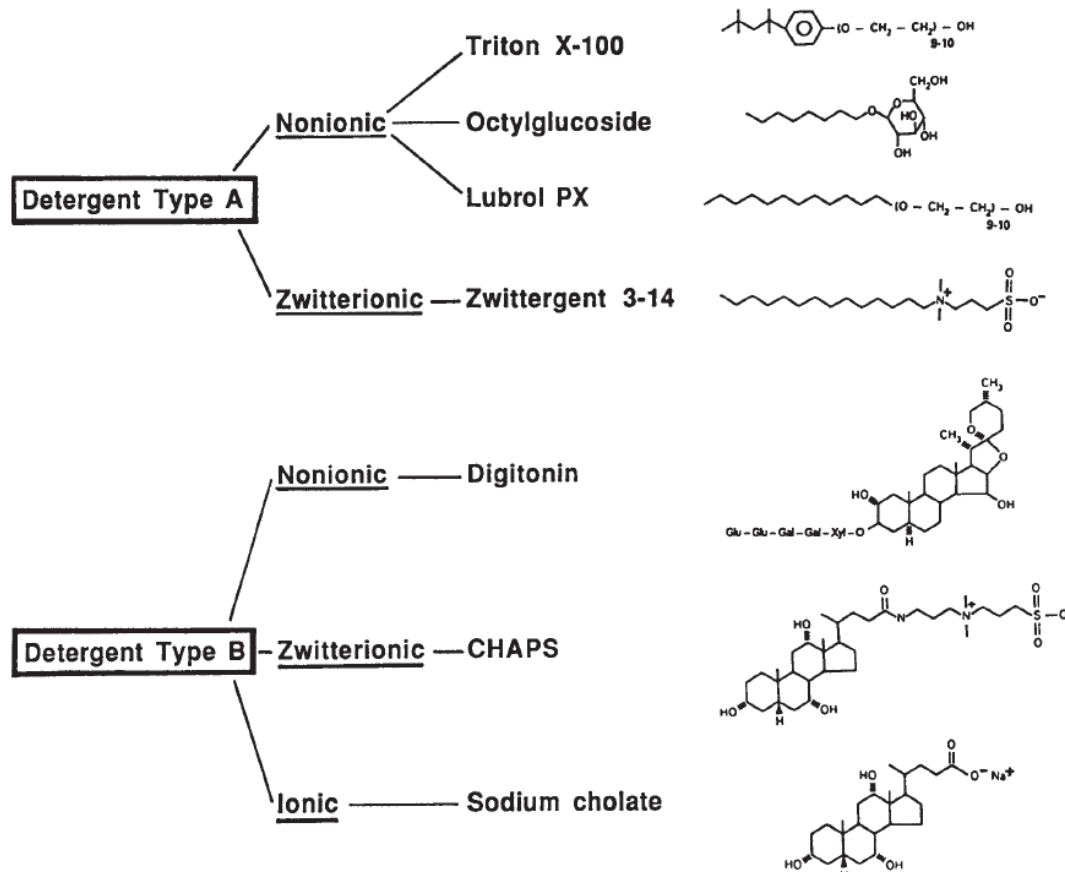


Fig. 2. Commonly used detergents employed in the solubilization of biological membranes.

Tip A:

- Fleksibilni hidrofobni repi in hidrofilne glave

Tip B:

- Toge strukture z amfifilnimi lastnostmi; na osnovi strukture holesterola

Ekstrakcija membranskih proteinov

- integralni m. proteini

- Kriteriji za izbiro detergenta:
 - Čistost
 - Dostopnost
 - Učinkovitost odtapljanja membranskih proteinov
 - Pri uporabi ne pride do ireverzibilne denaturacije membranskega proteina
 - Učinkovitost odstranjevanja detergenta po ekstrakciji

Ekstrakcija membranskih proteinov

- integralni m. proteini

- Ekstrakcija membranskih proteinov z detergentom
 - Puferski sistemi s fiziološkim pH in ionsko jakostjo
 - Membranski vzorci s celokupno koncentracijo proteinov 1-5 mg/mL
 - Koncentracija detergenta 0.1-5% (v/v)
 - Po centrifugiranju (60 min, 100 000g) je membranski protein v supernatantu

Odstranjevanje detergentov

- Začetna koncentracija detergentov je ponavadi visoka.
- Za nadaljnje postopke izolacije oziroma analize je potrebno presežni detergent odstraniti ali zamenjati z drugim.
- Detergenti lahko negativno vplivajo na:
 - Biološko aktivnost membranskega proteina
 - Učinkovitost kromatografskih metod pri izolaciji
 - Različne fizikalne in kemijske analize proteinov
 - Biološke analize v celičnih sistemih

Metode za odstranjevanje detergentov

- Pri izbiri metode za odstranjevanje moramo upoštevati naslednje lastnosti detergenta:
 - Kritično micelno koncentracijo (cmc)
 - Hidrofilno-lipofilno ravnotežje (HLB)
 - Molekulsko maso micele

Metode za odstranjevanje detergentov

■ Najpogostejše uporabljene metode:

■ Dializa

■ Kromatografija:

- ionsko-izmenjevalna
- afinitetna
- hidrofobna adsorpcija
- gelska filtracija

■ Precipitacija proteinov

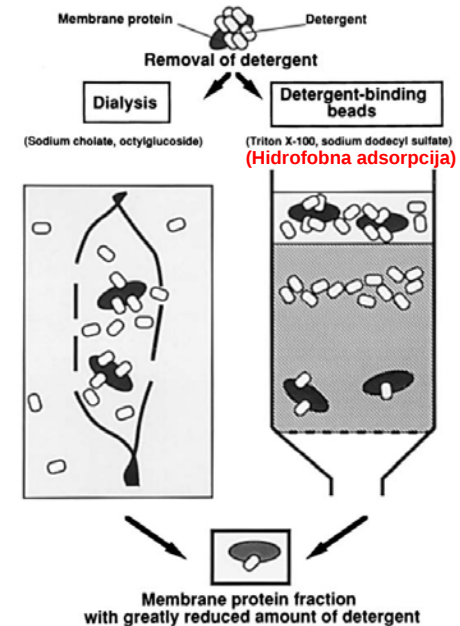
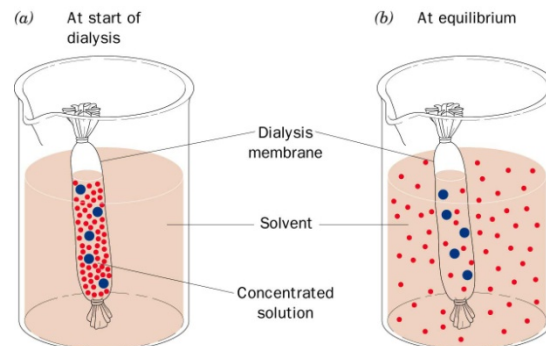
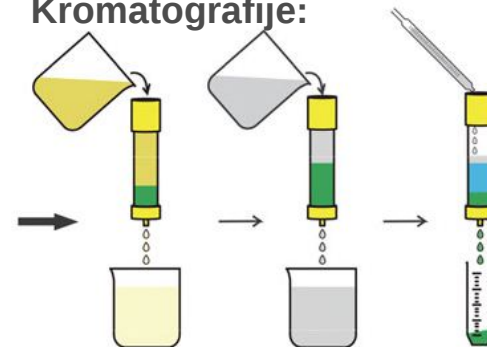


Fig. 1. Commonly used methods to remove detergent from protein fractions.

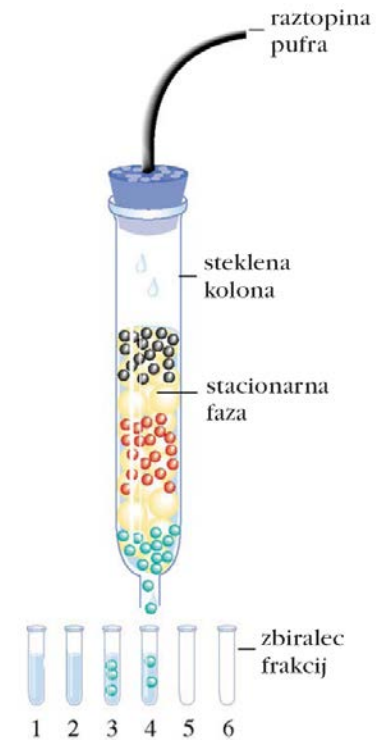
Kromatografije:



Izolacija membranskih proteinov

- Izolacija celičnih organelov
- Ekstrakcija membranskih proteinov z detergentom
- Znižanje koncentracije detergenta
- Kombinacija standardnih biokemijskih tehnik - kromatografij:
 - Ločba na osnovi bioloških lastnosti
 - Afinitetna kromatografija (uporaba specifičnih ligandov, sond ali protiteles)
 - Ločba na osnovi fizikalnih lastnosti (velikost, naboj)
 - Ionsko-izmenjevalna kromatografija
 - Gelska filtracija
 - Elektroforeza
 - Ločba na osnovi adsorpcijskih lastnosti
 - Hidrofobna izmenjevalna kromatografija, adsorpcijska kromatografija
 - Kromatografija na obrnjenih fazah

Ločba na osnovi bioloških lastnosti ponavadi pripelje do boljšega izkoristka izolacije.



- Strukturna karakterizacija proteina



FPLC



HPLC



“Speedvac”

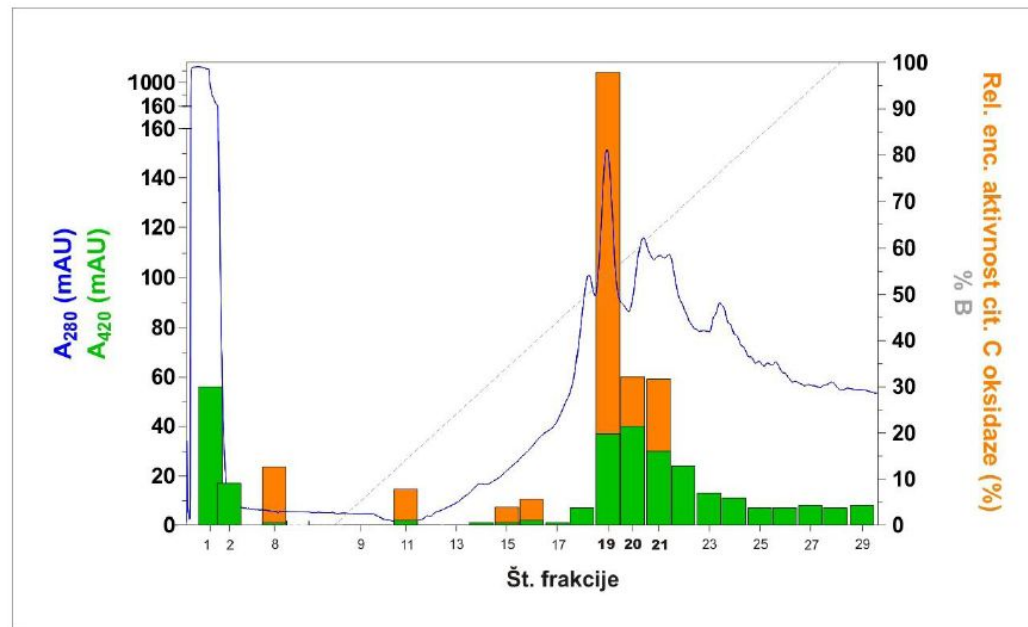
Kontrola učinkovitosti ekstrakcije in izolacije membranskih proteinov

- Encimska aktivnost
- Detekcija proteinov v gelu in na membranah
 - Barvanje proteinov in detekcija s specifičnimi protitelesi
- Afinitetno označevanje
- Označevanje proteinov s fluorofori
- Biološka analiza v celičnih sistemih

■ Encimska aktivnost

■ Primer:

- Izolacija citokrom c oksidaze – sledenje encimske aktivnosti po frakcijah



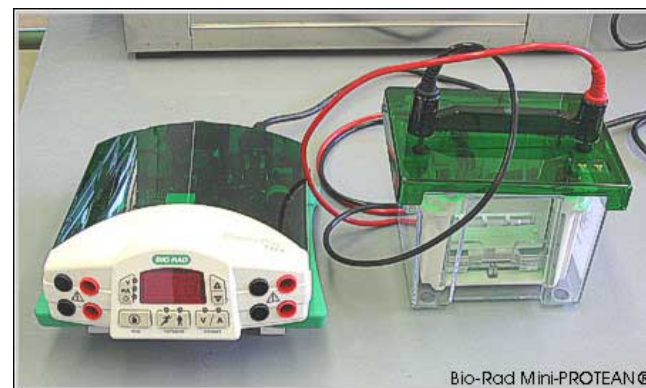
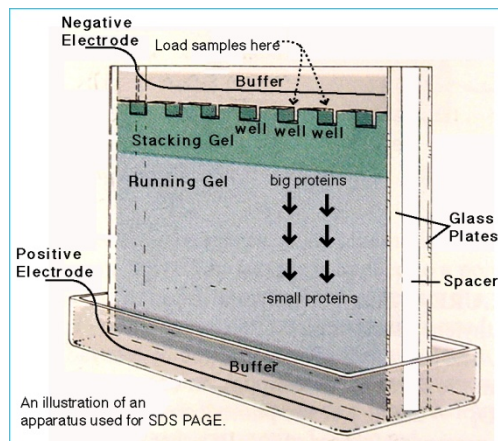
Slika 13: Anionsko-izmenjevalna kromatografija, zadnja stopnja čiščenja CCOX iz prašičjega cerebralnega korteksa.

Iz prašičje možganske skorje smo izolirali celotno CCOX. V zadnji stopnji izolacije smo na FPLC-kolono Mono Q pri pretoku 1 ml/min nanegli 1 ml supernatanta po odtapljanju membranskih proteinov s 3 % (m/v) TX-100 (CS2). Nevezane proteine smo sprali s 4 ml pufru 50 mM Hepes (pH 7,6), 100 mM NaCl in 0,1 % (m/v) TX-100. Vezane proteine smo eluirali z gradientom 100–500 mM NaCl v pufru 50 mM Hepes (pH 7,6) in 0,1 % (m/v) TX-100. Zbirali smo frakcije po 1 ml. Frakcijam smo izmerili absorbanci pri 280 nm (modra linija) in 420 nm (zeleni stolpci) ter aktivnost CCOX (oranžni stolpci). Aktivnost frakcij smo prikazali kot delež aktivnosti celotne frakcije CS2. Najbolj aktivne frakcije 19, 20 in 21 so poudarjene.

■ Detekcija proteinov v gelu in na membranah

■ Barvanje proteinov v gelu in na membranah

■ NaDS PAGE

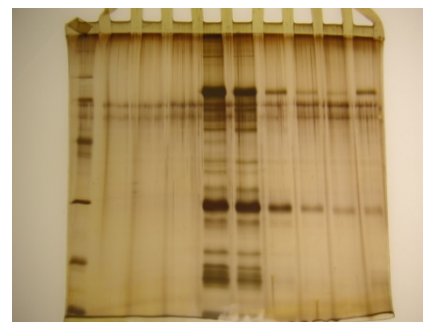


■ Barvila

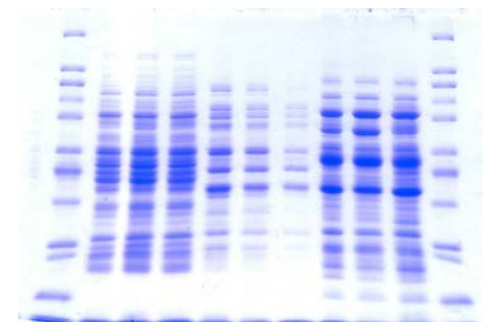
Table 5. Characteristics of Total Protein Stains

Stain	Detection Limit	Nitrocellulose	Nylon	PVDF	Comments
Ponceau S	1-2 μ g	+	-	+	reversible
Amido Black*	1.5 μ g	+	-	+	permanent low background
Coomassie blue*	1.5 μ g	+	-	+	permanent high background
India Ink	100 ng	+	-	+	permanent
Biotin-avidin	30 ng	+	+	+	permanent fades with time
Colloidal gold — Ag	3 ng	+	-	+	permanent

* Anionic Stains



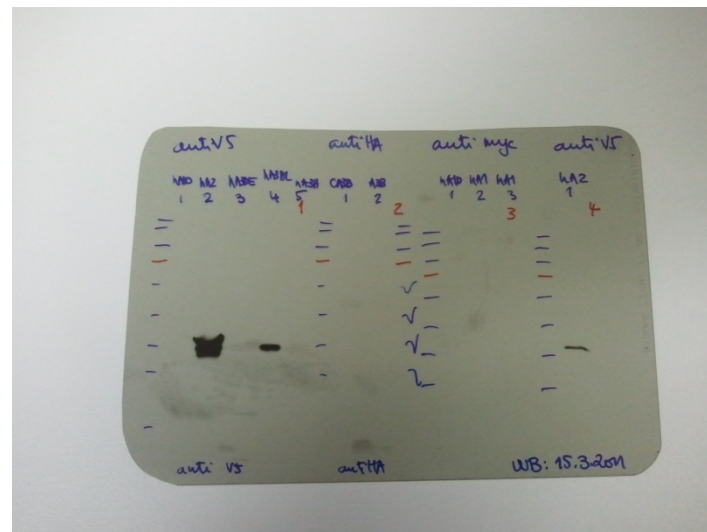
Koloidno srebro



Coomassie modro



“Hypercassette”



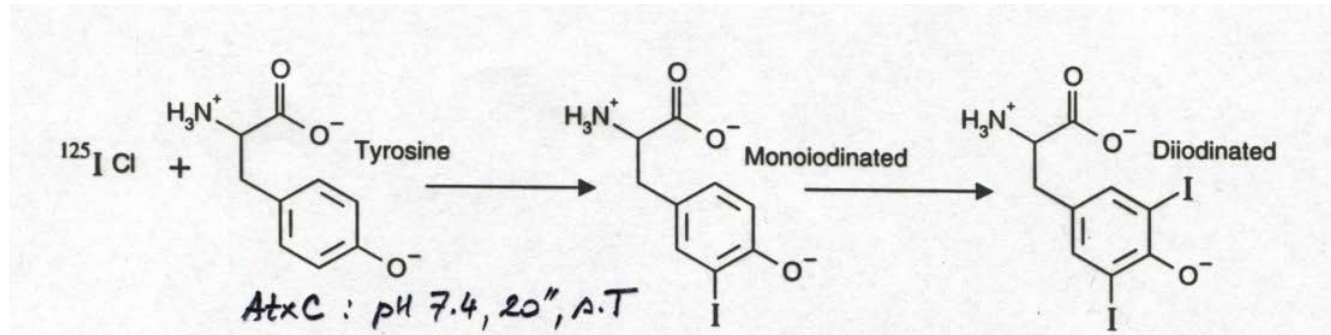
Razvit film



Membrana v kaseti

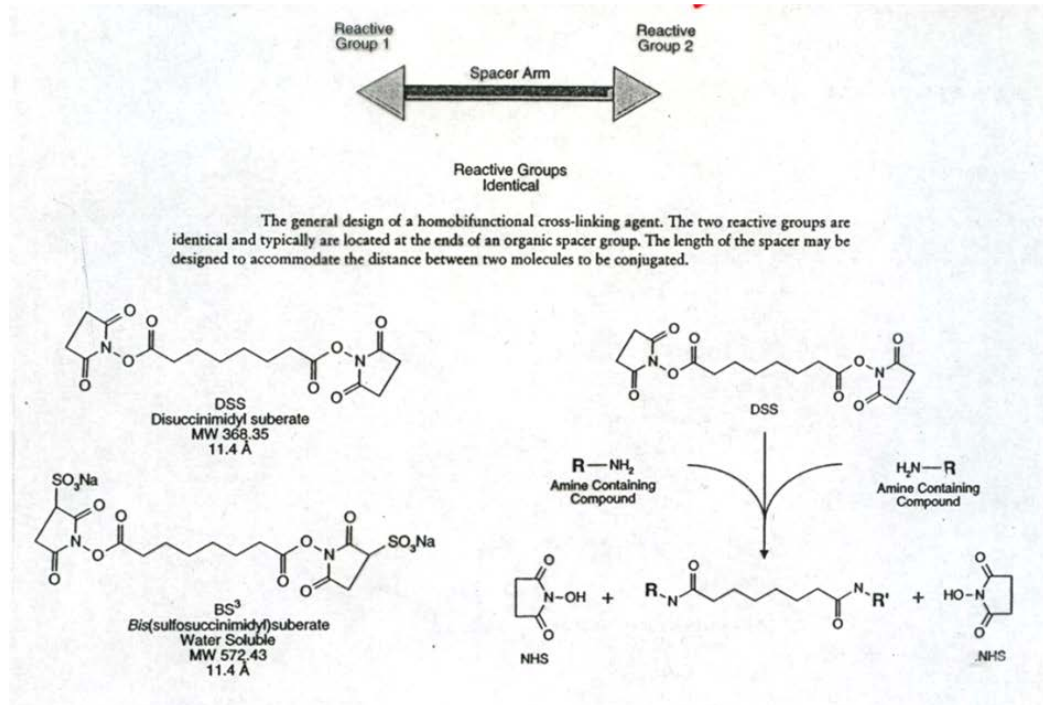
■ Afinitetno označevanje

- Priprava **radioaktivno označenega** proteina (liganda)
 - Primer: **radiojodiranje** tirozinskih preostankov v proteinu



■ Afinitetno označevanje

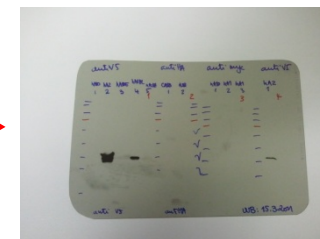
- Kovalentno povezovanje proteinov z radioaktivno označenimi ligandi – uporaba **prečnih povezovalcev**



Obstaja veliko različnih tipov prečnih povezovalcev!

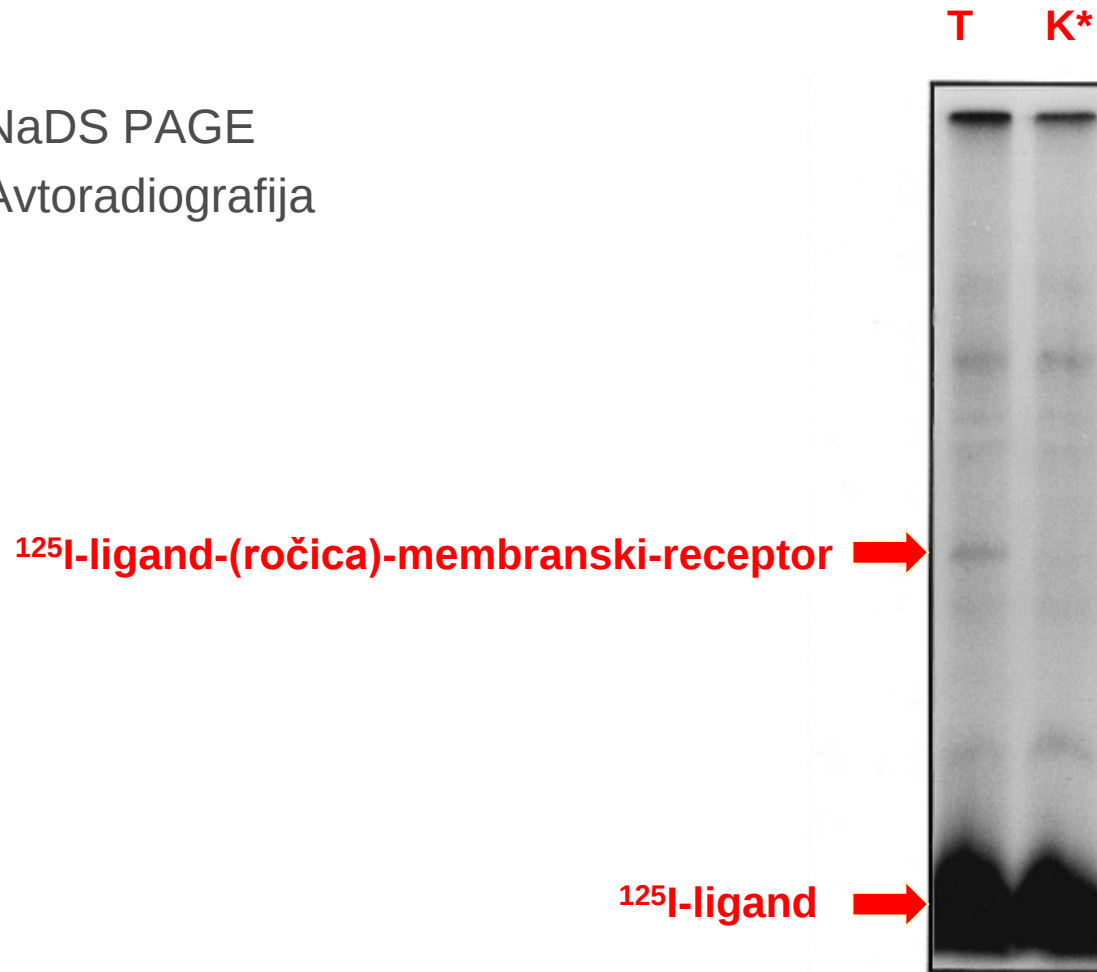
membranski receptor + ¹²⁵I-ligand $\xrightarrow{\text{DSS}}$ ¹²⁵I-ligand-(ročica)-membranski-receptor

- NaDS PAGE
- Avtoradiografija



■ Afinitetno označevanje

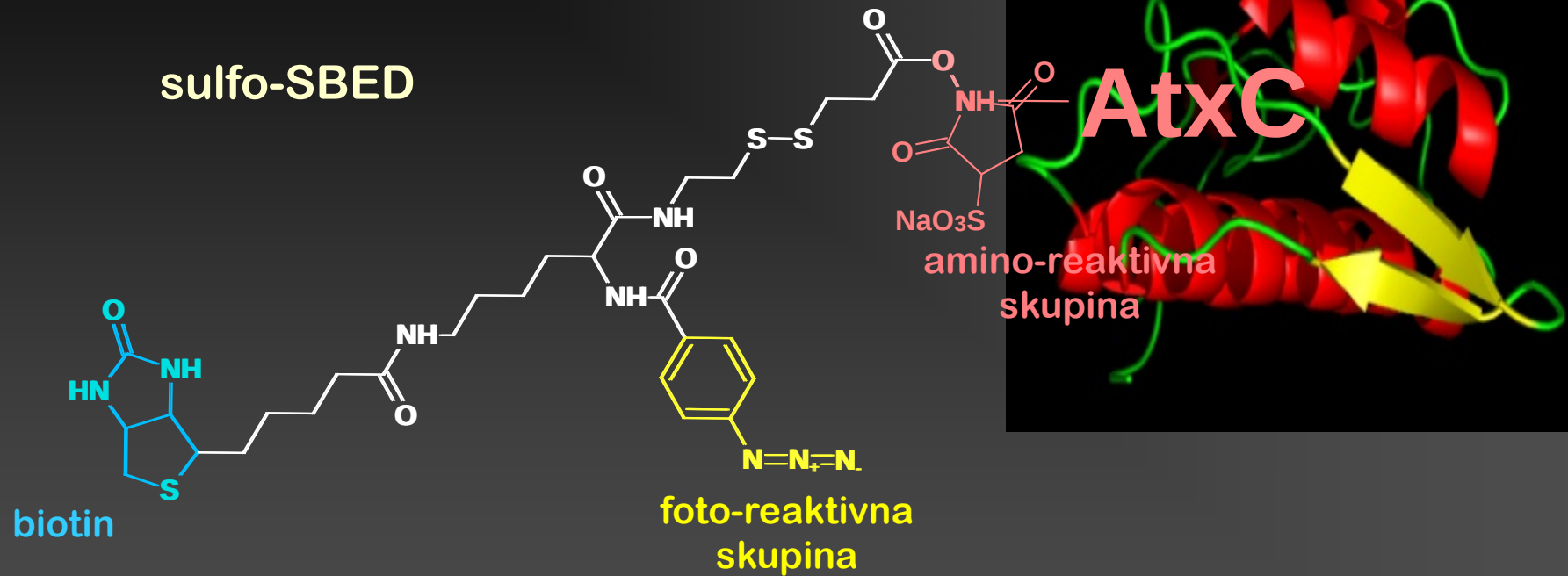
- NaDS PAGE
- Avtoradiografija

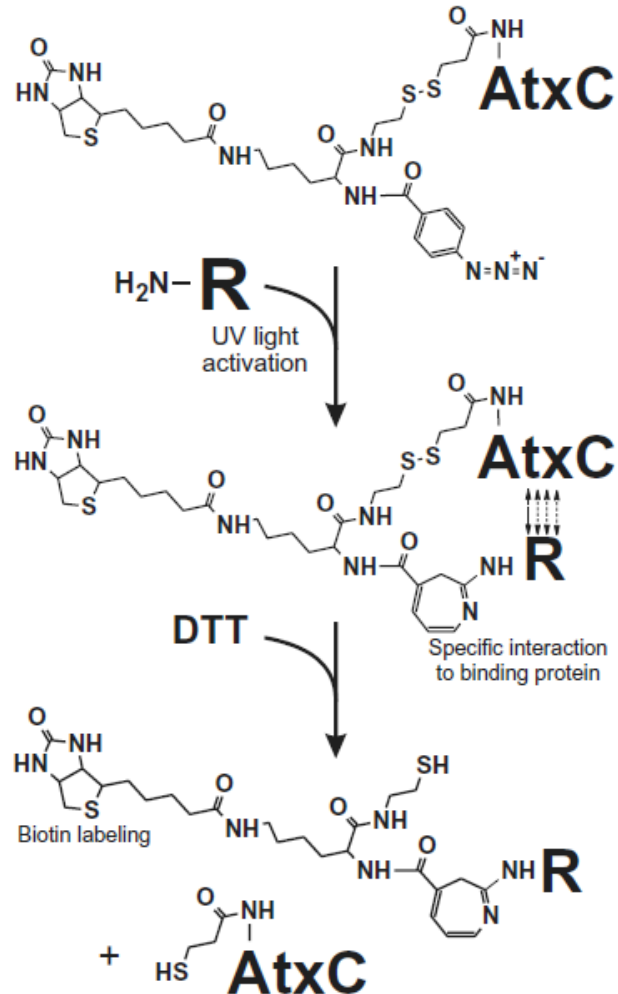


K* - dodan prebiten neoznačen ligand

■ Afinitetno označevanje

- Označevanje proteinov s foto-reaktivnimi sondami





- Fotoaktivacija
- Prenos biotinske ročice z AtxC na tarčni protein
- Kemiluminescenčna detekcija na membrani

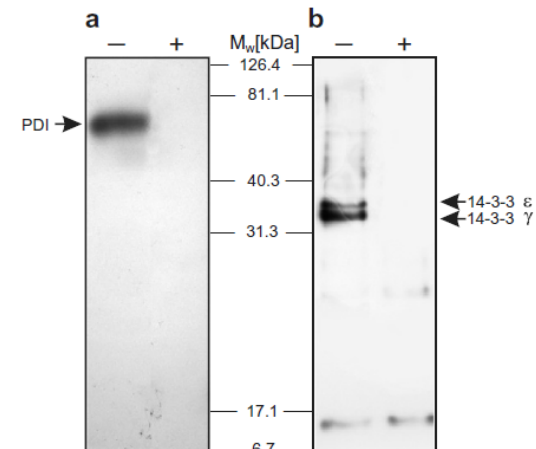


Fig. 3. Sulfo-SBED-AtxC labelling of PDI and 14-3-3, Atx-binding proteins that cannot be affinity-labelled with ^{125}I -AtxC and DSS. PDI (0.7 μM) and 14-3-3 proteins (0.14 μM) were incubated with sulfo-SBED-AtxC (0.7 μM) in the dark. The cross-linking reaction proceeded for 10 min under UV radiation (312 nm). SDS-PAGE analysis (12.5% acrylamide gels) under reducing conditions was followed by Western blotting of the samples and SA-HRP/ECL detection on the membranes. Incubations in the presence or absence of 100-fold molar excess of the native AtxC over sulfo-SBED-AtxC are designated by (+) and (-). For experimental details see Section 2.

- Primer fluorofora: Alexa Fluor 546

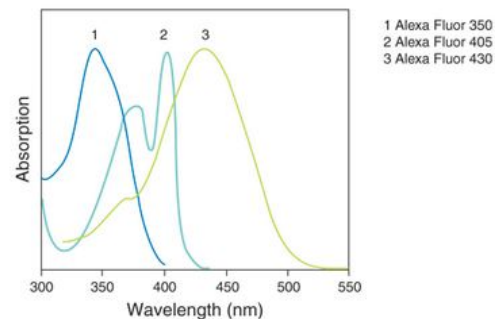
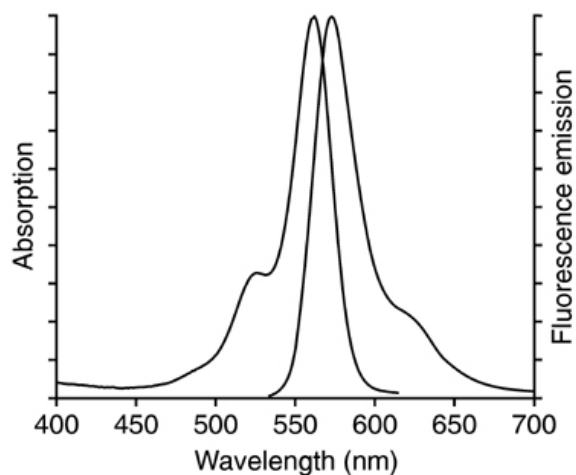
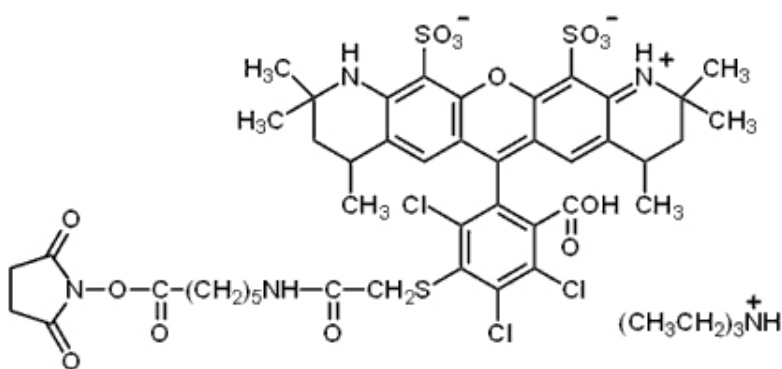


Figure 1.34 Absorption spectra of our ultraviolet and blue light-absorbing Alexa Fluor dyes.

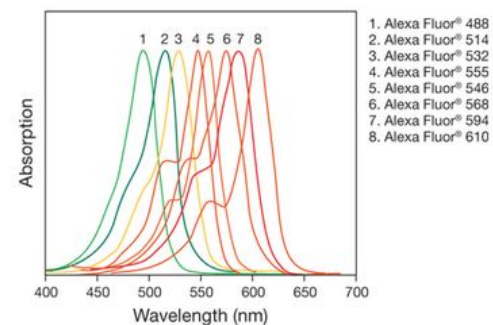


Figure 1.17 Absorption spectra of our green, yellow and red light-absorbing Alexa Fluor dyes.

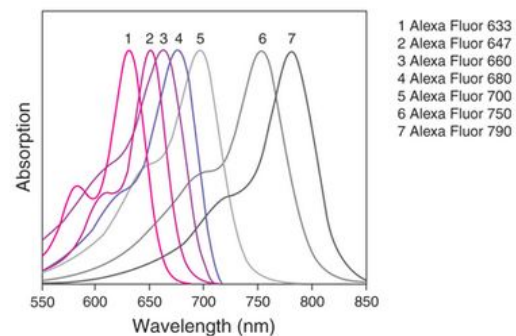
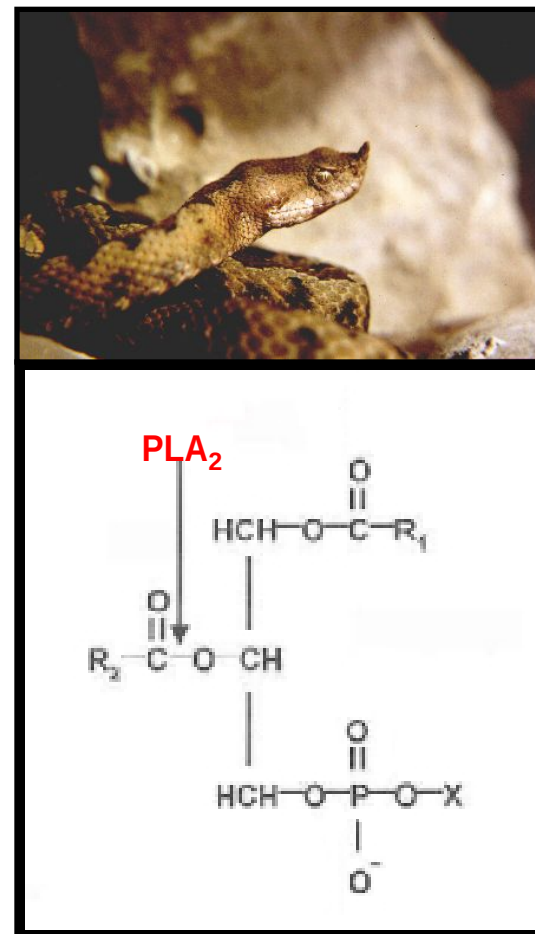


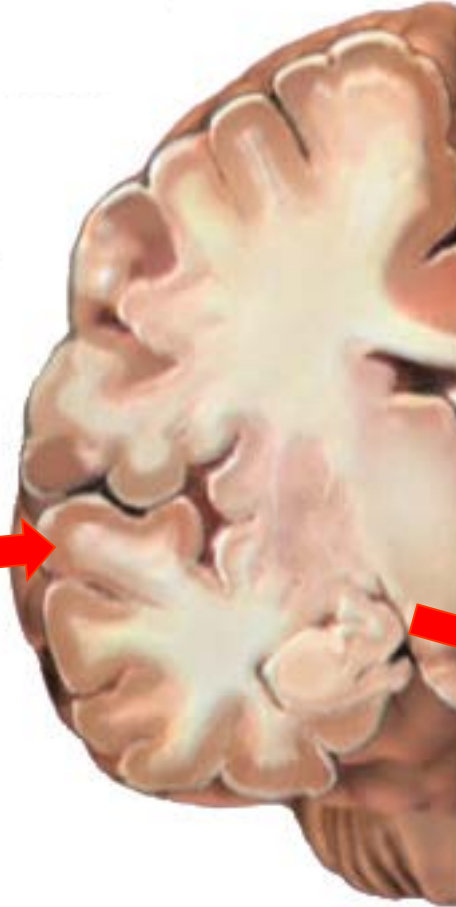
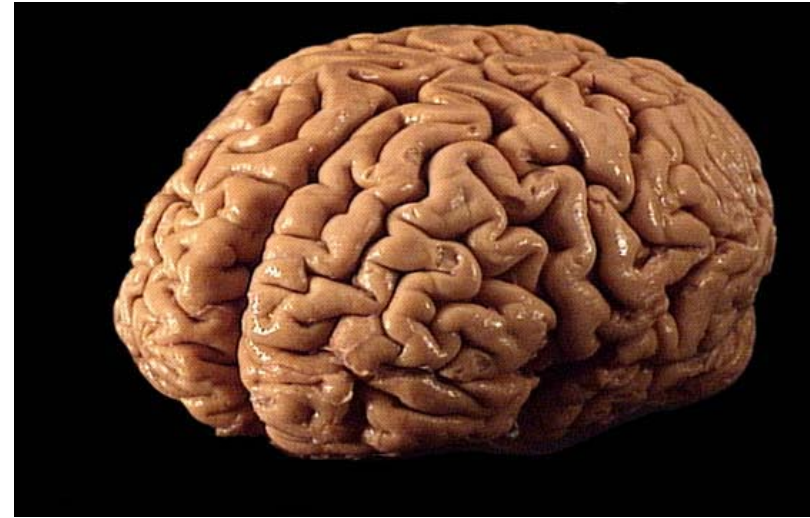
Figure 1.24 Absorption spectra of our far-red and infrared light-absorbing Alexa Fluor dyes. Alexa Fluor 635 dye, available conjugated to antibodies, streptavidin and phalloidin, is not included here but its absorption spectrum is very similar to that of Alexa Fluor 633 dye.

Primer: Identifikacija in izolacija membranskih vezavnih proteinov za amoditoksin (Atx)

- sekretorne fosfolipaze A_2 (sPLA $_2$) iz strupa modrasa (*Vipera ammodytes ammodytes*)
- presinaptični nevrotoksini (β -nevrotoksini)
- preprečitev sproščanja acetilholina iz živčnih končičev - trifazni učinek
- smrt žrtve zaradi paralize dihalnih mišic

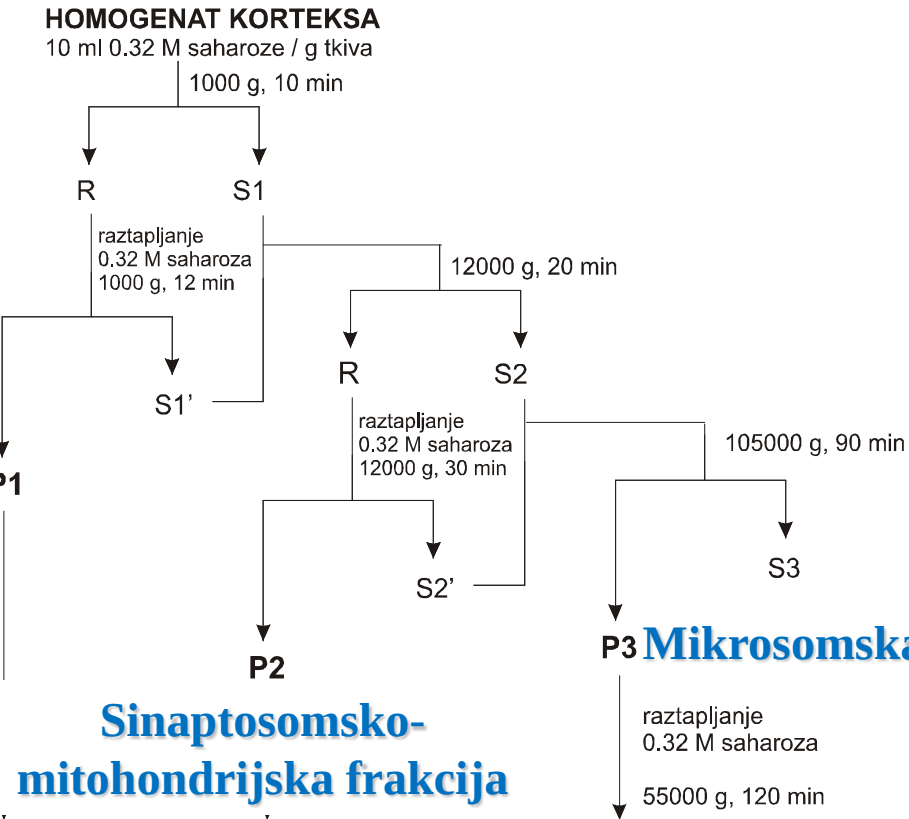


Tkivo: prašičji možgani
(možganska skorja)



Priprava membranskih frakcij z diferencialnim centrifugiranjem

Jedrna frakcija



**Sinaptosomsko-
mitohondrijska frakcija**

Mikrosomska frakcija

Detekcija Atx-vezavnih proteinov na **membranah** korteksa:

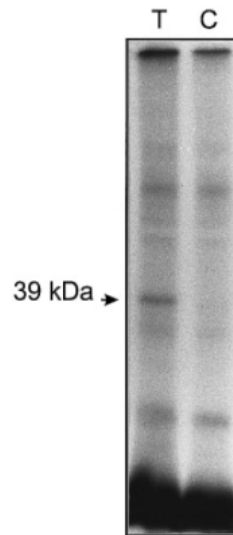
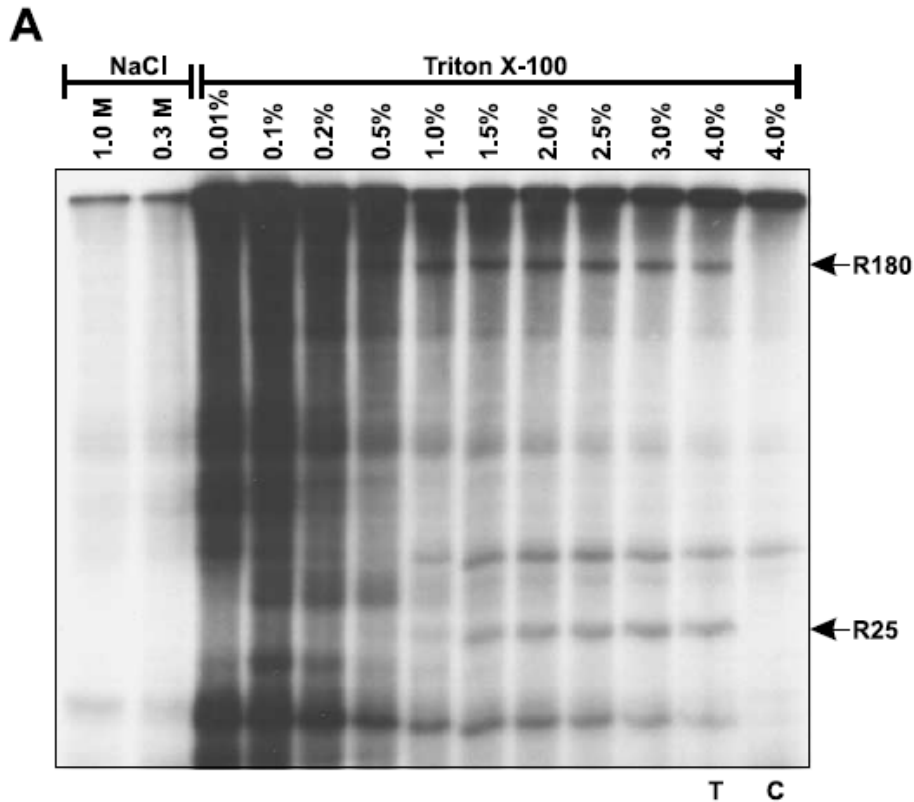


FIG. 2. Affinity labeling of the AtxC-binding component in porcine synaptic membranes. The membrane preparation was incubated with ^{125}I -AtxC in the absence (T) or presence (C) of a 600-fold excess of unlabeled over labeled toxin. After cross-linking (DSS), membranes were solubilized and analyzed on SDS-PAGE under reducing conditions. The patterns shown are autoradiographs. The apparent molecular mass of the specific adduct was determined using Bio-Rad kaleidoscope prestained standards.

- afinitetno označevanje z uporabo radioaktivno označenega Atx in prečnega povezovalca DSS
- Ločba proteinov z NaDS PAGE
- Avtoradiografija

Detekcija Atx-vezavnih proteinov na **ekstraktih membran** korteksa:



- Ekstrakcija membranskih proteinov z različnimi koncentracijami NaCl ali detergenta Triton X-100
- afinitetno označevanje z uporabo radioaktivno označenega Atx in prečnega povezovalca DSS
- Ločba proteinov z NaDS PAGE
- Avtoradiografija

R180 in R25 sta integralna membranska proteina!

Izolacija 180-kDa membranskega proteina

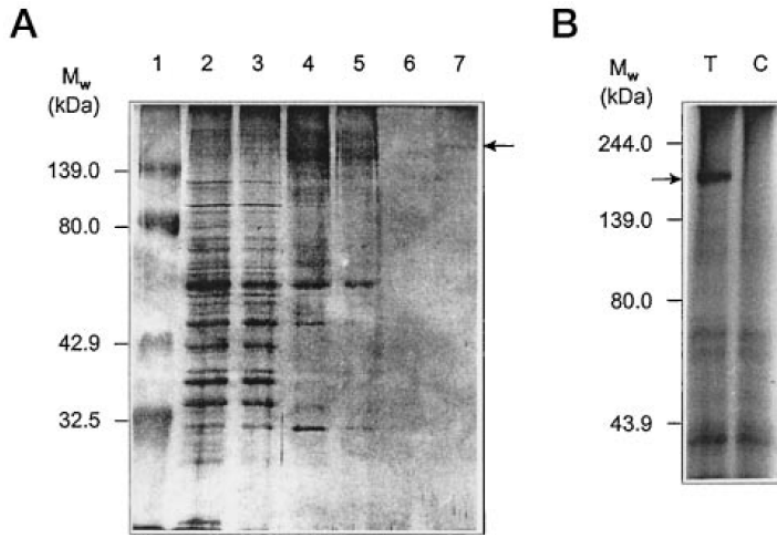


FIG. 2. **Purification of R180 from porcine cerebral cortex.** A, aliquots of the samples obtained in different steps of the purification procedure were analyzed by 10% SDS-PAGE under reducing conditions. The gel was silver-stained. Lane 1, molecular mass standards (β -galactosidase, 139 kDa; bovine serum albumin, 80 kDa; carbonic anhydrase, 42.9 kDa; soybean trypsin inhibitor, 32.5 kDa); lane 2, crude membrane extract, 5 μg of protein; lane 3, breakthrough from wheat germ lectin-Sepharose 6MB, 4 μg of protein; lane 4, eluate from wheat germ lectin-Sepharose 6MB, 4 μl out of 8 ml; lane 5, breakthrough from AtxC-Affi-Gel 10, 4 μl out of 8 ml; lane 6, AtxC-Affi-Gel 10 Triton X-100 (0.3% (w/v)) washing, 4 μl out of 40 ml; lane 7, eluate from AtxC-Affi-Gel 10, 100 μl out of 4.2 ml. The position of pure R180 in lane 7 is indicated by the arrow. B, the final product (lane 7) specifically reacted with ^{125}I -AtxC. An aliquot of the final product was incubated with ^{125}I -AtxC in the absence (T) or presence (C) of 200-fold excess of unlabeled AtxC over the labeled toxin.

- Uporaba lektin-afinitne in Atx-afinitetne kromatografije
- Protein (R180) izoliran v čisti obliki
- Izoliran R180 ohrani biološko aktivnost – sposobnost vezave Atx

Del strukturne karakterizacije 180-kDa membranskega proteina:

TABLE 1

Peptide Sequence Analysis of R180 and L200
by Tandem Mass Spectrometry

AtxC receptor		Peptides ^a	
R180	870	DGSPVIYQNWDK	881
	1339	IPEGVWQLSSCQDK	1353
L200	353	YYATHCEPGWNPHNR	367
	825	SDILTIHSAHEQEFIHSK	842
	870	DGSPVIYQNWDK	881
	923	VWVIEK	928
	1308	WFDGTPTDQSNWGIR	1322
	1339	IPEGVWQLSSCQDKK	1353

^a Two tryptic peptides from R180 and six from L200 were sequenced. Peptides were found identical to the corresponding parts in the sequence of bovine M-type sPLA₂R (12).

- Analiza s tandemsko masno spektrometrijo sta pokazali, da je R180 transmembranski protein – receptor tipa M za sPLA₂.

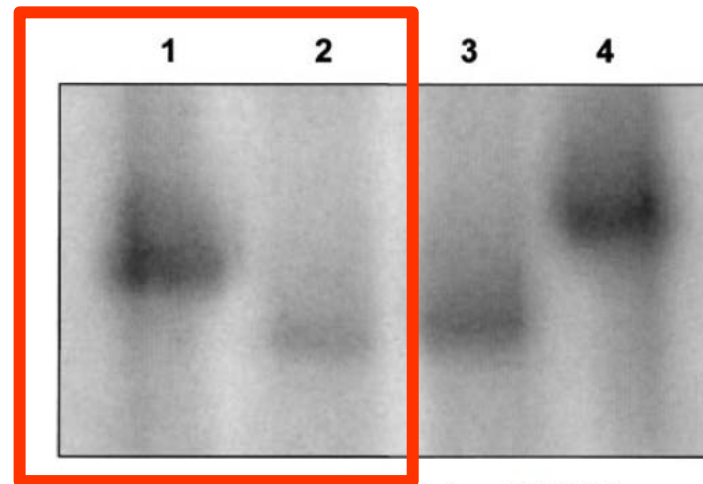


FIG. 3. Effect of peptide *N*-glycosidase F (PNGF) treatment on R180 and L200. The purified sPLA₂Rs were treated with PNGF (lanes 2 and 3) and analyzed on SDS-PAGE in comparison to PNGF-untreated samples (for details see Materials and Methods). Lanes 1 and 2 contain R180 while lanes 3 and 4 contain L200.

- Po obdelavi s peptidno *N*-glikozidazo F se navidezna molekulska masa proteina zniža – R180 je glikoprotein!

Subcelularna lokalizacija 25-kda membranskega vezavnega proteina za Atx

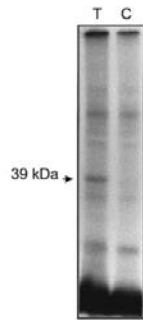
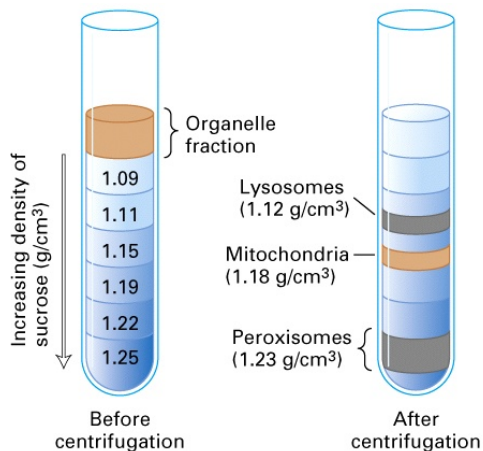
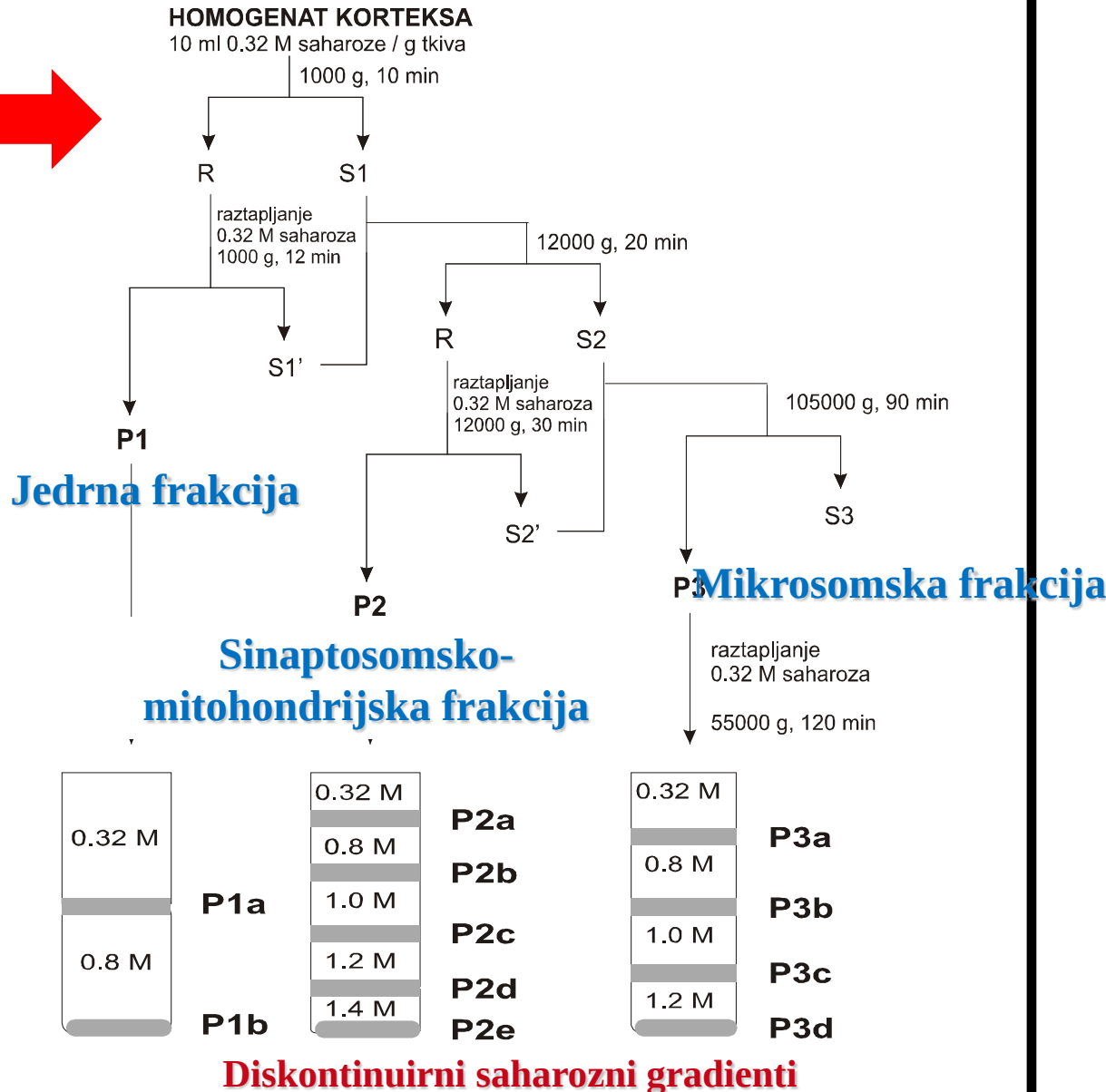
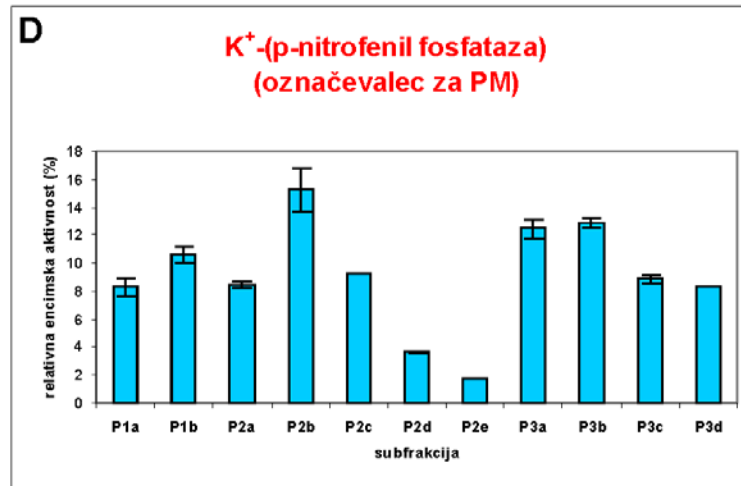
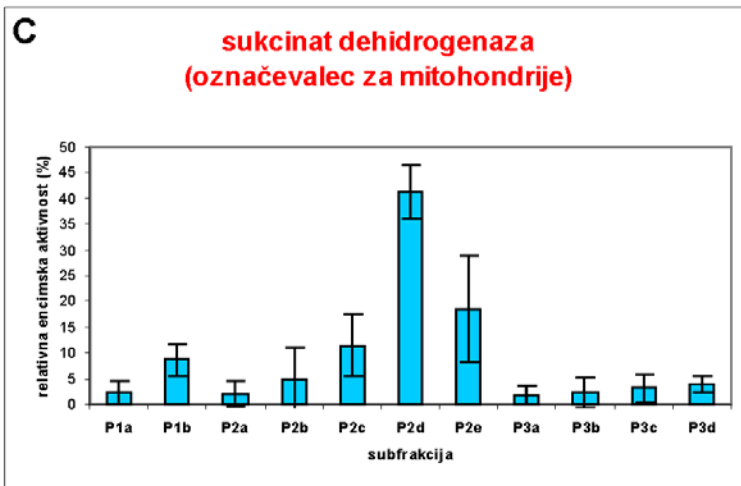
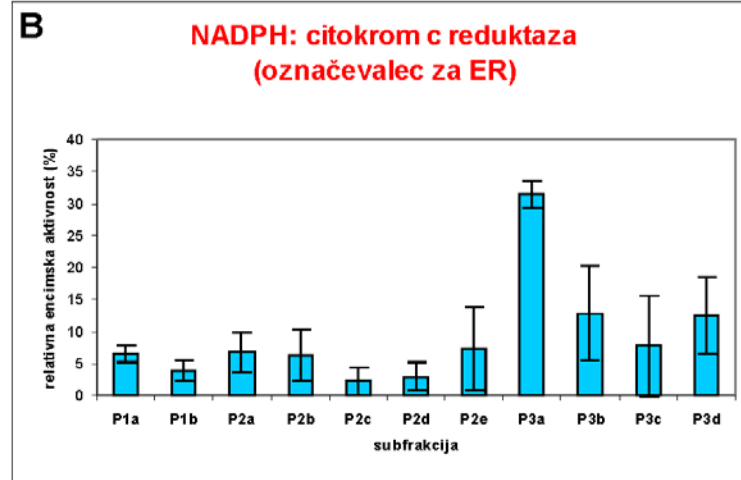
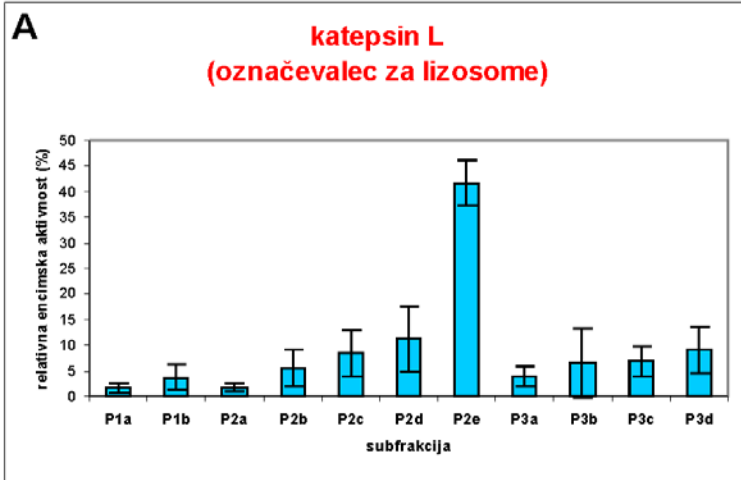
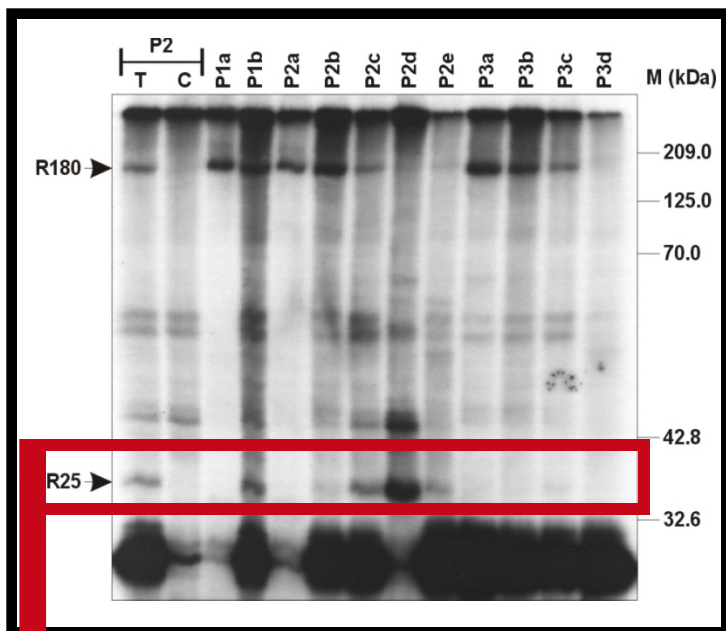


FIG. 2. Affinity labeling of the AtxC-binding component in porcine synaptic membranes. The membrane preparation was incubated with ^{125}I -AtxC in the absence (T) or presence (C) of a 600-fold excess of unlabeled over labeled toxin. After cross-linking (DSS), membranes were solubilized and analyzed on SDS-PAGE under reducing conditions. The patterns shown are autoradiographs. The apparent molecular mass of the specific adduct was determined using Bio-Rad kaleidoscope prestained standards.

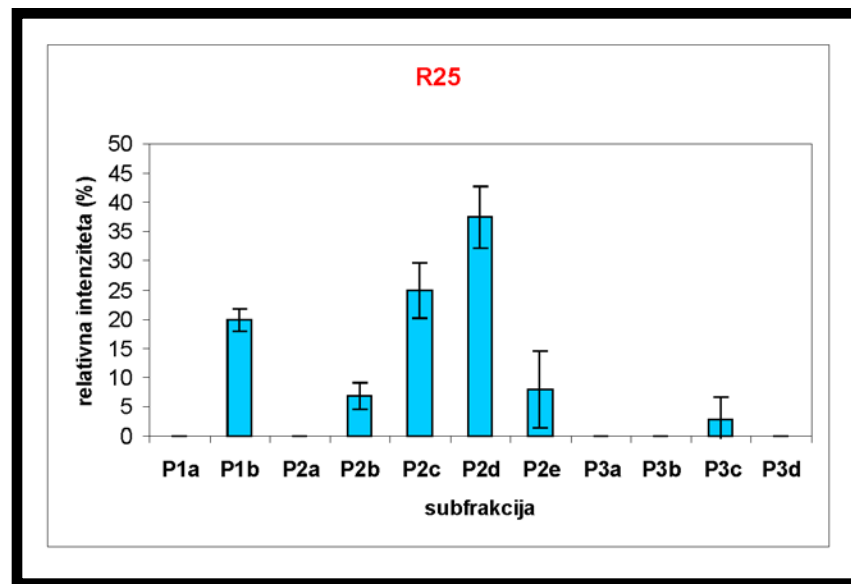
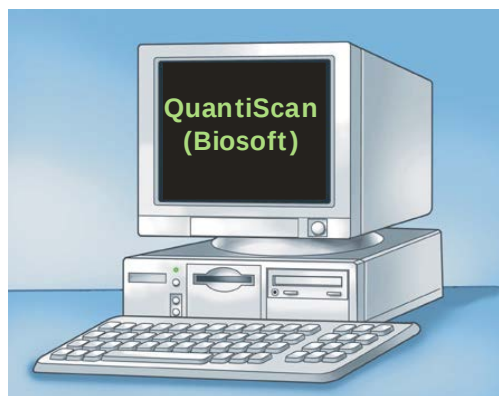


Porazdelitev specifičnih označevalcev za organele

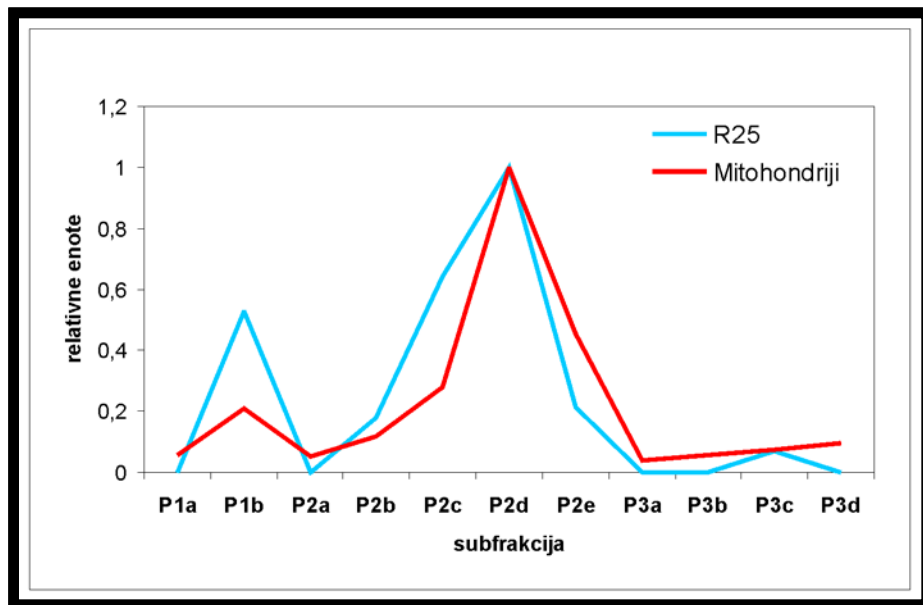




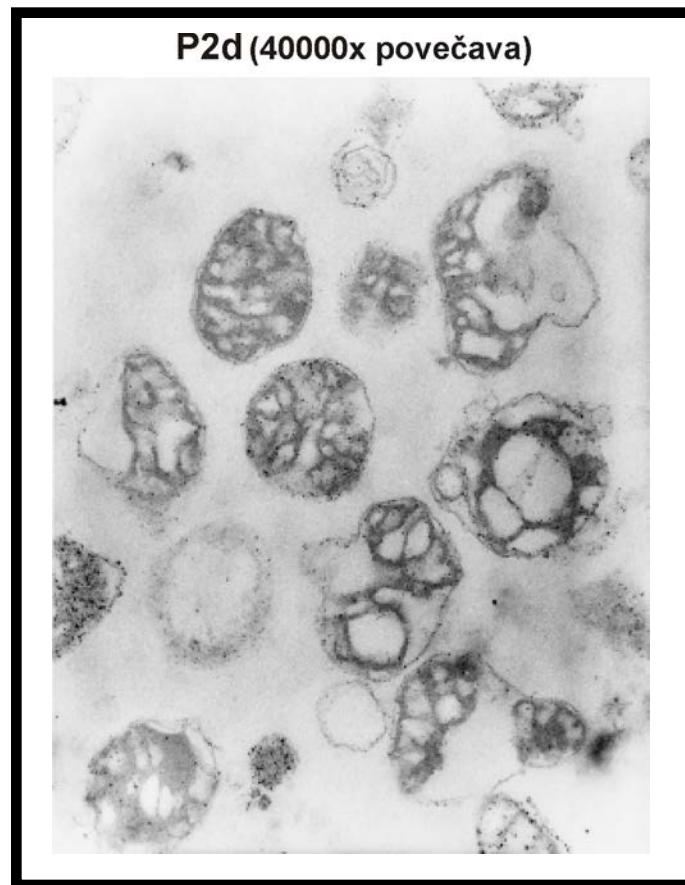
→ porazdelitev R25 v frakcijah
prašičje možganske skorje
(afinitetno označevanje z ^{125}I -Atx)



↓ R25 najdemo predvsem v frakciji P2d.



↓ Porazdelitev R25 se ujema s porazdelitvijo mitohondrijev.



↓ Elektronska mikroskopija je potrdila prisotnost mitohondrijev v frakciji P2d.