

4. UYGULAMALI PROTEİN ELDESİ YÖNTEMLERİ

A. BİLGİ

Organlarda, dokularda ve hücre içerisinde bulunan proteinlerin analiz edilebilmesi için önce hücrenin dışına, bir sıvı içerisinde çıkarılmalıdırlar. Bu sıvı genellikle proteinlerin fizyolojik özelliklerini koruyabilecekleri bir tampondur. Bu tampon içerisinde hücre zarını parçalayacak ajanlar, pH'ı uygun seviyede tutacak tamponlar, proteaz inhibitörleri ve proteinlerin maksimum miktarda elde edilebilmesini sağlayan maddeler bulunmalıdır. Organ, doku ya da hücreler özelleklerine bağlı olarak bistüri, bıçak, makas, havan, sonikatör, grender ve blender gibi araçlar kullanılarak lizat haline getirilirler. Proteinleri hücre içerisinde tutan hücre zarının kırılmasından sonra oluşan protein ve nükleik asit çözeltisine hücreden arındırılmış lizat (cell-free lysate, CFL) adı verilir. CFL'lerdeki nükleik asit ve diğer protein dışı maddeler genellikle santrifüj kullanılarak uzaklaştırılır.

Organ, doku ya da hücre gruplarından protein elde edilirken dikkat edilmesi gereken hususlar,

- ✓ Canlı dokulardaki durumlarının mümkün olduğunca temsil edilebilmesi,
- ✓ Sınırlı miktardaki örnekten mümkün olduğunca fazla protein elde edebilmek
- ✓ Proteinlerin bozulmasını (degradasyonu) engellemek

Protein izolasyonundaki temel amaçlar iki grupta sınıflandırılabilir,

- ✓ Tanımlama ve kantite çalışmaları
- ✓ Fonksiyonel çalışmalar

Proteinlerin farklı yapılarda olmaları, farklı organ, doku, hücre ve hücre kompartımanlarında bulunmaları ve farklı amaçlarla izole edilmeleri nedeni ile izolasyon için çok farklı yöntemler geliştirilmiştir.

B.UYGULAMA

Gerekli tamponlar

Lizis tamponu (50mL) : NaC 0,15M, EDTA 5mM, Tris-HCL 50mM, Np40 %1, Proteaz inhibitör kokteyli-1 tablet (Roche 50mL için EIDA free)

Karaciğer Dokusundan Protein İzolasyonu

1. 1,5 ya da 2 ml'lik boş tüpler tartılarak daraları alınır ve etiketlenir.
2. Karaciğer dokusu bistüri yardımı ile mümkün olduğunca küçük parçalara ayrılır
3. Bu parçalar tüp içine alınarak üzerine PBS dökülür ve 5 dakika beklenir PBS dökülür. Bu işlem doku kandan arındırılmaya kadar tekrar edilir.
4. Kandan arındırılmış doku parçaları sıvı azot yardımı ile havanda dövülerek toz haline getirilir (Özellikle sert dokularda sıvı azot ile dövme gereklidir, ancak bu aşamada doku kaybı olmamasına özen gösterilmelidir).
5. Toz haline gelmiş ekstrakt daha önce tartılmış olan tüpe alınır ve tekrar tartılır, tüp darası çıkarılarak toz haindeki dokunun ağırlığı bulunur.
6. Dokunun ağırlığının 2,5 katı hacimde (gram-ml, mg-µl) lizis tampon tüpe eklenir.
7. Tüp buz içine alınır ve 40 amplitude'de 4-5 saniye sonifike edilir sonra 5 saniye buzda dinlendirilir. Bu işlen homojenizasyon sağlanana kadar 4-5 kez tekrar edilir. Eğer homojenizasyon işleminde zorlanılıyorsa ilaveten su banyolu sonikatörde kullanılabilir.
8. Homojenize olmuş ekstrakt 14000 g'de 45 dakika santrifüj edilir, protein karışımı olan supernatant alınıp ayrı bir tüpe alınır, hemen kullanılmayacaksa alikuatlara ayrılarak -80 C°'de saklanır.

İdrar Gibi Sıvı Örneklerden Çöktürme Yöntemleri ile Protein Ekstraksiyonu

Kullanılacak örnekler çeşitlerine (idrar, serum, plazma...) bağlı olarak bazı ön işlemlerden geçirilip hazır hale getirilmelidirler. Bu işlemlerden sonra aşağıdaki yöntemler kullanılabilir.

TCA (Trichloroacetik acid) Presipitasyonu

1. 1ml örnek 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınır
2. Her biri tüpe örnek hacminin %10'u kadar (100µl) %100'lük TCA konulur ve hemen vortekslenir (10-15sn).
3. 15 dakika buzda bekletilir
4. 10 dakika maksimum hızda santrifüj edilir
5. Pellet alınır, supernatant atılır

6. Pellet üzerine yıkma amacı ile 500µl %100'lük soğuk aseton konulur ve vortekslenir (10-15sn)
7. 5 dakika 14000rpm'de santrifüj edilir
8. Süpernatant atılır, pellet kalır
9. Pellet protein içermektedir, uygun bir sıvı içerisinde çözülmelidir, eğer iki yönlü jel elektroforezi yapılacaksa rehidratasyon tamponu içerisinde çözülebilir.

Asitleştirilmiş Metanol ile Protein Eldesi

1. Örnekler dondurulmuş ise oda ısısına alınıp çözülmesi beklenir
2. Metanol+ TFA (Trifluoroasetik asit) karışımı hazırlanır
3. Karışımın pH'ı 3 civarına kadar indirilir ve -20 C dereceye kaldırılarak soğutulur
4. 1 birim idrar üzerine 3 birim methanol+TFA karışımı konulur
5. 20 dakika buz üzerinde inkübe edilir
6. 50 cc'lik falkon tüplerde 4500 rpm'de 40 dakika santrifüj yapılır
7. Süpernatant atılır, pellet protein içermektedir sonraki çalışmalara uygun bir sıvı içerisinde çözülür.

“DEPLETION”

Bazı dokularda (kan) belirli proteinler (Albumin ve imminoglobulünler) çok yüksek konsantrasyonda bulunurlar ve diğer proteinlerin jel üzerinde ifade edilmelerini engelleyebilirler. Bu proteinler depletion denilen yöntemlerle ortamdan büyük oranlarda uzaklaştırılabilirler.

AURUM AFFİ GEL BLUE MİNİ KİTS and KOLUMNS (732-6708)

Hazırlanması gereken solüsyon: Düşük tuzlu uygulama tamponlarından biri: 20mM acetate pH 5,0, 20mM phosphate pH 7,0, 20mM Tris, pH 8,3. Bu tamponlardan biri ile örneğinizi 125uL örnek+375uL düşük tuzlu uygulama tamponu olacak şekilde seyreltilir, vortekslenir.

Hazırlanması gereken malzemeler: 12x75 mm test tüpü, 2mL'lik toplama tüpleri

NOTLAR:

- Solüsyonlar ve kolonlar +4 C'de saklanmalıdır.
- Örneklerin kolona uygulanmadan önce berraklaştırılması gerekir. Yüksek konsantrasyonda albumin içeren örnekler için kolona uygulanacak hacim miktarı azaltılmalıdır. Bunun için optimizasyona ihtiyaç vardır.
- Albuminden ayrılmış örnekler hemen kullanılmayacaksa-20 C de muhafaza edilmelidir.
- Kolondaki Albumin 500uL Laemmli tamponu(161-0737) ile tekrar elde edilebilir.
- Albuminden ayrılmış örnekler Spin-vac yada Liyofilizatör ile konsantre edilebilir

PROTOKOL

1. Kolonu 12x75mm'lik test tüp üzerine yerleştirin ve 5 dakika kadar resinin çökmesi beklenir.
2. Kolonun kapağını yavaşça açın, alt tıpasını dikkatlice kırın ve tekrar tüp üzerine yerleştirilir..
3. 2 dakika kadar kolon içindeki tamponun akmasını beklenir.
4. Kolon içindeki artık tampon aktıktan sonra kolonu 2 defa 1mL düşük tuzlu uygulama tamponu ile yıkanır. Her yıkamada tamponun kolondan tamamen akmasını beklenir.
5. Son yıkamadan sonra kolon resinin çökmesi için boş temiz 2mL lik bir tüp üzerine yerleştirilir ve 10000g'de 20 saniye santrifüj edilir.
6. Kolon "Unbound" olarak etiketlenmiş yeni bir 2mL tüp üzerine alınır.
7. Daha önce berraklaştırdığınız örneğinizi 2mL ayrı bir toplama tüpü içinde 125uL örnek+375uL düşük tuzlu uygulama tamponu olacak şekilde seyreltilir. Sonra farklı zamanlarda kapağı kapalı şekilde tüpü ters düz ederek karıştırılır.
8. Kolunun resin yatağının üzerine hazırlanan örnek solüsyonundan 300-400uL kadar koyulur. Örneğin "Unbound" etiketli toplama tüpüne akması beklenir.
9. Toplama tüpünü kolanla birlikte mikrosantrifüjde 10000g'de 20 saniye santrifüj ederek artık tamponunda toplama tüpüne geçmesi sağlanır.
10. Kolon ve toplama tüpünün üzerine tekrak 400uL kadar düşük tuzlu uygulama tamponu konur ve tekrar mikrosantrifüje alınır.

11. 20 saniye kadar 10000 g'de santrifüj edilir. "Unbound" etiketli toplama tüpündeki solüsyon albümünden arındırılmıştır.
12. Örneğiniz diğer işlemler(diğer kolon ya da IEF analizleri) için hazırdır. Serum için bu yöntemdeki protein konsantrasyon verimi 3-4mg/mL dir.

Kaynaklar

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2014, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014

Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2013, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-117-8, 2013.