

9. PROTEİN PROFİL ANALİZLERİNDE BELİRLENEN PROTEİN KÜMELERİNDEN PEPTİT İZOLASYONU (TRİPSİNİZASYON)

JEL ÜZERİNDEKİ PROTEİN KÜMELERİNİN JEL İÇİNDE SİNDİRİMİ (TRİPSİNİZASYON)

Yapılan analizler sonucunda belirlenen protein spotlarının kütle spektrometresi analizleri için tripsin enzimi ile proteinlerin peptitlerine ayrılmasını sağlayan tripsinizasyon işlemi uygulanmalıdır. Proteinlerin geri kazanımı için, iki veya tek boyutlu SDS-PAGE jellerinden ilgilenilen bölgelerin kesimi yapılarak, başlangıç yıkaması ve boyanın uzaklaştırılması, redüksiyon-alkilasyon, yıkama dehidrasyon, tripsin eklenmesi ve ekstraksiyon aşamaları gerçekleştirilmektedir.

İlgilenilen protein kümeleri robotik bir sistem olan SpotCutter (Bio-Rad) cihazında 1 veya 1.5 mm çaplı daire parçaları şeklinde kesilir. Bu amaçla önce jel görüntülenir ve kesimi yapılacak protein kümeleri PDQuest 8.0.1 programı aracılığıyla belirlenir. Kesimi yapılan parçalar, her bir kuyucuğuna daha önce 200'er µl. ddH₂O koyulan V tabanlı plaka kuyucuklarına robotik kol tarafından aktarılır.

Tripsinizasyonda Kullanılan Çözeltiler

- 100 mM NH₄HCO₃
- 50 mM NH₄HCO₃
- % 100 ACN
- 10 mM DTT
- 55 mM iodoasetamid
- Ekstraksiyon tamponu:
 - % 1 Formik asit
 - % 2 ACN
 - HPLC su
- Tripsin (5 ng/µl)

Tripsinizasyon Protokolü

1. Hazırlanan solüsyonlar kullanılmadan önce 37 °C'de ön ısıya tabi tutulmalıdır.
2. 50 µl 100mM NH₄HCO₃ (Amonyum bikarbonat) kuyucuğa ilave edilir.
3. 50 µl ACN (Asetonitril) kuyucuğa ilave edilir.
4. 10 dk. 37 °C'de inkübe edilir.
5. Konulan solüsyonlar pipetle geri çekilir.
6. 50 µl 100mM NH₄HCO₃ (Amonyum bikarbonat) kuyucuğa ilave edilir.
7. 50 µl ACN (Asetonitril) kuyucuğa ilave edilir.
8. 10 dk. 37 °C'de inkübe edilir.
9. Konulan solüsyonlar pipetle geri çekilir.
10. 50 µl ACN kuyucuğa ilave edilir.
11. 5 dk. 37 °C'de inkübe edilir.
12. ACN pipetle geri çekilir.
13. 10 dk. 37 °C'de inkübe edilir.
14. Hazırlanan DTT-amonyum bikarbonat karışımından (**taze hazırlanmalıdır**) 50 µl alınarak kuyucuğa eklenir.
15. 30 dk. 37 °C'de inkübe edilir.
16. Hazırlanan iodoasetamid-amonyum bikarbonat karışımından (**taze hazırlanmalıdır**) 50 µl alınarak kuyucuğa eklenir.
17. 20 dk. 37 °C'de inkübe edilir.
18. 100 µl ACN kuyucuğa eklenir.
19. 5 dk. 37 °C'de bekletilir.
20. Kuyucuktaki tüm sıvı geri alınır.
21. 50 µl 100mM Amonyum bikarbonat kuyucuğa ilave edilir.
22. 10 dk. 37 °C'de bekletilir.
23. 50 µl ACN kuyucuğa eklenir.
24. 5dk. 37 °C'de bekletilir.
25. Konulan solüsyonlar pipetle geri çekilir.
26. 50 µl ACN kuyucuğa eklenir.
27. 5dk. 37 °C'de bekletilir.
28. Konulan solüsyonlar pipetle geri çekilir.
29. 50 µl ACN kuyucuğa eklenir.

30. 5dk. 37 °C'de bekletilir.
31. Konulan solüsyonlar pipetle geri çekilir.
32. 15 dk. oda ısısında bekletilir.
33. 5ng/ µl tripsin 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde hazırlanır.
34. Her kuyucuğa 30 µl dilue tripsinden eklenir.
35. 30 dk. oda ısısında bekletilir.
36. Plate üzeri strech filmle kaplanır ve 37 °C'de en az 4.5 saat bekletilir (gece boyunca).
37. Plate 15-30 dk. soğuması için dışarı çıkarılır.
38. Ekstraksiyon tamponu hazırlanır
- 39. Ekstraksiyon aşamalarında her kuyu için yeni pipet ucu kullanılmalıdır!!!**
40. 30 µl ekstraksiyon tamponu eklenir.
41. Kapağı kapalı bir şekilde 30 dk. oda ısısında bekletilir.
42. Çok kısa süreli bir santrifüj yapılır.
43. Sıvı faz, temiz PCR plakasına çeker ocak altında aktarılır.
44. 12 µl ekstraksiyon tamponu ve 12 µl ACN her bir kuyucuğa eklenir.
45. 30 dk. oda ısısında beklenir.
46. Sıvı faz PCR plakası üzerine çeker ocak altında dikkatlice tekrar ilave edilir.
47. Kurumaya bırakılır (Kurutma işlemi için yardımcı cihaz kullanılmadığı durumda kuruma süresi sıvı miktarına göre değişmekle beraber en az gece boyu sürebilen bir aşamadır).
48. Kuruma işlemi sonrasında ileri analizler için plaka üzeri kapalı olarak +4 °C koşulunda saklanabilir.

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.