Izolacija metalotioneina upotrebom gel filtracije

Lujanac, Josip

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:996665

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek



Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odijel za kemiju

Preddiplomski studiji kemije

Josip Lujanac

Izolacija metalotioneina upotrebom gel filtracije

Završni rad

Mentor: doc. dr sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2019.

Sadržaj

1. Uvod 5
2. Literaturni pregled 6
2.1. Metalotioneini 6
2.1.1. Povijesni pregled metalotioneina 6
2.1.2 Struktura metalotioneina 7
2.1.3. Funkcija metalotioneina 8
2.1.4 Metalotioneini u staničnim funkcijama 9
2.1.5. Metalotioneini i detoksikacija metalnih iona 10
2.2 Gel filtracija 11
2.2.1. Pojmovi u gel filtraciji 11
3. Materijali i metode 13
3.1. Kemikalije 13
3.2. Metode 13
3.2.1 Gel filtracija 13
3.2.2. Koncentriranje uzoraka 15
3.2.3. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu 16
4. Rezultati i rasprava 20
4.1. Gel filtracija sa Sephadex G-50 uz precipitaciju acetonom 20
4.2. Gel filtracija sa Sephadex G-50 uz koncentriranje filtracijom 21
4.3. Gel filtracija sa Sephadex G-100 uz koncentriranje filtracijom 22
5. Zaključak 23
6. Popis literature 24

Sažetak

Metalotioneini su proteini male molekulske mase i specifične strukture bogate cisteinima. Prisutni su u mnogim organizmima te su važni za održavanje homeostaze esencijalnih metalnih iona te za detoksifikaciju teških metala. Njihova detekcija i analiza zahtjeva prethodnu izolaciju iz kompleksnih bioloških uzoraka. Gel filtracija je vrsta tekućinske kromatografija kojom se proteini razdvajaju na osnovi veličine te je pogodna za izdvajanje malih proteina, poput metalotioneina, iz kompleksnih bioloških uzoraka.

U ovom su radu, metodom gel filtracije uz Sephadex G-50 i G-100, izdvojeni metalotioneini iz homogenata gujavica (*Lumbricus terrestris*) tretiranih cinkom.

Ključne riječi: metalotioneini, gel filtracija, elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Abstract

Metallothioneins are low molecular weight proteins with specific structure rich in cysteines. They are present in many organisms and are important for maintaining homeostasis of essential metal ions and for detoxification of heavy metals. Their detection and analysis requires prior isolation from complex biological samples. Gel filtration is a type of liquid chromatography that separates proteins based on their size and is suitable for separating small proteins, such as metallothionein, from complex biological samples.

In this work, gel filtration with Sephadex G-50 and G-100 was used for isolation of metallothioneins from zinc-treated earth worm (*Lumbricus terrestris*) homogenates.

Key words: metallothioneins, gel filtration, polyacrylamide gel electrophoresis

1. Uvod

Metalotioneini (MT) su skupina malih proteina koji u strukturi imaju do 68 aminokiselina [1]. Prva pojava metalotioneina u zabilježena je 1957. godine, a dobili su naziv po velikom sadržaju sumpora i kadmija [2]. Kasnija istraživanja su pokazala značajnu ulogu ovih proteina u detoksikaciji organizma od kadmija, cinka i ostalih po organizam štetnih metala. Struktura metalotioneina se dijeli u dvije domene α i β, oblika kruga povezanih sa aminokkiselinskom poveznicom, u kojima dolazi do vezanja metala preko sumpora iz aminokiselina cisteina, kojima obiluju [3,4,5]. Takva struktura im omogućuje da oslobode manje toksičan cink i zamjene ga štetnim kadmijem. Uz detoksikaciju metala, MT imaju veliku ulogu i u homeostazi stanice [6,7].

MT koji su sastavni dio mnogih stanica se mogu izolirati iz istih pomoću tekućinske kromatografije sa čvrstom fazom u obliku gela. Gel filtracija omogućuje razdvajanje proteine prema veličini. Razdvajanje se odvija tako da mali proteini kao što su metalotioneini difundiraju u pore gela i time se usporavaju dok veći proteini prolaze između kuglica gela i prvi se eluiraju [8].

U ovom su radu, iz homogenata gujavica (*Lumbricus terrestris*) izloženih cinku, MT izdvojeni gel filtracijom sa Sephadexom G-50 i G-100. Nakon razdvajanja, dobiveni eluati su podvrgnuti različitim metodam koncentriranja uoraka te je provedena elektroforeza u poliakrilamidnom gelu kako bi se provjerila uspješnost razdvajanja.

2. Literaturni pregled

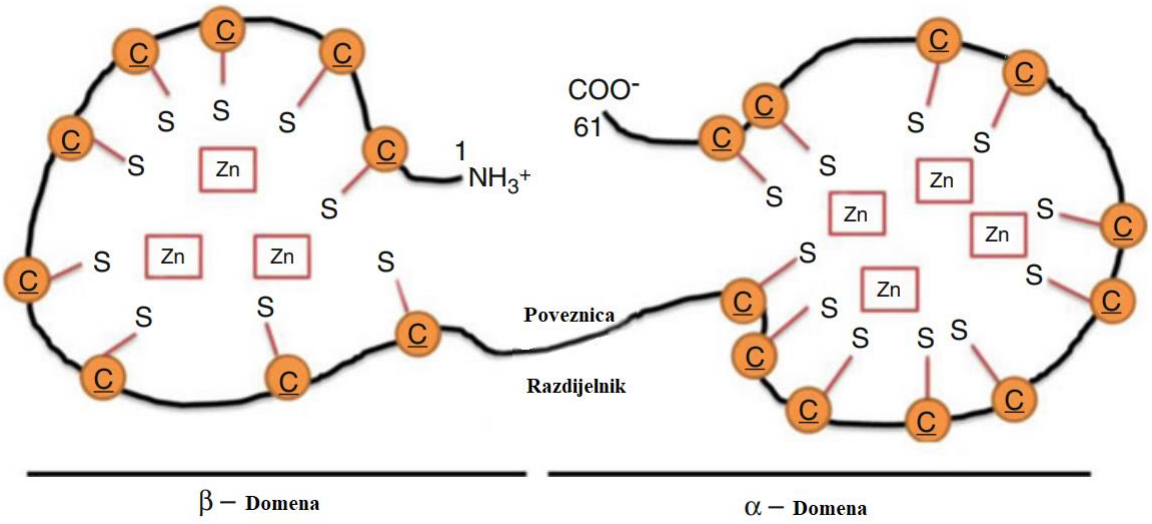
2.1. Metalotioneini

2.1.1. Povijesni pregled metalotioneina

Povijest metalotioneina (MT) započinje 1957. godine kada su ih otkrili Margoshes i Valee [2]. Tada je prvi put identificiran metalotionein, peptid izoliran iz bubrežnog tkiva konja, koji je sadržavao kadmij.. Naziv je dobio po tome što je sadržavao veliki udio sumpora (4,1 % suhe mase), kadmija (2,9 %) i cinka (0,6 %). Izolacija je provedena uz konvencionalne metode tog doba iz 5 zamrznutih tkiva konjskih bubrega. Kasnija istraživanja su dala podatke o nekim fizičkim svojstvima te molekularnoj masi koja je iznosila 10000 ± 260 Da. Specifična apsorpcija je pri 260 nm što poslijedica kadmij-merkaptid veza odnosno veza između kadmija i RS^- iona. Pretpostavljeno je da su metalotioneini siromašni aromatskim aminokiselinama zbog odsutnosti apsorpcijskog maksimuma na 280 nm što je i kasnije potvrđeno analizom aminokiselinskog sastava [9]. Visoka koncentracija sumpora koja može iznositi čak do 8,5 % je objašnjena aminokiselinskom analizom kojom je otkriveno da se protein sastoji od velike količine cisteina [2]. Istraživanja provedena 1964. o utjecaju i toksičnosti kadmija na zdravlje te povezanosti s metalotioneinima, pokazala su da se MT induciraju uslijed djelovanja malih doza kadmija u ponavljajućim intervalima [10]. Kasnija istraživanja MT su se razvijala u dva smjera. Prvi se bavio proteinskom kemijom, a drugi smjer proučavao kinetiku između MT i toksičnost kadmija. Nadalje istraživanja su se i proširila na važnost metalotioneina u kombinaciji s mnogim drugim metalima, no posebno za bakar i živu. [2] U 70-tim i početkom 80-tih godina prošlog stoljeća postojao je samo ograničen broj istraživačkih grupa koje su se bavile istraživanjima povezanim uz metalotioneine. Prvo međunarodno okupljanje na temu metalotioneina održano je 1978 godine u Zürich-u na kojem se raspravljalo o nomenklaturi i metodama sinteze tog proteina. Nakon prvog okupljanja je uslijedilo i drugo u istom gradu 1985. dok je treće bilo u Japanu 1992 godine [2].

2.1.2 Struktura metalotioneina

Metalotioneini, kao i svi proteini, posjeduju određeni slijed aminokiselina i trodimenzionalnu strukturu. To su sveprisutni polipeptidi niske molekularne mase s vrlo visokim sadržajem cisteina i metala,što povećava broj metalno–tiolatnih klastera [11]. Svaki protein ili polipeptid koji svojom strukturom nalikuje MT se može i klasificirat kao MT. U sisavaca se razlikuju četiri izoforme MT (MT1-4), koje mogu sadržavati od 61 do 68 aminokiselina. MT-1, MT-2, MT-4 izoforme se sastoje od 61 do 62 aminokiseline dok MT-3 izoforma sadrži 68 aminokiselina. MT sadrže do 20 cisteinskih ostataka [12,13]. Nadalje, nije pronađena niti jedna aromatska aminokiselina u strukturi MT sisavaca. Sekvenciranje proteina je otkrilo da se molekula MT sastoji od jednog polipeptidnog lanca u kojem su cisteinski ostatci organizirani u sljedove Cis–X–Cis, Cis–X–X–Cis i Cis–Cis, gdje X označava aminokiselinu koja nije cistein [14]. Cisteinski ogranci su vezne domene metala u MT molekuli koja ima dvije domene, α i β (slika 1). Dvije vezne domene metala su razdvojene sa slijedom aminokiselina koji ne sadrži cistein, a često se smatra razmakom ili poveznicom. Domena α se sastoji od aminokiselina 31-68 i nalazi se na C-terminalnom kraju dok se β-domena sastoji od aminokiselina 1-31 i nalazi se na N-terminalnom kraju [3, 4, 5]. Pokazano je da α-domena ima sposobnost povezivanja do 4, a β-domena do 3 dvovalentna metalna iona kao što su ioni cinka, kadmija, žive ili olova [15]. Dio proteina koji ne sadrži metalne ione naziva se apo-metalotionein (apo-MT) ili thionein [16]. Uz veliki broj dostupnih informacija vezanih za metalirane metalotioneine točan mehanizam inicijalnog keliranja metanih iona još nije određen kao i kinetika uklanjanja i naknadnog razmotavanja proteina. Nedavno je naznačeno kako se apo-MT u stanicama nalazi u količini jednakoj metaliranom obliku. Ta činjenica naznačuje potencijalnu ulogu MT u odsutnosti metala [17, 12].



Slika 1: Struktura metalotioneina. Slika prikazuje dvije domene proteina, α ili C terminalnu domenu sa 31-61 aminokiselinama i 4 kelirana cinkova metalna iona, β ili N terminalnu domenu sa 1-31 aminokiselinama i 3 kelirana cinkova iona. Preuzeto i adaptirano iz [1]

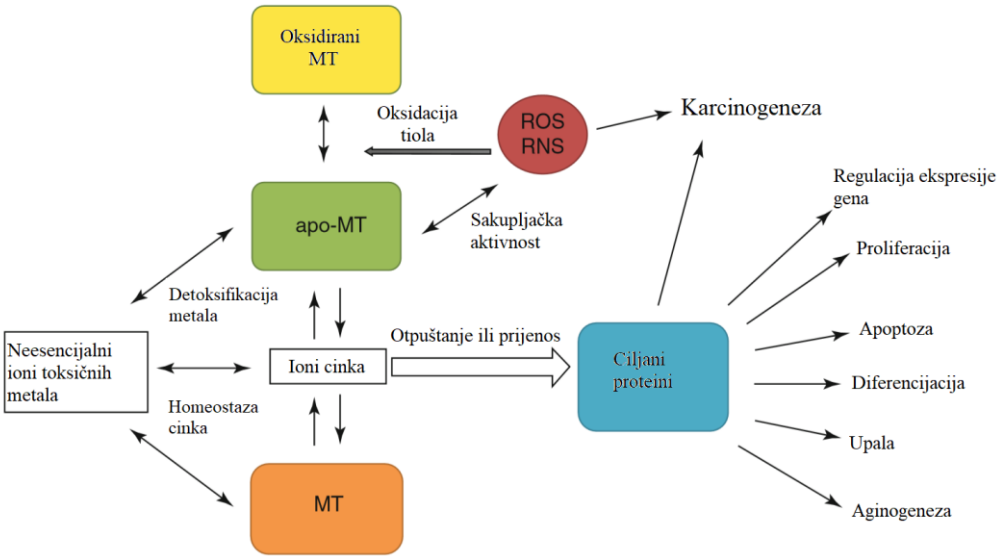
Cinkovi ioni, koji se prirodno nalaze u organizmu, smatraju se glavnim veznim metalom apo-MT-a, no mogu se vezati i neki ne esencijalni metali koji se mogu patološki naći u organizmu kao što su olovo, bakar, kadmij, živa, platina, krom, bizmut i srebro. Ti metali često posjeduju veći afinitet prema veznim mjestima apo-MT [18, 19]. Metalacija proteina se događa nakon što je tionein sintetiziran u ribosomu te dolazi do zasićenja sa različitim ionima metala ovisno o specifičnoj izoformi proteina ili o različitim koncentracijama dostupnih metala. Tako je na primjer, metodom masene spektrometrije uz ionizaciju elektroraspršenjem i analizator vremena leta (ESI – TOF – MS) pokazano da MT – 3 slabije veže ione metala kadmija i cinka u odnosu na MT – 2, no nasuprot, MT-3 pokazuje veći kapacitet vezanja metala i plastičnost [12, 20].

2.1.3. Funkcija metalotioneina

Metalotioneini imaju brojne funkcije od uloge u staničnom ciklusu do uklanjanja toksičnih metala iz organizma. Njihova sposobnost vezanja metala u svoju strukturu im omogućuje zamjenu prisutnih manje toksičnih metala u strukturi sa toksičnijim metalima kao što je kadmij. Kod trovanja kadmijem je uočena direktna povezanost između porasta koncentracije kadmija i koncentracije metalotioneina [21].

2.1.4 Metalotioneini u staničnim funkcijama

Metalotioneini su detektirani u različitim normalnim i patogenim stanicama kao i u krvnom serumu gdje su sposobni regulirati i posredovati u nekoliko važnih staničnih procesa (slika 2) [6,7].



Slika 2. stanični procesi koji su regulirani ili posredovani metalotioneinima, apo-MT apometalotionein, ROS reaktivne kisikove vrste, RSN reaktivne dušikove vrste. Preuzeto i adaptirano iz [1]

Funkcionalne MT-1/2 izoforme su pronađene pretežito u staničnoj citoplazmi i ponekim organelima, sa pretežitom ekspresijom u mitohondrijima [22)]. Koncentracija proteina je uvelike ovisna o oksidativnom stanju tih organela. Zbog male molekularne veličine MT mogu se transportirati kroz vanjsku membranu mitohondrija i regulirati propusnost unutarnje membrane [23]. Prisutnost izoformi MT je pronađena i u lizosomima gdje je pokazano da MT-1 i MT-2 štite organel od oksidativnog stresa reduciranjem intralizosomske peroksidativne reakcije katalizirane željezom [24]. Nadalje se pokazalo da MT-3 posreduje u pravilnom funkcioniranju lizosoma u astrocitima i neuronima tako što utječe na njihovu funkciju i vijabilnost stanice [25]. Pokazalo se, da se, pod uvjetima okisdativnog stresa, MT-1/2 izoforme naglo translociraju u jezgru stanice kroz jezgrene pore. Nakon što se lokaliziraju u jezgri molekule MT-1/2 igraju važnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji stanice [26)].

2.1.5. Metalotioneini i detoksikacija metalnih iona

Metalotioneini zbog svoje strukture i sposobnosti vezanja metala mogu služiti u izbacivanju metala iz tijela, kako esencijalnih tako i ne esencijalnih. Zbog toga se MT smatraju primarnim proteinima za detoksikaciju metala. Ova tvrdnja proizlazi iz niza istraživanja na raznim vrstama, od gljiva do sisavaca, u kojima je prisutan veliki broj izoformi MT [12]. Pokazano je da apo-MT može vezati od 7 do 9 dvovalentnih iona no točan afinitet određenih iona metala varira. Međutim, većina istraživanja je pokazala da MT imaju veći afinitet prema izrazito toksičnim metalima poput kadmija, olova i žive[23,24]. Ti ioni metala mogu zamijeniti cink ili neki drugi metalni ion nižeg afiniteta vezanja, što može dovesti do promjena u ključnim staničnim procesima kao što su transkripcija i translacija [25]. Zaštitnički efekt MT-1/2 u većini slučajeva je uglavnom uzrokovan otpuštanjem iona cinka iz molekula MT-1/2 i naknadnom aktivacijom transkripcijskog faktora MTF-1 (Metal regulatory transcription factor 1) što dovodi do povećanja u ekpresiji MT. Nadalje otpuštanje iona cinka inducira pro-oksidativni efekt ostalih toksičnih metala kao što su kadmij tako što mijenjaju ravnotežu redoks stanja prema reducirajućem/antioksidacijskom efektu MT–1/2 molekula [26]

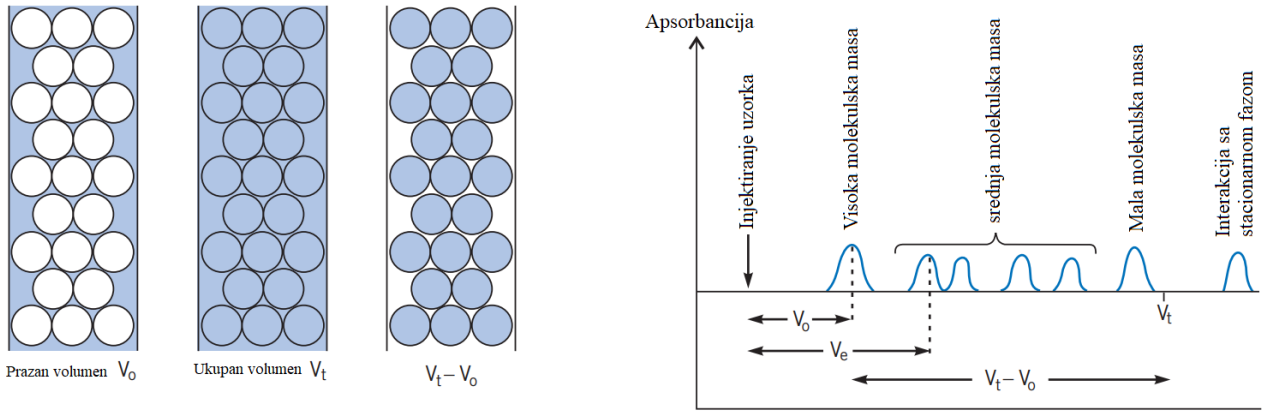
2.2 Gel filtracija

Gel filtracija je vrsta teućinske kromatografije kojoj je stacionarna faza u obliku gela a mobilna faza je tekuća, najčešće pufer. Filtracija molekula se zasniva u razlici u veličini dok prolaze kroz kolonu napunjenu kromatografskim medijem koji je gel u obliku kuglica. Pomoću ove moetode ćemo razdvajati smjesu proteina po osnovi njihove veličine. Tako će velike molekule proteina izaći prve dok će ostale manje molekule izlaziti postupno, ovisno o njihovoj veličini.

Gel je heterogeni sustav u kojem se tekuća faza koja je uobičajeno vodena sadržana unutar pora čvrste faze to jest matriksa. U gelovima za filtraciju se nalaze pore strogo kontrolirane veličine, a matriks je odabran za kemijsku i fizikalnu stabilnost i inertnost. Mogu se formirat od polimera sa umrežavanjem kako bi nastala trodimenzionalna mreža. Na primjer Sephadex je formiran umrežavanjem dekstrana. Neki polimeri kao agaroza se formiraju spontano pod određenim uvijetima. Kompozitni gelovi se mogu pripremiti na način da se drugi polimer presadi na već formiranu matriks. Kao što je to supedex kod kojeg se lanci dekstrana kovalentno vežu na već visoko umrežena matrica gela agaroze. Kompozitni gelovi su interesantni po tome što povezuju vrijedna svojstva od više gel sustava [8].

2.2.1. Pojmovi u gel filtraciji

Prazan volumen kolone V_0 je volumen kolone bez stacionarne faze odnosno volumen eluensa do pojave prvih molekula. Ukupan volumen V_t je volumen kolone s volumenom stacionarne faze, a $V_t - V_0$ je volumen stacionarne faze u koloni (slika 3) [27].



Slika 3: Dijagramski prikaz V_0, V_t i dijagram koji prikazuje odnose volumena i veličine molekula preuzeto i prilagođeno iz [27]

3. Materijali i metode

3.1. Kemikalije

Za provedbu rada korištene su kemikalije analitičke čistoće, a korištena voda je demineralizirana i deionizirana.

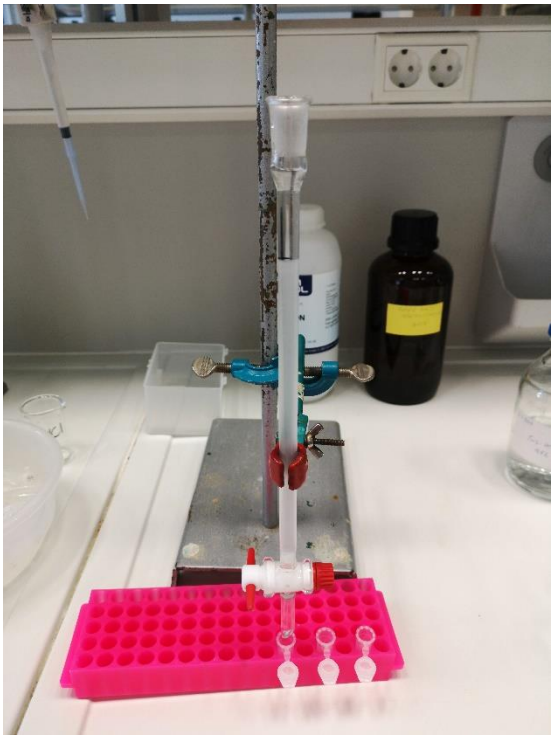
Aceton, C_3H_6O (M = 58,08 g/mol, Sigma - Aldrich)
Acetonitril, C_2H_3N (M = 41,05 g/mol, Sigma - Aldrich)
Akrilamid, C_3H_5NO (M = 71,08 g/mol, Sigma - Aldrich)
Amonijev persulfat, APS, $(NH_4)_2S_2O_8$ (M = 228,18 g/mol, Acros Organics)
Bisakrilamid, *N,N'*-metilenbisakrilamid (M = 154,17 g/mol, Sigma - Aldrich)
***Coomassie brilliant* plavo** (M = 825,97 g/mol, JT Baker)
Ditiotreitol, DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$ (M = 154,25 g/mol, BDH Prolabo)
Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), $C_{10}H_{16}N_2O_8$ (M = 292,24 g/mol, BDH Prolabo)
Glicerol, $C_3H_8O_3$ (M = 92,094 g/mol, Sigma - Aldrich)
Kalijev dihidrogen fosfat KH_2PO_4 (M = 136,086 g/mol, Kemika)
Kalijev hidrogen fosfat, K_2HPO_4 (M = 174,2 g/mol, Kemika)
Klorovodična kiselina, HCl (M = 36,46 g/mol, Carlo Erba)
Monobromobiman, mBBr, $C_{10}H_{11}BrN_2O_2$ 90mM (M = 271,11 g/mol, Cayman Chemical)
Natrijev dodecil sulfat, SDS, $NaC_{12}H_{25}SO_4$ (M = 288,37 g/mol, Acros Organics)
Metanol, CH_3OH (M = 32,04 g/mol, Sigma - Aldrich)
Octena kiselina, CH_3COOH (M = 60,05 g/mol, Sigma - Aldrich)
TEMED, *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin, $C_6H_{16}N_2$, (M = 116,21 g/mol, AppliChem)
Tricin, $C_6H_{13}NO_5$ (M = 330,29 g/mol, Fisher Scientific)
Tris(hidroksimetil)aminometan, TRIS, $C_4H_{11}NO_3$ (M = 121,14 g/mol, BDH Prolabo)

3.2. Metode

3.2.1 Gel filtracija

U laboratorijsku čašu od 100 mL odvaže se 2 g Sephadex G-50 ili G-100 gela te se doda 50 mL Tris-HCl pufera (50 mM, pH 7,2) te se ostavi bubriti 2,5 sata na sobnoj temperaturi.

Kada je gel nabubrio postavi se kolona za filtraciju, provjeri se ispravnost pipca i na dno se postavi komadić vate kako bi se spriječilo istjecanje gela. Potom se kolona napuni do pola s Tris-HCl puferom (50 mM, pH 7,2) kako pri ulijevanju gel ne bi ostao suh i popucao. Potom se gel iz čaše dodaje postupno do željene visine (slika 4). Na kolonu se zatim nanese 100 µL plavog dekstrana pomoću mikropipete te se propušta i skuplja u mikroepruvete (od 1,5 mL) po 1 mL kako bih se odredio prazni volumen kolone, tj. volumen potreban kako bi izašle prve velike molekule. Kada se odredio prazni volumen i kada je izašao plavi dekstran, na vrh kolone se doda 100 µL uzorka. Uzorak se postupno eluira dodatkom pufera. Prvo se skuplja određeni prazni volumen (cca. 3 mL), a potom se skuplja po 1 mL eluata u mikroepruvete.



Slika 4: Aparatura za gel filtraciju

Nakon što su se svi uzorci sakupili doda im se 400 µL acetona (80%) te se uzorci spreme u zamrzivač da se talože. Tijekom cijelog postupka se mora pazit da se gel ne osuši ili da ostane bez pufera jer pri tome dolazi do pucanja gela i time se gubi sama funkcija gela.

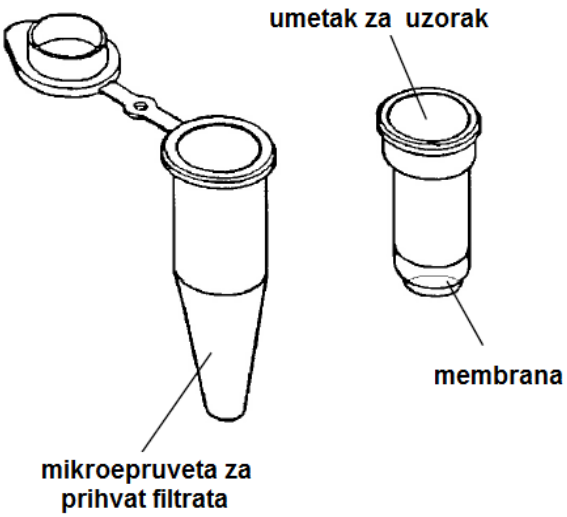
3.2.2. Koncentriranje uzoraka

Nakon gel filtracije, uzorci su koncentrirani precipitacijom acetonom pri čemu je eluatima dodna dvostruka količina ledenohladnog, 80 % acetona te su pohranjeni na – 20 C preko noći. Potom su centrifugirani na 15 000 x *g*, pri 4 °C (*Centric 200R, Tehtnica*). Dobiveni pelet je resuspendiran u 40 µL Tris-HCl pufera (slika 5).



Slika 5: aparat za centrifugiranje

Koncentriranje eluiranih uzoraka je provedeno i pomoću posebnih mikroepruveta koje sadrže umetak s membranom za filtriranje (Nanosep® Centrifugal Devices, Pall Life Sciences, USA) (slika 6). Eluati su stavljeni u umetak s membranom i centrifugirani na 10 000 x *g* , pri 4 °C pri čemu u umetku zaostaje koncentrirani uzorak, a višak pufera prolazi u mikroepruvetu.



Slika 6 : prikaz mikroepruveta korištenih za koncentriranje.

3.2.3. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Najčešće korištena metoda za razdvajanje proteina je glicin-SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) ili poznatija pod imenom Laemmlin-SDS-PAGE [28]. Metoda se zasniva na puferskom sustavu glicin-Tris-a te je optimalna za razdvajanje proteina u rasponu od 20-100 kDa, ovisno o koncentracijama akrilamida i bisakrilamida. Razdvajanje proteina manjih od 20 kDa u Laemmli sustavu je skoro nemoguće i zahtjeva korištenje poliakrilamidnih gelova visoke gustoće ili onih s gradijentom [29]. Zbog tog razloga je preferirana elektroforetska metoda za analizu ovakvih proteina tzv. tricin-SDS-PAGE, koja koristi tricin-Tris puferski sustav [30]. Ova je metoda posebno pogodna za proteine raspona 1-20 kDa te se može provoditi i pri nižim koncenracijama poliakrilamida što olakšava kasnije bojanje gelova.

3.2.3.1 SDS-PAGE elektroforeza

Priprema poliakrilamidnih gelova za elektroforezu su rađeni prema tablici 1 i 2:

Tablica 1: Prikaz potrebnih volumena reagensa za pripravu razdvajajućeg poliakrilamidnog gela koncentracije 12%

	12% gel
AB (40 % T,3 % C)	4,5mL
gel pufer (3M Tris-HCl, pH 8,45, 0,3% SDS)	5mL
glicerol	1,5mL
voda	4mL
APS (10 %)	75µL
TEMED	7,5µL

Tablica 2: Prikaz potrebnih volumena reagensa za pripravu sabijajućeg poliakrilamidnog gela

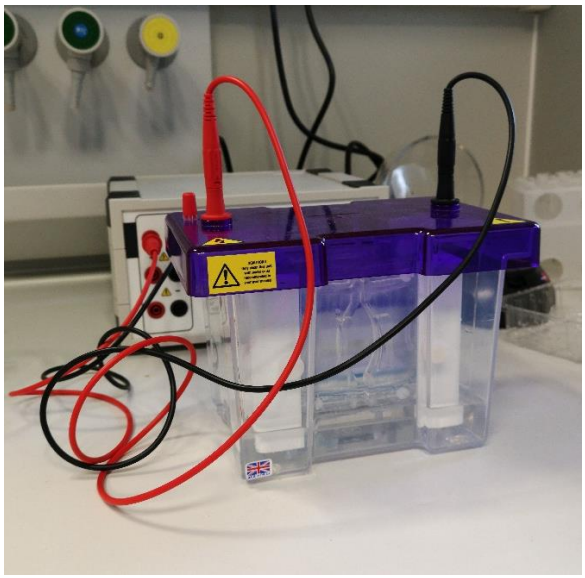
AB (40 % T,3 % C)	0,5 mL
gel pufer (3M Tris-HCl, pH 8,45, 0,3% SDS)	1,25 mL
voda	3,25 mL
APS (10 %)	50 µL
TEMED	5 µL

Za provođenje elektroforeze u puferskom sustavu tricin-Tris su pripremljene dvije vrste pufera, anodni sastava: 0,2 M Tris i pH 8,9 i katodni pufer sastava: 0,1 M Tris, 0,1 M tricin, 0,1% SDS i pH 8,25. Pufere je potrebno prije eksperimenta razrijediti s destiliranom vodom u omjeru 1 : 9 (pufer : voda). Uzorci se pripreme za nanošenje na gel dodatkom pufera za nanošenje uzoraka koji se sastojij od: 40% glicerol, 2% SDS, 0,04% *Coomassie brilliant* plavo, 0,5 M Tris i pH 6,8 pri čemu je u mikroepruveti pomiješano 6 µL prethodno obrađenog uzorka s 10 µL destilirane vode i 4 µL pufera za nanošenje uzorka. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 5 minuta na 70 °C u suhoj kupelji.

Osim uzroaka pripremljen je i standard metalotioneina MT-1 (*Enzo Life Sciences*, SAD). Odvojeno je 2 µL standarda koncentracije 1 µg/µL i dodano mu je 5 µL Tris-HCl pH 7,0. Standard je deriviran dodatkom 1 µL mBBr te je inkubiran 15 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon inkubacije dodano je 2 µL pufera za nanošenje uzoraka te je standard inkubiran 5 minuta na 70 °C u suhoj kupelji.

Gelovi s postoljem su postavljeni u kadicu za elektroforezu (slika 7). Cijeli sustav je ispunjen katodnim i anodnim puferima za elektroforezu. Pripremljni uzorci su zatim naneseni na poliakrilamidni gel u za to predviđene jažice. U prvu jažicu je nanesen molekularni markeri raspona mase 3,5 - 40 kDa (*Carl Roth*, Njemačka).

Kada su svi uzorcinaneseni, uređaj za elektroforezu (*omniPAGE Mini Vertical Protein Electrophoresis System, Clever Scientific*) se zatvori te spoji na protok struje. Elektroforeza je provedena na 50 V i 80 mA prvih 30 minuta, nakon čega je napon povećan na 120 V. Otprilike 1,5 h kasnije odnoso nakon što su se uzorci približili donjem rubu stakala, elektroforeza je zaustavljena. Isključen je uređaj za elektroforezu te su iz njega izvađena stakla s gelom. Stakla su oprezno razdvojena i gelovi su izvađeni u fiksirajuću otopinu (40% metanol, 10% octena kiselina). Gelovi su bojani otopinom *Coomassie brilliant* plavo (50% metanol, 10% octena kiselina, 0,25% *Coomassie brilliant* plavo) 30 minuta. Nakon bojanja, gelovi su odbojani 2 x po 15 min u fiksirajućoj otopini u kojoj su potom ostavljeni i preko noći.

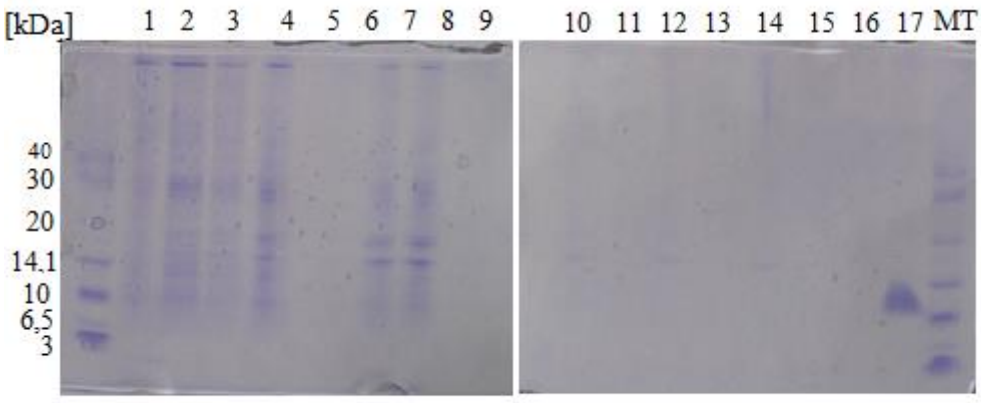


Slika 7: aparat za elektroforezu

4. Rezultati i rasprava

4.1. Gel filtracija sa Sephadex G-50 uz precipitaciju acetonom

Kako su MT proteini male molekularne mase, njihovo određivanje u kompleksnim uzorcima otežava prisutnost znatno većih proteina. Za izdvajanje MT iz uzoraka homogenata gujavica korištena je gel filtracija sa Sephadex G-50. Ovaj se polimer koristi za razdavajanje molekula u rasponu od 1,5 – 30 kDa te je odabran kako bismo postigli što bolje razdvajanje molekula manjih molekularnih masa [27]. Proteinska frakcija homogenata gujavice dobivena nakon centrifuge pri 30 000 x *g* propuštena je kroz kolonu za gel fitraciju ispunjenu Sephadexom G-50. Po 1 mL uzorka, eluiranog s kolone, koncentrirano je precipitacijom s acetonom te je napravljena Tricin-SDS-PAGE elektroforeza. Tricin-SDS-PAGE je preferirani elektroforetski sustav za razdvajanje proteina malih molekulskih masa kao što su MT [30]. Na slici 8 prikazan je gel dobiven gel elektroforezom te obojan s CBB. U prvom i posljednjem stupcu naneseni su proteinski molekularni markeri u rasponu od 3,5 do 40 kDa (Roti®-Mark PETIT, *Carl Roth*, Njemačka). U stupcu označenom MT-1 nanesen je komercijalno dostupan standard metalotioneina, MT-1 (*Enzo Life Sciences*, SAD) kako bi se odredio položaj MT u gelu u odnosu na molekularni marker.

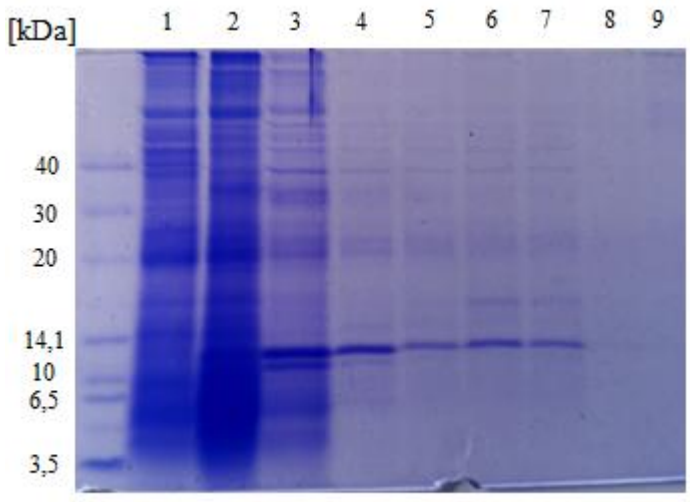


Slika 8. Gel dobiven Tricin-SDS-PAGE elektroforezom nakon razdvajanja uzorka gel filtracijom sa Sephadexom G-50 uz precipitaciju acetonom

Iz slike se može vidjeti da razdvajanje proteina na osnovi molekularne mase nije bilo dovoljno uspješno. Većina proteina, neovisno o masi, izašla je iz kolone u prvih 8 frakcija. Ipak, u 7. i 8. frakciji se mogu zamijetiti nešto izraženije vrpce u području nižih molekularnih masa. U frakcijama 2, 3, 4 i 8 je slabo vidljiva vrpca koja položajem odgovara MT-1 standardu.

4.2. Gel filtracija sa Sephadex G-50 uz koncentriranje filtracijom

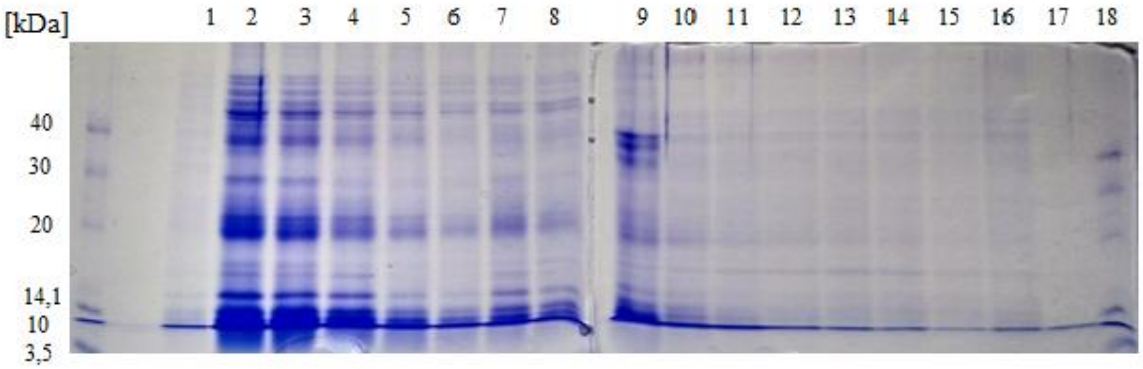
Kako bi se pospješila detekcija samih MT u uzorku, ponovljena je gel filtracija sa Sephadex G-50, ali su eluirani uzorci koncentrirani filtracijom pomoću acetona. Pri tome su spojene po 3 eluirane frakcije u 1 i zajedno podvrgnute koncentraciji. Tricin-SDS-PAGE tako dobivenih uzoraka rezultirala je gelom prikazanim na slici 9. Ovdje se može uočiti znatno bolja vidljivost vrpci na gelu. Kao i u prethodnom eksperimentu, u prvih 9 frakcija, koncentriranih u stupce 1, 2 i 3, eluirana je većina proteina s kolone. U preostalim frakcijama još su vrlo slabo vidljivi proteini, osim izraženih vrpci u području molekulske mase ≈ 12 kDa koja odgovara MT-1 standardu. Ovakvi rezultati upućuju na to da je Sephadex G-50 pogodan za izdvajanje MT iz kompleksnih uzoraka, ali je vrlo bitna i obrada uzoraka nakon same gel filtracije kako bi se dobile što oštrije vrpce. Koncentriranje eluata pomoću se u ovom slučaju pokazala kao bolja metoda u odnosu na precipitaciju acetonom.



Slika 9. Gel dobiven Tricin-SDS-PAGE elektroforezom nakon razdvajanja uzorka gel filtracijom sa Sephadexom G-50 uz koncentriranje filtracijom

4.3. Gel filtracija sa Sephadex G-100 uz koncentriranje filtracijom

Radi usporedbe, napravljena je i gel filtracija uzoraka koristeći Sephadex-100 kao stacionarnu fazu. Ovaj polimer se može koristiti za razdvajanje proteina u rasponu masa od 4 – 150 kDa. Uzorci su nakon eluiranja koncentrirani filtracijom. I u ovom slučaju je većina proteina eluirana u prvih nekoliko frakcija, no ne može se uočiti značajnije razdvajanje proteina različitih molekularnih masa. Također, u ovom su slučaju izostale izražene vrpce u području mase koja bi odgovarala MT. Stoga se može zaključiti da je gel filtracija sa Sephadex G-50 učinkovitija za razdvajanje MT od uporabe Sephadex G-100.



Slika 10. Gel dobiven Tricin-SDS-PAGE elektroforezom nakon razdvajanja uzorka gel filtracijom sa Sephadexom G-100 uz koncentriranje filtracijom

5. Zaključak

Metalotioneini imaju veliku ulogu u detoksikaciji našeg organizma od štetnih metala kao što su kadmij i živa te imaju ulogu u homeostazi stanice zbog svoje sposobnosti prijenosa metala.. Zbog male molekulske mase, MT je vrlo teško određivati u kompleksnim uzorcima u kojima su prisutni proteini raznih, posebice velikih molekulskih masa. U ovom je radu ispitana mogućnost korištenja gel filtracije, kao relativno jednostavne i jeftine metode razdvajanja proteina na osnovi njihove veličine. Pokazano je da je gel filtracija sa Sephadex G-50 dala učinkovitije rezultate izdvajanja MT u odnosu na gel filtraciju sa Shephadex G-100, što je potvrđeno elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u tricin-SDS-PAGE sustavu.

6. Popis literature

[1] P. Dziegiel, B. Paula , C. Kobierzycki, M. Stasiolek, M. Podhorska-Okolow, Metallothioneins in Normal and Cancer Cells. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, Springer, Cham, 2016.

[2] M. Margoshes, B.L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.* **17** (1957), 4813-4814.

[3] K. Zangger, G. Shen, G. Oz, JD. Otvos, IM Armitage, *Biochem J*, **359** (2001), 355-360.

[4] P. Babula, M. Masarik, V. Adam, T. Eckschlager, M. Stiborova, L. Trnkova, H. Skutkova, I. Provaznik, J. Hubalek, R. Kizek, *Metallomics*, **4** (2012), 739-750.

[5] P. Dzigiel, W. Salwa – Zurwska, J. Zurawski, A. Wojnar, M. Zabel, *Histol Histopathol*, 20(2005):83-89.

[6] P. Dziegiel, *Pol J pathol*, 55(2004), 3-12.

[7] J. Kurseova, D. Hynek, V. Adam, R. Kizek, R. Prusa, J. Hrabeta, T. Eckshlager, *Int J Mol Sci*, 14(2013), 12170-12185.

[8], L. Hagel, *Current Protocols in Molecular Biology*, **44** (2001), 10.9.1-10.0.20.

[9] G.F. Nordberg, M. Nordberg, M. Piscator, O. Vesterberg, *Biochem. J* . **126** (1972), 491.

[10] M. Piscator, *Nordisk hygienisk tidskrift*, **65** (1964), 76.

[11] E. Carpene, G. Andreani, G. Isani, *J. Trace. Elem. Med. Bio.* , **21**(2007), 35-39.

[12] Vasak M, *J. Trace. Elem. Med. Bio.*, **19** (2005), 13-17

[13] M. Vasak, G. Meloni, *J. Biol. Inorg. Chem.,* **16** (2011), 1067-1078.

[14] Y. Kojima, C. Berger, B.L. Vallee, J.H. Kagi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* ,**73** (1976), 3413 – 3417.

[15] K.E. Duncan, T.T. Ngu, J.J. Chan, M.T. Salgado, M.E. Merrifield, M.J. Stillman, *Exp. Biol. Med.,* **231** (2006), 1448-1499.

[16] P. Coyle, J.C. Philcox, L.C. Carey, A.M. Rofe, *Cell. Mol. Life. Sci.*, **59** (2002b), 627-647.

[17] K.E. Duncan, M.J. Stillman, *J. Inorh. Biochem.* , **100** (2006), 2101-2107.

[18] M. Nordberg, G.F. Nordberg, *Cell. Mol. Biol*., **46** (2000), 451-446.

[19] T.T. Ngu, M.J. Stillman, *IUBMB Life*, **61** (2009), 438-446.

[20] P. Palumaa, I. Tammiste, K. Kruusel, L. Kangur, H. Jornavall, R. Sillard, *Biochim. Biophys. Acta*, **1747** (2005), 205-211.

[21] G.F. Nordberg, M. Norberg, M. Piscator, O. Vesterberg, *Biochem. J.*, **126** (1972), 491.

[22] D. Banerjee, S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **24** (1982) 95-105.

[23] C. Simpkins, T. Lloyd, S. Li, S. Balderman, *J. surg. Res.*, **75** (1998), 30-34.

[24] S.K. Barid, T. Kurz, U.T. Brunk, *Biochem. J.*, **394** (2006), 275-283.

[25] S.J. Lee, M.H. Park, H.J. Kim, J.Y. Koh, *Glia*, **58** (2010), 1186.1196.

[26] M.D. Apostolova, I.A. Ivanova, M.G. *Cherian, Biochem. Cel.l Biol.*, **78** (2000), 27-37.

[27] http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_gelfiltration.pdf (23.09.2019).

[28] U. K. Laemmli, *Nature*, **227** (1970), 680-685.

[29] M. Krsnik-Rasol, B. Balen, B. Maček, D. Pavoković, Skripta za internu uporabu: Elektroforetske tehnike istraživanja proteina, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2004.

[30] H. Schägger, G. von Jagow, *Analytical Biochemistry* **166** (1987) 368-379.