# Plasman fraktiointi ainioninvaihtokromatografialla, proteiinipitoisuuden määritys Lowryn menetelmällä ja SDS-Page.

## Tiivistelmä

Fraktioimme proteiinit kromatografiapylväällä ja Tris-puskureilla, joilla oli erilainen NaCl-konsentraatio, selvitimme näytteiden proteiinipitoisuuden Lowryn menetelmällä laimennussarjaa vastaan ja selvitimme proteiinien koon SDS-Pagella.

## Johdanto

Plasma on veren nestemäinen, verisoluton, osa joka voidaan sentrifugoinnin avulla erottaa kokoverestä. Plasmasta 90% on vettä. Loput 10% koostuvat ravinto- ja rakenneaineista, CO2, kuona-aineista ja plasmaproteiineista. Kolme merkittävintä plasman proteiiniryhmää ovat fibrinogeenit, albumiinit ja globuliinit.

Anioninvaihtokromatografia erottaa proteiinit niiden kokonaisvarauksen perusteella, erottelu on riippuvainen pylvään geelin koostumuksesta ja pHsta. esim. Proteiini jolla on positiivinen varaus pH:ssa sitoutuisi negatiivisesti varautuneeseen pylvääseen.

Lowryn menetelmä on herkkä tapa selvittää näytteen proteiinipitoisuus. Siinä käytetään regeanssinollaa, joka sisältää kaikki muut liuoksessa olevat aineet, mutta ei proteiinia. Proteiinien tyrosiini- ja tryptofaaniaminohappojen fenoliryhmät osoitetaan fenoliregeanssilla (Folin-Ciocalteu-regeanssi) emäksisessa kupari-ioneita sisältävässä puskuriliuoksessa. Proteiinit ja fenolireagenssi pelkistävät Folin-Ciocalteu-reagenssin voimakkaan sinivihreän väriseksi.

SDS-Page on paljon käytetty erottelu- ja analyysimenetelmä, joka erottelee proteiinit niiden koon perusteella ja jonka avulla saadaan selville proteiinien molekyylipaino. Ennen ajoa proteiinien konformaatio hajoitetaan lisäämällä näytteeseen pelkistävää merkaptoetanolia ja aionista detergenttiä (SDS). SDS-molekyylien aiheuttama suuri negatiivinen varaus peittää proteiinien alkuperäisen varausken alleen, jolloin ne liikkuvat geelissä molekyylipainonsa mukaisesti. Erotteluajo suoritetaan vertikaalisessa kaksiosaisessa slab-geelissä.

## Aineisto ja menetelmät

**Eluutio** Nimesimme 20kpl koeputkia a1-a5, b1-b5, c1-c5 ja d1-d5. Käytössä kromatografiapylväs 1,5x10cm. Pylvään tekemiseen käytetty geeli: NAEA Siphadex A25 20mM Tris-HCl ph8, +20% Etanoli (käytetty) ja laskemalla yhteensä n. 26ml 20mM Tris-HCl pH8,00 (a-puskuri) pakkaamiseen.

Sentrifugoimme 1ml Työ 1:ssä otetusta plasmanäytteestä [SL Plasma 02-03], josta tehtii 1:2 laimennos a-puskuriin. Pipetoimme 1ml laimennettua plasmaa pylvään päälle ja valutimme sen a-puskurilla pylvään sisään. Aloitimme eluoinnin 10ml a-puskurilla, jolla täytimme 2ml putkiin a1-a5. Seuraavaksi käytimme 10ml 20mM Tris-HCl 30mM NaCl –puskuria, jolla täytimme 2ml putkiin b1-b5. Seuraavaksi käytimme 10ml 20mM Tris-HCl 150mM NaCl –puskuria jolla täytimme 2ml putkiin c1-c5. Jatkoimme 10ml 20mM Tris-Hcl 2M NaCl –puskurilla, jolla täytimme 2ml putkiin d1-d5.

Proteiinimääritystävarten laitoimme 80ul kutakin kerättyä fraktiota ja laimennettua, sekä puhdasta sentrifugoitua plasmaa yhteen mikrotiitterilevyn kuoppaan, mukaanlukien nollanäytetteen, jossa oli pelkkää a-puskuria. Jokaiseen kuoppaan lisättiin 80ul Bradfordin regeanssia. Arvioimme sinisen värin intensiteetin asteikolla 0 (vaalea), + , ++ (tumma) (Taul.1.).

**Lowry** Tehdään fraktioista laimennokset vastaavasti: Asteikko 0-fraktioista 250ul, +-fraktioista 1:2 laimennos a-puskuriin, ++-fraktioista 1:5 laimennos a-puskuriin. Puhtaasta sentrifugoidusta plasmasta tehdään 1:50, 1:100, 1:300 ja 1:500 laimennokset a-puskuriin.

Teimme ½ -laimennossarjan a-puskuriin. Pitoisuuksia on yhteensä kuusi ja jokaisesta tehdään kaksi rinnakkaismääritystä (yht. 12 standardinäytettä, nimetty 1-12). Pipetoimme putkiin 1-10 250ul a-puskuria ja 250 ul BSA-kantaliuosta putkiin 9-12. Aloitimme laimennussarjan seuraavasti: 250ul putkista 9,10 -> 7,8, 250ul putkista 7,8 -> 5,6, 250ul putkista 5,6 -> 3,4 ja poistimme 250ul putkista 3 ja 4.

Valmistimme n.60ml CuSO4-käyttöliuosta (50 osaa 2% Na2Co3 ja 0,5% CuSO4-tartraattia) sekoittamalla 60ml 2%Na2CO3 ja 1,2ml 0,5% CuSO4. Lisäsimme 1,5ml tehtyä käyttöliuosta kaikkiin putkiin, mukaanlukien eluutiotyön putket a-d 1-5. Ja seisotimme niitä pimeässä n. 10min. Lisäsimme jokaiseen putkeen 150ul laimennettua Folin-Ciocalteun fenoliregeanssia (1:3 veteen). Vorteksoimme näytteet lisäämisen jälkeen. Siirsimme seisomaan pimeässä n. 30min. Pipetoimme joka näytettä mikrotiitterilevylle 300ul per kuoppa. Mittasimme spektrofotometrillä absorbanssin aallonpituudella 690nm (Taul.2.)

Suhteutimme arvot nollanäytteiden keskiarvoa kohti (0,06), taulukoimme arvot ja muodostimme niiden perusteelta standardisuoran. (Taul.3.) Standardisuoran kulmakertoimeksi määritelty k= dy/dx = 0,515/0,25 = 2,06 . Lineaarisen suoran yhtälö y = kx+b |b=0 , y = kx eli x= y/k eluutionäytteiden mg/ml arvot saadaan jakamalla absorbanssi (A) kulmakertoimella (k) (Taul.4.) Taulukon arvojen perusteella sijoitetaan fraktiot a-d 1,5 ja saadut mg/ml ja muodostetaan eluutiokäyrä (Kuvaaja: Eluutiokäyrä).

**SDS-PAGE** Eluutiokäyrän perusteella valitsimme a-d korkeimmat mg/ml fraktiot. Joka fraktiota tarvitaan niin paljon, että siinä on 5ug proteiinia, jos tarvittava näytetilavuus ylittää 10ul, näytteet konsentroidaan kylmäkuivaajassa ja jos tarvittava näytetilavuus on alle 10ul lisäsimme KOV-vettä.

A2 = 5 ug/ 1,545 ug/ul = 3,23ul | B5 = 5 ug/ 0,031 ug/ul = 38,141ul | C4 = 5 ug/ 1,045 ug/ul = 4,78ug | D4 = 5 ug/ 0,711 ug/ul = 7,03ul

Koska näyte B5 ylittää 10ul, veimme sen kylmäkonsentroitavaksi tunniksi, jonka jälkeen lisäsimme siihen 10ul KOV-vettä. Teimme näytteen myös plasmanäyteestä ottamalla 1ul plasmaa.

Teimme 12,5% erottamis- ja konsentrointigeelit työkirjan ohjeen mukaan. Lisäsimme näytteisiin 10ul 2x näytepuskuria. Valmistimme näytepuskurit 5x aloituspuskurista: c1v1=c2v2 (c1=5x, c2=2x, v2=50ul) v1=c2v2/c1 = 20ul eli 4ul 5x puskuria ja 6ul KOV-vettä joka näytteeseen. Vorteksoimme näyte-epparit, siirsimme 98C-lämpöblokkiin kahdeksi minuutiksi ja sen jälkeen fuugasimme n. 30sec. Siirsimme näytteet ja geelit yön yli pakkaseen.

Seuraavana päivänä annoimme näytteiden sulaa ja fuugasimme noin 30sec. Pipetoimme näytteet pipetointikartan mukaisesta (1. MWM, 2. – 3. Plasma, 4. – 5. a2, 6. b5, 7. c4, 8. d4, 9 – 10. - . Tyhjissä kaivoisssa 5ul 5x SDS-Page-puskuria. MWM on Page Ruler+ Prestainder Protein Ladder Fermentas #SM1811 Lot 0036854. Ajoimme näytteet ensin 100V 5min, 150V n.30min ja 200V 15min. Asetimme erottamisgeelin astiaan SDS-Page Blue värjäysliuoksen kanssa n. 1h. Pestiin geeliä yön yli KOV-vedellä.

## Tulokset

Työn lopputuloksena jaoteltiin plasman proteiinit fraktioinnin kautta niiden varauksien mukaan, Lowryn menetelmällä selvitettiin näytteiden proteiinien pitoisuudet ja korkeimpien pitoisuuksien näytteiden proteiinien koko ja paino selvitettiin. Taulukot ja kuvaajat liitteessä 1.

## Tulosten tarkastelu

Pipetoinnissa tapahtui joitakin virheitä. Lowryn menetelmän laimennossarjan putket 1-2 olivat arvoiltaan niin erilaisia, että voidaan olettaa 2. näytteen kontaminoituneen jostakin toisesta (Taul.2.). Koska kaikki näytteet on suhteutettu näiden näytteiden keskiarvoa kohti, kaikkien näytteiden arvot hieman pienempiä kun olisivat olleet puhtaalla näytteellä. Laimennossarjan putki numero 10 merkittävästi laimeampi kun sen sisarnäyte 9, joko fenoliregeanssi ei sekoittunut hyvin tai pipetointivirhe. Käytimme standardisuoran piirtämiseen vain näytteen 9 arvoa.

Valun perusteella voidaan sanoa fraktioinnin onnistuneen kokonaisuudessaan hyvin, sillä näytteiden proteiinilaatujen välillä on suuria eroja. A-näytteessä on sarjan pienimmät proteiinit , B-näytteessä on pelkästään yhtä proteiinia (selittää eluutiokäyrän pientä b-arvoa, jos proteiinin pitoisuus plasmassa on pieni), C- ja D-näytteissä yksi päälleikkäinen n. 75 Mw proteiini, mutta muuten proteiinit fraktioituneet sarjoihinsa hyvin.

Plasman proteiinit: n.50-95MW välillä valtava määrä proteiineja, näkyy valussa valtavana myttynä. Plasman proteiinipitoisuus on 60% albumiinia (66MW) ja 35% Globuliinia (a1 54Mw, a2 68MW ja b 80MW). Suuri valumytty selittyy sillä, että n. 95% plasman kaikista proteiineista sijaitsevat tällä painovälillä. Seuraava suuri kohta on n. 28MW kohdalla , joka vastaa A-I HDL-lipoproteiinia.

