

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Sašo PLEVČAK

**POSTAVITEV METODE ZA DETEKCIJO  
FOSFORILIRANIH PROTEINOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETECTION OF  
PHOSPHORYLATED PROTEINS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani in na podjetju BIA Separations d.o.o., Teslova 30, Ljubljana.

Študijska komisija dodiplomskega študija živilske tehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Aleša Podgornika, za somentorico doc. dr. Polono Jamnik in za recenzentko doc. dr. Milico Kač.

Mentor: doc. dr. Aleš Podgornik

Somentorica: doc. dr. Polona Jamnik

Recenzentka: doc. dr. Milica Kač

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sašo Plevčak

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Dn  
DK UDK 543.54.08:547.963.2(043) = 163.6  
KG kromatografske tehnike/separacijske tehnike/IMAC/proteomika/proteini /fosforilirani proteini/2-D elektroforeza/monolitni kromatografski nosilci/CIM  
AV PLEVČAK, Sašo  
SA PODGORNIK, Aleš (mentor)/ JAMNIK, Polona (somentorica)/KAČ, Milica (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2010  
IN POSTAVITEV METODE ZA DETEKCIJO FOSFORILIRANIH PROTEINOV  
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
OP XIII, 60 str., 20 pregl., 33 sl., 44 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Fosforilirani proteini nastajajo v procesu post-translacijske modifikacije, imenovane fosforilacija. V celicah se nahajajo v nizkih koncentracijah. Za proučevanje fosfoproteoma je zelo pomembno, da je v očiščenih vzorcih zadostna količina fosforiliranih proteinov. S kromatografsko ločbo se izognemo postopkom obarjanja vzorcev, pri katerih se lahko del fosforiliranih proteinov izgubi. Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (IMAC) je vse bolj uveljavljena tehnika za selektivno ločevanje bioloških molekul. V tem diplomskem delu smo razvili hitro in selektivno metodo obogatitve fosforiliranih proteinov na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu. Najprej smo razvili primeren kromatografski nosilec z imobiliziranim železovim centralnim atomom in ga okarakterizirali. Poiskali smo pogoje vezave in elucije standardnega fosforiliranega proteina. Uspešnost selektivne vezave smo preverili z realnim vzorcem kvasnega ekstrakta *Saccharomyces cerevisiae*. Selektivnost ločbe na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu smo potrdili z 2-D elektroforezo, kjer smo dobljene gele barvali s specifičnimi fluorescentnimi barvili. Izkazalo se je, da je CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilec le delno selektiven, zato potrebuje produkt še optimizacijo, da bi lahko postal tržno zanimiv.

## KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn  
DC UDK 543.54.08:547.963.2(043) = 163.6  
CX chromatographic techniques/separation techniques/IMAC/proteomics/  
proteins/phosphorylated proteins/2-D electrophoresis/monolithic  
chromatographic supports/CIM  
AU PLEVČAK, Sašo  
AA PODGORNIK, Aleš (supervisor)/ JAMNIK, Polona (co-advisor)/KAČ,  
Milica (reviewer)  
PP University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science  
and Technology  
PY 2010  
TI DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETECTION OF  
PHOSPHORYLATED PROTEINS  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XIII, 60 p., 20 tab., 33 fig., 44 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Phosphorylated proteins are produced in post-translation process named  
phosphorylation. They are present in cells in very low concentrations. In  
order to study phosphoproteom it is very important to deal with a sufficient  
amount of phosphorylated proteins in samples. With chromatographic  
separation we can avoid precipitation of proteins that can lead to loss of  
phosphorylated proteins. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography  
(IMAC) is a more and more widely used technique for selective separation of  
biological molecules. In this work, a fast and selective technique for  
concentrating proteins on CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolithic column was developed.  
A chromatographic carrier with immobilized ferric ion in center was  
prepared and characterized. Binding and elution conditions for  
phosphorylated proteins were optimized and column efficiency was tested for  
selective binding with yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae*. Column  
efficiency was confirmed with 2-D electrophoresis. Different specific  
fluorescent dyes were used for protein detection. It was established that  
CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolithic columns are only partially selective for  
phosphorylated proteins, so further optimization is needed for potential  
commercial application.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</b>	<b>III</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 FOSFORILIRANI PROTEINI .....	3
2.2 METODE LOČEVANJA IN DETEKCIJA FOSFORILIRANIH PROTEINOV .....	4
<b>2.2.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija .....</b>	<b>4</b>
2.2.1.1 Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija .....	5
2.2.1.2 Kromatografski nosilci .....	7
2.2.1.3 Karakterizacija nosilca – adsorpcijska izoterma .....	9
2.2.1.4 Karakterizacija nosilca – kapaciteta .....	10
<b>2.2.2 2-D elektroforeza .....</b>	<b>10</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>13</b>
3.1 POTEK DELA .....	13
3.2 MATERIALI .....	14
<b>3.2.1 Kemikalije .....</b>	<b>14</b>
3.2.1.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija .....	14
3.2.1.2 2-D elektroforeza .....	14
<b>3.2.2 Raztopine .....</b>	<b>15</b>
3.2.2.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija .....	15
3.2.2.2 2-D elektroforeza .....	16
<b>3.2.3 Vzorci .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.4 Oprema .....</b>	<b>19</b>
3.2.4.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija .....	19
3.2.4.2 2-D elektroforeza .....	19
3.3 METODE .....	20
<b>3.3.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija .....</b>	<b>20</b>
3.3.1.1 Določanje dinamične kapacitete za kovinske ione .....	20
3.3.1.2 Določanje dinamične kapacitete za standardne proteine .....	21
<b>3.3.2 Priprava celičnega ekstrakta celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>21</b>

<b>3.3.3</b>	<b>2-D elektroforeza .....</b>	<b>21</b>
3.3.3.1	Čiščenje vzorcev z uporabo »2-D Clean Up« kompleta.....	21
3.3.3.2	Prva dimenzija .....	22
3.3.3.3	Druga dimenzija .....	22
3.3.3.4	Barvanje gelov .....	23
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>25</b>
4.1	VISOKOTLAČNA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA.....	25
<b>4.1.1</b>	<b>Eksperimentalno določanje mrtvega volumna sistema.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Karakterizacija CIM<sup>®</sup> IDA Cu<sup>2+</sup> monolitnega nosilca.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Karakterizacija CIM<sup>®</sup> IDA Ni<sup>2+</sup> monolitnega nosilca.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Karakterizacija CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnega nosilca.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Karakterizacija HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> delčnega nosilca .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Iskanje pogojev za vezavo in elucijo fosforiliranih proteinov .....</b>	<b>32</b>
4.1.6.1	Uporaba mobilne faze A <sub>1</sub> in A <sub>2</sub> .....	33
4.1.6.2	Uporaba mobilne faze B <sub>1</sub> in B <sub>2</sub> .....	34
4.1.6.3	Uporaba mobilne faze C <sub>1</sub> in C <sub>2</sub> .....	35
4.1.6.4	Uporaba mobilne faze D <sub>1</sub> in D <sub>2</sub> .....	36
4.1.6.5	Uporaba mobilne faze E <sub>1</sub> in E <sub>2</sub> .....	37
4.1.6.6	Uporaba mobilne faze F <sub>1</sub> in F <sub>2</sub> .....	38
4.1.6.7	Uporaba mobilne faze G <sub>1</sub> in G <sub>2</sub> .....	39
4.1.6.8	Uporaba mobilne faze H <sub>1</sub> in H <sub>2</sub> .....	40
<b>4.1.7</b>	<b>Določanje kapacitete za proteine na kromatografskih nosilcih .....</b>	<b>41</b>
4.1.7.1	Kapaciteta za protein na CIM <sup>®</sup> IDA Fe <sup>3+</sup> monolitnem nosilcu .....	41
4.1.7.2	Kapaciteta za protein na HiTrap IMAC Fe <sup>3+</sup> delčnem nosilcu .....	42
<b>4.1.8</b>	<b>Preverjanje razvite metode s standardnimi proteini.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.9</b>	<b>Uporaba razvite metode na monolitnem nosilcu za realni vzorec <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>44</b>
4.2	2-D ELEKTROFOREZA .....	45
<b>4.2.1</b>	<b>Določanje koncentracije proteinov v zbranih frakcijah .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Čiščenje z »2-D Clean Up« kompletom .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Masa proteinov za nanos na IPG-trakove.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Proteinski profili po barvanju z barvilom Pro-Q Diamond .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Proteinski profili po barvanju z barvilom Sypro Ruby .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Primerjava gelov barvanih z različnimi barvili.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Ovrednotenje fosforiliranih proteinov s programom 2-D Dymension .....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>50</b>
5.1	RAZPRAVA.....	50
<b>5.1.1</b>	<b>Visokotlačna tekočinska kromatografija .....</b>	<b>50</b>
5.1.1.1	Karakterizacija kapacitete na kovinski ion na kromatografskih nosilcih .....	50
5.1.1.2	Razvoj metode na CIM <sup>®</sup> IDA Fe <sup>3+</sup> monolitnem nosilcu .....	51
5.1.1.3	Karakterizacija kapacitete za proteine na kromatografskih nosilcih .....	52
5.1.1.4	Selektivna separacija fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov .....	53
5.1.1.5	Separacija vzorca celičnega ekstrakta kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	53
<b>5.1.2</b>	<b>2-D elektroforeza .....</b>	<b>53</b>
5.1.2.1	Slike po barvanju z barvilom Pro-Q Diamond .....	53

5.1.2.2	Slike po barvanju z barvilom Sypro Ruby.....	54
5.1.2.3	Primerjava gelov barvanih z različnimi barvili .....	54
5.2	SKLEPI.....	55
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>57</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Priprava raztopine za rehidracijo IPG-trakov	16
Preglednica 2: Priprava ločilnega gela z debelino 1mm z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida	17
Preglednica 3: Priprava osnovne raztopine za uravnoveženje	17
Preglednica 4: Priprava SDS elektroforeznega pufra	18
Preglednica 5: Priprava fiksacijske raztopine	18
Preglednica 6: Priprava raztopine za razbarvanje I	18
Preglednica 7: Priprava raztopine za razbarvanje II	18
Preglednica 8: Pogoji izoelektričnega fokusiranja	22
Preglednica 9: Barvanje z barvilom Pro-Q Diamond	23
Preglednica 10: Barvanje z barvilom Sypro Ruby	24
Preglednica 11: Podatki za adsorpcijsko izotermo bakrovih ionov na CIM <sup>®</sup> IDA monolitnem nosilcu	27
Preglednica 12: Podatki za adsorpcijsko izotermo nikljevih ionov na CIM <sup>®</sup> IDA monolitnem nosilcu	28
Preglednica 13: Podatki za adsorpcijsko izotermo železovih ionov na CIM <sup>®</sup> IDA monolitnem nosilcu	29
Preglednica 14: Podatki za adsorpcijsko izotermo železovih ionov na CIM <sup>®</sup> IDA monolitnem nosilcu	30
Preglednica 15: Podatki za adsorpcijsko izotermo železovih ionov na HiTrap IMAC nosilcu	32
Preglednica 16: Kapaciteta za protein na CIM <sup>®</sup> IDA Fe <sup>3+</sup> nosilcu	41
Preglednica 17: Kapaciteta za protein pri različnih pretokih na CIM <sup>®</sup> IDA Fe <sup>3+</sup> nosilcu	42
Preglednica 18: Kapaciteta za protein na HiTrap IMAC Fe <sup>3+</sup> nosilcu	42
Preglednica 19: Pregled zbranih frakcij kvasnega ekstrakta <i>Saccharomyces cerevisiae</i> za 2-D elektroforezo	44
Preglednica 20: Masa proteinov kvasnega ekstrakta <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v posamezni frakciji	46



## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Hodogram poteka dela	13
Slika 2: Prebojna krivulja brez monolitnega nosilca – eksperimentalno določanje mrtvega volumna sistema	25
Slika 3: Adsorpcijska izoterma za bakrove ione na CIM <sup>®</sup> IDA monolitnem nosilcu pri različnih koncentracijah bakrovih ionov v vodni raztopini	28
Slika 4: Adsorpcijska izoterma za nikeljeve ione na CIM <sup>®</sup> IDA monolitnem nosilcu pri različnih koncentracijah nikeljevih ionov v vodni raztopini	29
Slika 5: Adsorpcijska izoterma za železove ione na CIM <sup>®</sup> IDA monolitnem nosilcu pri različnih koncentracijah železovih ionov v vodni raztopini	30
Slika 6: Adsorpcijske izoterme za železove ione različnih koncentracij na CIM <sup>®</sup> IDA monolitnem nosilcu pri različnih pretokih	31
Slika 7: Prebojna krivulja železovih ionov na HiTrap IMAC nosilcu	31
Slika 8: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne A <sub>1</sub> (20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, pH 7,4) in elucijske mobilne faze A <sub>2</sub> (20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4); b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi A <sub>1</sub> (20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, pH 7,4)	33
Slika 9: Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi A <sub>1</sub> (20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, pH 7,4)	33
Slika 10: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne B <sub>1</sub> (20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4) in elucijske mobilne faze B <sub>2</sub> (20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4); b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi B <sub>1</sub> (20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4)	34
Slika 11: a) Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi B <sub>1</sub> (20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4); b) Povečana slika 11a	34
Slika 12: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne C <sub>1</sub> (20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, pH 7,1) in elucijske mobilne faze C <sub>2</sub> (20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,1); b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi C <sub>1</sub> (20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,1)	35

- Slika 13: Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi C<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,1) 35
- Slika 14: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne D<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,1) in elucijske mobilne faze D<sub>2</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,1); b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi D<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,1) 36
- Slika 15: Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi D<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,1) 36
- Slika 16: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne E<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) in elucijske mobilne faze E<sub>2</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 100 mM imidazol, pH 7,4); b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi E<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) 37
- Slika 17: Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi E<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) 37
- Slika 18: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne F<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) in elucijske mobilne faze F<sub>2</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4); b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi F<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4). 38
- Slika 19: a) Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi F<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4); b) Povečana slika 19a 38
- Slika 20: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne G<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) in elucijske mobilne faze G<sub>2</sub> (100 mM glicin, pH 3,0); b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi G<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) 39
- Slika 21: a) Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi G<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4); b) Povečana slika 21a 39

Slika 22:	a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne H <sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) in elucijske mobilne faze H <sub>2</sub> (20 mM NaHCO <sub>3</sub> , 0,5 M NaCl, pH 9,6); b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi H <sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4)	40
Slika 23:	a) Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi H <sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4); b) Povečana slika 23a	40
Slika 24:	Prebojna krivulja standardnega fosforiliranega proteina na CIM <sup>®</sup> IDA Fe <sup>3+</sup> nosilcu	41
Slika 25:	Prebojna krivulja standardnega fosforiliranega proteina na HiTrap IMAC Fe <sup>3+</sup> nosilcu	42
Slika 26:	a) Kromatogram nefosforiliranega proteina BSA (c = 1 mg/mL) raztopljenega v vezni mobilni fazi H <sub>1</sub> 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4; b) Kromatogram vezave standardnega fosforiliranega proteina fosfitina (c = 1 mg/mL) raztopljenega v vezni mobilni fazi H <sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4)	43
Slika 27:	Kromatogram selektivna ločbe fosforiliranega (fosfitin, c = 0,5 mg/mL) od nefosforiliranega (BSA, c = 0,5 mg/mL) proteina na CIM <sup>®</sup> IDA Fe <sup>3+</sup> monolitnem nosilcu	43
Slika 28:	Kromatogram selektivnega ločevanja fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov v realnem vzorcu kvasnega ekstrakta <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na CIM <sup>®</sup> IDA Fe <sup>3+</sup> monolitnem nosilcu	44
Slika 29:	Povečava slike 28	45
Slika 30:	a) Proteinski profil kvasnega ekstrakta <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pred ločbo na nosilcu (frakcija 1) barvan z barvilom Pro-Q Diamond; b) Proteinski profil nefosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 2) barvan z barvilom Pro-Q Diamond; c) Proteinski profil fosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 3) barvan z barvilom Pro-Q Diamond	46
Slika 31:	a) Proteinski profil kvasnega ekstrakta <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pred ločbo na nosilcu (frakcija 1) barvan z barvilom Sypro Ruby; b) Proteinski profil nefosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 2) barvan z barvilom Sypro Ruby; c) Proteinski profil fosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 3) barvan z barvilom Sypro Ruby	47

- Slika 32: a) Proteinski profil kvasnega ekstrakta *Saccharomyces cerevisiae* pred ločbo na nosilcu (frakcija 1) barvan z barvilom Pro-Q Diamond; b) Proteinski profil fosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 3) barvan z barvilom Pro-Q Diamond; c) Proteinski profil začetnega vzorca pred ločbo na nosilcu (frakcija 1) barvan z barvilom Sypro Ruby; d) Proteinski profil fosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 3) barvan z barvilom Sypro Ruby 48
- Slika 33: Primerjava gela fosforiliranih proteinov (frakcija 3) barvanega s Pro-Q Diamond in Sypro Ruby 49

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-D elektroforeza	dvo-dimenzionalna elektroforeza
APS	amonijev persulfat (angl. ammonium persulfate)
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumine)
CHAPS	(angl. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
CIM <sup>®</sup>	Convective Interaction Media <sup>®</sup>
DTT	ditiotritol (angl. dithiothreitol)
Fe(III)	železovi ioni (spojine), v katerih je oksidacijsko število <sup>3+</sup>
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija (angl. high pressure/performance liquid chromatography)
IDA	iminodiocetna kislina (angl. iminodiacetic acid)
IEF	izoelektrično fokusiranje (angl. isoelectric focusing)
IMAC	kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (angl. immobilized metal-chelate affinity chromatography)
IPG	trak z imobiliziranim pH gradientom
JAA	jodoacetamid
mM	10 <sup>-3</sup> mol/L
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. sodium dodecyl sulfate)
SDS PAGE	natrijev dodecil sulfat poliakrilamidna gelska elektroforeza (angl. sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis)
TEMED	tetrametiletilendiamin
v/v	mL/100 mL
w/v	g/100 mL

## 1 UVOD

Proteomika je veja znanosti, ki proučuje izražanje različnih proteinov, njihove post-translacijske modifikacije in interakcije proteinov v proteomu (Ahmed in Rice, 2005). Medtem ko je sestava genoma v celici stalna in skoraj identična za vse celice določenega organa ali organizma, je proteom izredno kompleksen in dinamičen. Njegova sestava se neprestano spreminja, saj se odziva na razne zunanje vplive (Neverova in Van Eyk, 2005).

Proteini so podvrženi številnim post-translacijskim modifikacijam in se dogajajo neodvisno od genoma (Riggs in sod., 2005). Fosforilirani proteini nastanejo v procesu post-translacijske modifikacije, imenovane fosforilacija. Proces sodi med reverzibilne modifikacije in je pomemben za regulacijo aktivnosti proteinov kot odgovor na signale znotraj in zunaj celic, zato je razumevanje celičnega delovanja nepopolno brez preučitve fosfoproteoma.

Količina fosforiliranih proteinov v celici je majhna. Običajni postopki čiščenja fosforiliranih proteinov vključujejo obarjanje, pri čemer se del proteinov izgubi. Za ločevanje proteinov sta najpogosteje uporabljeni tehniki tekočinska kromatografija in detekcija proteinov z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo (2-DE) (Neverova in Van Eyk, 2005).

Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (angl.: Immobilized-Metal Affinity Chromatography - IMAC) je ločevalna tehnika, ki se uporablja pri analitskem in preparativnem čiščenju proteinov. V primerjavi z ostalimi afinitetnimi separacijskimi tehnikami je zmerno specifična tehnika. Vedno bolj se uveljavlja zaradi naslednjih prednosti: stabilnost ligandov, možnost nanašanja raztopin z veliko koncentracijo proteinov, mili elucijski pogoji, preprosta regeneracija, možnost dela pri denaturacijskih pogojih in nizki operativni stroški. Zaradi tega ima široko področje uporabe.

Z IMAC tehniko selektivno koncentriramo fosforilirane proteine v celicah, ki imajo v strukturi fosforilirane aminokislino kot so serin, treonin in tirozin (Trojer in sod., 2005). Fosforilirani proteini kažejo afiniteto do kovinskih ionov kot so npr.: železovi (III) in galijevi ioni. Do železovih ionov imajo večjo afiniteto enkrat fosforilirani proteini, do galijevih ionov pa večkrat fosforilirani proteini. Prav tako selektivno čistimo z genskim inženiringom pridobljene rekombinantne proteine, ki imajo dodane histidinske podaljške (Trojer in sod., 2005) ter proteine, ki tvorijo komplekse s kalcijevimi ioni (Blowers in Park., 2000). V splošnem z IMAC tehniko čistimo proteine, pri katerih se elektroni donorskih skupin na površini proteinov povežejo z elektron-akceptorskimi kovinskimi ioni na kromatografskem nosilcu.

CIM<sup>®</sup> (angl.: Convective Interaction Media<sup>®</sup>) metakrilatni monolitni kromatografski nosilci so stacionarne faze, ki zaradi strukture omogočajo prečrpavanje tekočine pri velikih pretokih in majhnem zmanjšanju tlaka. Ti monolitni nosilci so kemijsko in mehansko obstojni, omogočajo delo v širokem območju pH vrednosti in ionske jakosti. CIM<sup>®</sup> nosilci so zaradi velikih pretočnih kanalov, ki imajo za posledico konvektivni transport molekul, idealne stacionarne faze za ločevanja večjih molekul, kot so proteini in DNA, ter tudi večjih delcev kot so virusi. V uporabi so CIM<sup>®</sup> nosilci v obliki diskov in cevnih modulov,

različnih velikosti in volumnov, od 0,34 mL diska do 8000 mL cevnega modula za uporabo v industrijskih procesih.

## 1.1 NAMEN DELA

Fosforilirani proteini se v celicah nahajajo v nizkih koncentracijah. Namen dela je postaviti hitro in učinkovito metodo za selektivno čiščenje oz. koncentracijo fosforiliranih proteinov. Delo bo obsegalo karakterizacijo metakrilatnih monolitnih nosilcev za čiščenje fosforiliranih proteinov in primerjavo karakteristik z delčnimi nosilci. Določili bomo jakost vezave različnih kovinskih ionov na monolitnem in delčnem nosilcu. Poiskali bomo pogoje vezave in elucije fosforiliranih proteinov na monolitnem nosilcu, naredili primerjavo vezave standardnih fosforiliranih in nefosforiliranih proteinov na monolitnem nosilcu in kapacitete fosforiliranih proteinov na monolitnem in delčnem nosilcu. Vpliv pretoka na kapaciteto nosilcev ter selektivnost na realnem vzorcu bomo izvedli na monolitnem nosilcu. Učinkovitost koncentriranja fosforiliranih proteinov bomo potrdili z 2-D elektroforezno tehniko, kjer bomo gele barvali z različnimi selektivnimi barvili in ovrednotili proteinske profile.

Zaradi razširjenosti metode IMAC in uporabnosti monolitnih nosilcev za ločevanje proteinov bi bil monolitni nosilec CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> tržno zanimiv proizvod.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 FOSFORILIRANI PROTEINI

Fosforilirani proteini nastajajo v celici kot posledica reverzibilne post-translacijske modifikacije imenovane fosforilacija. Fosforilacija je vezava fosfatne skupine ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) na protein in poteka na točno določenih aminokislinah v verigi peptida oz. proteina (Krabbe in sod., 2006). Te aminokislino so serin, treonin in tirozin v evkariontskih celicah, medtem ko se v prokariontskih celicah fosfatna skupina aminokislino veže na histidin, glutaminsko in asparaginsko kislino. V evkariontskih in prokariontskih celicah so zasledili, da so vezna mesta fosfatne skupine tudi aminokislino lizin, arginin in cistein (Yan in sod., 1998).

Proces fosforilacije je pomemben pri signalni transdukciji, pri rasti in razvoju celice ter pri regulaciji aktivnosti proteinov kot odgovor na signale znotraj in zunaj celic (Krabbe in sod., 2006). Prav tako je pomemben pri citoskeletni regulaciji in apoptozi (McLachlin in Chait, 2001).

Fosfatna skupina se prenese na protein iz molekule ATP ali GTP. Veže se na hidroksilno skupino aminokislino. Splošna reakcijska shema za prenos fosfatne skupine je:  $\text{protein} + \text{ATP} \rightarrow \text{fosforiliran protein} + \text{ADP}$ .

Fosforilacija kot tudi defosforilacija sta pomembni post-translacijski reakciji, ker je od tega odvisna tudi aktivnost mnogih encimov in receptorjev. Fosforilacija spremeni funkcijo proteinov s spremembo encimske aktivnosti ali afiniteto do drugih proteinov (Hanash, 2003).

Fosforilirani proteini služijo kot biomarkerji za različne oblike in stopnje napredovanja bolezni kot so rak in Alzheimerjeva bolezen (Krabbe in sod., 2006). Vsebnost fosforiliranih proteinov je v teh primerih precej večja kot vsebnost nefosforiliranih proteinov. Ocenjeno je, da je ena tretjina vseh evkariontskih proteinov fosforiliranih, vendar je njihova koncentracija v zdravih celicah med 1-2 % (Azarkan in sod., 2007). Delež fosforiliranih proteinov v malignih – tumorskih celicah pa se močno poveča (Patwardhan in Miller, 2007).

Stopnja fosforilacije oz. defosforilacije je regulirana s spremembami v aktivnosti protein kinaz in protein fosfataz. Ocenjeno je, da je v človeškem genomu kodiranih 600 protein kinaz in 200 protein fosfataz (Klumpp in Krieglstein, 2002). Kovalentne post-translacijske modifikacije proteinov kot sta fosforilacija in defosforilacija, sta nadzorovani z encimsko aktivnostjo na celični membrani, v ribosomih, v mitohondrijih in v jedru (Holmes in Schiller, 1997).

Kinaze so razdeljene v dve večji skupini glede na to, s katerimi aminokislinami reagirajo. Prvi razred so serin-treonin kinaze, drugi razred so tirozin kinaze. Vse tri aminokislino vsebujejo v strukturi hidroksilno skupino ( $-\text{OH}$ ), na katero se vežejo fosfatne skupine. Med procesom fosforilacije se ne fosforilira samo ena aminokislina v verigi peptida oz. proteina, ampak se lahko fosforilira več aminokislin. Tako nastanejo enkrat, dvakrat ali



večkrat fosforilirani proteini. Z večkratno fosforilacijo proteina se spremeni struktura proteina, kar vpliva na njegovo aktivnost (Brusic in sod., 2007). Druga skupina encimov so fosfataze. Fosfataze so prav tako razdeljene v dve skupini. Prva so serin-treonin fosfataze, druga pa tirozin fosfataze. Obstajajo pa tudi specifične fosfataze, ki imajo zmožnost defosforilacije vseh treh aminokislin (Holmes in Schiller, 1997).

## 2.2 METODE LOČEVANJA IN DETEKCIJA FOSFORILIRANIH PROTEINOV

### 2.2.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija

Najpogostejše separacijske tehnike, ki jih uporabljamo za identifikacijo in karakterizacijo molekul, so kromatografske in elektroforezne metode. Temeljijo na ločevanju komponent v vzorcu, ki poteka na osnovi različnih fizikalno-kemijskih lastnosti sestavin. Pri kromatografiji so te molekulska masa, oblika, hidrofobnost ter specifična afiniteta do drugih substanc. Danes so kromatografske metode najbolj uporabljane separacijske metode, ki omogočajo analizo, izolacijo in čiščenje vzorcev. Najpomembnejša značilnost kromatografskih metod je porazdeljevanje komponent vzorca med dvema fazama, stacionarno in mobilno. Tok mobilne faze nosi molekule mimo stacionarne faze, pri čemer se začnejo sestavine ločevati zaradi različnih fizikalnih interakcij s stacionarno oz. mobilno fazo. Glede na položaj stacionarne faze in način potovanja mobilne faze razdelimo kromatografske metode na dve osnovni skupini, kolonsko in planarno kromatografijo. Pri kolonski kromatografiji je stacionarna faza v kolonah, pri planarni kromatografiji pa je stacionarna faza nanosena na plošče ali v pore na papirju. Glede na vrsto mobilne faze razdelimo kolonske kromatografske metode v tri osnovne skupine: tekočinsko in plinsko kromatografijo ter kromatografijo pod superkritičnimi pogoji. Tekočinska kromatografija, predvsem visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC), je najpogostejše in najširše uporabljena kromatografska metoda. Glede na mehanizem ločevanja komponent v vzorcu jo razdelimo na porazdelitveno, adsorpcijsko, ionsko izmenjevalno, izključitveno, kiralno in afinitetno kromatografijo (Kočevar in sod., 2007).

Večina biokemijskih procesov v organizmih temelji na specifičnih interakcijah med biološkimi molekulami. Te interakcije so navadno reverzibilne, saj potekajo preko nekovalentnih povezav. Pri afinitetni kromatografiji so vzpostavljene podobne razmere.

Afinitetna kromatografija je vrsta adsorpcijske kromatografije, ki temelji na zmožnosti bioloških makromolekul, da specifično in reverzibilno vežejo komplementarne molekule. Med njimi obstaja t.i. biološka afiniteta. Molekula, imobilizirana na nosilec, predstavlja stacionarno fazo kromatografske kolone. Imobilizirana molekula se imenuje ligand (Turková, 1984). Ko vzorec, ki vsebuje molekulo z biološko afiniteto do liganda, prehaja preko nosilca, pride pri določenih pogojih do adsorpcije te molekule na ligand. Vezi, s katerimi sta ligand in molekula vezana v kompleks, so lahko elektrostatske, hidrofobne in/ali vodikove. Prekinejo se lahko s spremembo pH, ionske moči, dielektrične konstante, temperature, z ultrazvokom ali pa z uporabo denaturantov (gvanidinijev klorid). Včasih se uporablja t.i. afinitetna elucija, kjer eluent oz. nevezna mobilna faza vsebuje visoko koncentracijo prostega liganda, ki tekmuje z imobiliziranim ligandom za vezavo z molekulami vzorca (Jones, 2000).

Obstajata dve vrsti ligandov: naravno prisotni in sintetični afinitetni ligandi. Naravni ligandi so v glavnem proteinskega značaja in so zato podvrženi denaturaciji. Sintetični so stabilni in imajo običajno večje kapacitete do proteinov. Interakcije med sintetičnimi ligandi in molekulami so specifične (Jones, 2000). V afinitetno kromatografijo uvrščamo stacionarne faze z naravnim imobiliziranim ligandom, v psevdoafinitetno kromatografijo pa stacionarne faze s sintetičnim ligandom.

Uspešnost afinitetnega čiščenja je odvisna od jakosti in kapacitete vezave liganda in ciljne molekule, prav tako pa od uspešnosti imobilizacije liganda na nosilec in hidrodinamskih lastnosti nosilca (Podgornik, 1998).

Široka uporaba afinitetne kromatografije pri različnih aplikacijah je pripeljala do razvoja novih specifičnih afinitetnih kromatografskih tehnik, med katerimi so posamezne tehnike dobile svoja poimenovanja. Tako danes poznamo afinitetne kromatografske tehnike kot so imunoafinitetna, hidrofobna, lektin-afinitetna, kovinsko-kelatna, kovalentno-afinitetna, receptorsko-afinitetna kromatografska tehnika itd. (Bailon in sod., 2000).

#### 2.2.1.1 Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija

Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (angl.: Immobilized-Metal Affinity Chromatography-IMAC) je separacijska tehnika, ki izkorišča različno afiniteto proteinov do imobiliziranega kovinskega iona na kromatografskem nosilcu. Različna afiniteta proteinov do kovinskega iona izvira iz tvorbe koordinativnih vezi med kovinskim ionom in določeno stransko verigo aminokislin na površini proteina (Chaga, 2001). Tehnika je danes široko uporabna, poznana pa že vrsto let. Leta 1975 jo je razvil Jerker Porath s sodelavci (1975), danes pa se vedno bolj uveljavlja za čiščenje proteinov (Scopes, 1994).

Reverzibilna elektrostatska interakcija med izpostavljenimi aminokislinami z elektron-donorskimi lastnostmi (serin, treonin, tirozin, histidin) in elektron-akceptorskim kovinskim ionom ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) omogoča hitro in selektivno izolacijo proteinov (Arnold, 1991).

Fosforilirani proteini so izpostavljeni elektrostatski interakciji med imobiliziranimi kovinskimi ioni na matriksu kromatografskega nosilca in elektronskimi donorji na površini proteina. Na ta način se tvorijo koordinativne vezi med kovino in fosforiliranimi proteini (Holmes in sod., 1997). Fosforilirane proteine, ki jih čistimo z  $\text{Fe}^{3+}$  IMAC-om eluiramo najpogosteje s pH gradientom (Andersson in Porath, 1986) ali s solnim gradientom (Holmes in sod., 1997).

Učinkovitost IMAC sistema pri izolaciji fosforiliranih proteinov je odvisna od številnih faktorjev: ustrezna izbira kovinskega iona, izbira stacionarne faze ter pH vrednost nalagalne in elucijske mobilne faze (Trojer in sod., 2005).

Pri IMAC-u so centralni atomi kovinski ioni iz skupine prehodnih elementov v periodnem sistemu, ki so razdeljeni v tri skupine. V prvo skupino spadajo  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , ti kažejo afiniteto do spojin, ki vsebujejo v strukturi atome kisika. V drugi skupini so  $\text{Cu}^{+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ , ti kažejo afiniteto do spojin, ki vsebujejo atome žvepla. V tretji skupini

kovinskih ionov so  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ . Ti pa kažejo afiniteto do spojin, ki vsebujejo atome dušika, kisika in žvepla (Chaga, 2001).

Selektivnost kovinskih ionov je zelo različna. Pri pH vrednosti, kjer je adsorpcija optimalna (kisel ali nevtralen pH), kovinski ioni iz prve in tretje skupine reagirajo z drugimi stranskimi verigami na površini proteina. Le-to pa omogoča učinkovito selektivno ločevanje proteinov iz kompleksnih mešanici (Chaga, 2001).

Kovinski ion je najpomembnejši del adsorpcijskega centra. Vezan je na izpostavljenih mestih kromatografskega matriksa, kjer se tvorijo kompleksi s preiskovano molekulo (Porath, 1992). Na nosilec je vezan preko kelirajoče spojine (IDA-iminodiocetna kislina), do katere ima večjo afiniteto kot do proteinov, ki jih čistimo. Za vezavo proteinov mora imeti kovinski ion eno ali več prostih koordinativnih vezi (Gaberc-Porekar in Menart, 2001).

V prvih raziskavah je Porath s sodelavci (1975) ugotovil, da imajo bakrovi ioni veliko kapaciteto za proteine, kar je kasneje potrdil tudi Chaga s sodelavci (1993). Veliko afiniteto do fosforiliranih proteinov kažejo predvsem kovinski ioni iz prve skupine kot so  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  in  $\text{Al}^{3+}$  (Porath, 1992). Ti ioni kažejo veliko tendenco za vezavo z  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_2^-$  ali  $\text{F}^-$  skupinami, t.i. elektronsko bogatimi bazami, ki zlahka donirajo elektrone iz p orbital v prazne d orbitale kovinskega iona, pri čemer se tvori kompleks kovina-ligand (Andersson, 1996). Za fosforilirane proteine je značilno, da imajo železovi ioni večjo afiniteto do enkrat fosforiliranih proteinov, medtem ko imajo galijevi ioni večjo afiniteto do večkrat fosforiliranih proteinov (Posewitz in Tempst, 1999).

Ligand je lahko atom, ion ali molekula, ki se veže na centralni atom. Ta donira proste elektrone centralnemu atomu. Nastane koordinativna vez, kjer en atom prispeva oba elektrona v kovalentno vez. Koordinativna vez se uvršča med delno kovalentne in delno ionske vezi (Atkins in sod, 1995).

Donorji elektronov (N, S, O) v kelatnih skupinah, so kovalentno pritrjeni na kromatografski nosilec in koordinativno vežejo kovinske ione. Najbolj uveljavljeni kovinski kelatorji vsebujejo tri (tridentati), štiri (tetradentati) ali pet (pentadentati) elektron-donorskih skupin, ki se povežejo s tremi, štirimi oziroma petimi koordinacijskimi mesti kovinskih ionov. Preostale koordinativne vezi kovinskih ionov so zasedene z molekulami vode in se lahko izmenjajo s proteinskim donorjem elektronov. Najpogosteje uporabljen kelator je IDA, ki je tridentat (Anspach, 1994).

Kelatne skupine učinkujejo tudi kot ionski izmenjevalci in pri nizki ionski jakosti še vedno ohranijo to funkcijo. Da preprečimo nespecifične ionske interakcije in povečamo adsorpcijo tarčnega proteina v kompleks s kovinskim ionom, dodamo v mobilne faze večje količine soli ( $\geq 0,5 \text{ M NaCl}$ ) (Porath, 1992).

Tetradentati imajo večjo afiniteto za kovinske ione kot tridentati, a zaradi manjšega števila prostih koordinativnih mest vežejo manj proteinov. Predstavnik tetradentatov je NTA (nitrilo triocetna kislina). Ta lastnost se pri pentadentatih še stopnjuje, npr. pri  $\text{N}_2\text{N}'\text{-Tris}$  (karboksimetil) etilendiamin (TED) (Gaberc-Porekar in Menart, 2001).

Na kelatorske skupine (IDA, NTA, TED) niso vezani vsi kovinski ioni enako močno. Nekateri so šibkeje, drugi močnejše adsorbirani. Za uspešno ločevanje tarčnih molekul, moramo šibko vezane kovinske ioni odstraniti s kromatografskega nosilca. Največkrat kot mobilno fazo za izpiranje šibko vezanih kovinskih ionov na nosilcih uporabljamo 0,001-0,01 M raztopino imidazola, 0,1-1 M raztopino glicina ali 0,01 M raztopino HCl (Porath, 1992).

Nekateri kovinski ioni morajo biti pripravljene v kislih raztopinah, kjer je pH vrednost med 3 in 5. Kovinski ion  $\text{Fe}^{3+}$  je eden izmed teh. Sol, ki vsebuje kovinski ion ( $\text{FeCl}_3$  – železov triklorid), raztopimo v 0,01 M raztopini HCl. Prav tako je potrebno pred črpanjem raztopine železovih ionov preko kromatografskega nosilca nosilec ustrezno pripraviti. Kondicioniramo ga s prečrpavanjem 0,01 M raztopine HCl. Nalaganje nosilca z železovimi ioni v kislem je nujno, da se izognemo nastajanju železovih hidroksidov v raztopini (Porath, 1992).

IMAC tehnika lahko poteka v skoraj celotnem biološkem pH območju ( $4 < \text{pH} < 10$ ). IMAC tehnika je uporabna tudi v prisotnosti ali odsotnosti kaotropnih soli. To so denaturajoči reagenti, npr.: guanidin klorid in urea, ki porušijo tridimenzionalno strukturo makromolekul proteinov in DNA. IMAC kromatografske nosilce lahko uporabljamo tudi kot ionske izmenjevalce (Chaga, 2001).

Zaradi zelo različnih pogojev pri IMAC tehniki, se le ta uporablja za izolacijo proteinov iz organizmov, ki živijo v ekstremnih pogojih. Nosilci, z imobiliziranimi železovimi ioni, so bili uporabljeni pri visoki koncentraciji soli (1,5-3 M NaCl) za čiščenje proteinov iz halofilnih mikroorganizmov (Chaga in sod., 1993).

Glede na vrsto vzorca imamo pri uporabi IMAC tehnike štiri možnosti. Prva je, da se protein ne veže koordinativno na kovinski ion in potuje po kromatografskem nosilcu brez zadrževanja (negativna adsorpcija) (Porath, 1992). Druga možnost je ta, da se protein veže s kovinskim ionom, le tega odstrani iz kromatografskega matriksa in skupaj potujeta po kromatografskem matriksu brez nadaljnjega zadrževanja (spiranje kovinskega iona) (Porath, 1992). Tretja možnost in zelen rezultat je, da se protein koordinativno veže na imobiliziran kovinski ion in se odstrani z elucijsko mobilno fazo z nosilca (Porath, 1992). Četrta možnost pa je pojav nespecifičnih interakcij proteina s kromatografskim nosilcem (nespecifične vezave), kar pomeni, da ima protein afiniteto do nosilca, ne pa do kovinskega iona (Chaga, 2001).

#### 2.2.1.2 Kromatografski nosilci

Izbira nosilca (stacionarne faze) lahko ključno vpliva na delovanje imobiliziranega liganda. Idealni nosilec ima sledeče lastnosti:

- netopnost v mediju, v katerem izvajamo imobilizacijo in ločevanje molekul,
- primerna prepustnost in velika specifična površina,
- mehanska odpornost in kemijska stabilnost,
- vsebnost reaktivnih skupin (epoksi skupine, hidroksilne skupine),
- velika kapaciteta za vezavo liganda in majhna nespecifična adsorpcija,
- tržna dostopnost.

Univerzalnega nosilca, ki bi ustrezal vsem tem naštetim kriterijem, ni. Za posamezen ligand in vrsto uporabe izberemo najprimernejši nosilec (Turková, 1984).

Glede na izvor delimo nosilce na naravne in sintetične. Med naravne nosilce uvrščamo naravne polisaharide (agaroz, celuloza), silikate in aluminijev oksid. Z izdelavo sintetičnih nosilcev so želeli izboljšati lastnosti naravnih nosilcev. Med sintetične nosilce spadajo akrilamidni polimerni nosilci, metakrilatni nosilci ter nosilci iz polistirena in njegovih derivatov (Podgornik, 1998).

Agaroz je linearni polisaharid. Tvori močno zamreženo tridimenzionalno strukturo, ki jo v vozliščih povezujejo močne vodikove vezi. Struktura vsebuje relativno velike pore, skozi katere lahko potujejo makromolekule. Velikost por lahko poljubno spreminjamo, saj je obratno sorazmerna s koncentracijo agaroze. Agaroz tvori t.i. mehke gele, ki se pod vplivom tlaka hitro deformirajo. Kemijske modifikacije potekajo na –OH skupinah (Podgornik, 1998).

CIM<sup>®</sup> (Convective Interaction Media) monolitni nosilec, na katerega je imobilizirana določena molekula (protein, kovinski ion, IDA), je pripravljen z radikalsko kopolimerizacijo reaktivnega monomera (GMA – glicidil metakrilata) in zamreževalca – divinilnega monomera (EDMA – etilen dimetakrilata) v prisotnosti porogena (višji alkoholi) in iniciatorja polimerizacije (Barut in sod., 2003).

Tipična sestava monomerov in porogenov je:

- 24 % glicidilmetakrilata (GMA),
- 16 % etilendimetakrilata (EDMA),
- 12 % dodekanola,
- 48 % cikloheksanola,
- 1 % azobisizobutironitrila.

Med polimerizacijo prihaja do reakcij med dvojnimi vezmi monomerov, rezultat je makroporozen polimer, z reaktivnimi epoksi skupinami, ki jih lahko naknadno modificiramo (Podgornik, 1998). Hitrost ločevanja je odvisna od strukture kromatografskega nosilca. Razlikujemo sledeče nosilce: porozni delci, neporozni delci, pretočni – gigaporozni delci, lovkaсти (tentacle) nosilci, membrane, monoliti (Podgornik, 1998).

Porozni delci so nosilci, ki se v kromatografiji uporabljajo najdlje. Predvsem zaradi dobre ločljivosti in velike kapacitete vezave so v splošnem še danes prevladujoči nosilci. Te lastnosti pa se lahko relativno hitro slabšajo s povečanjem linearne hitrosti oz. z večanjem pretoka skozi sloj delcev, saj večina aktivne površine, na kateri poteka ločevanje, leži znotraj zaprtih por. Tekočina v teh porah skoraj miruje, kar pomeni, da potujejo molekule v pore predvsem na podlagi difuzijskega transporta. Molekule potrebujejo dovolj časa, da lahko pripotujejo do aktivnega mesta (Podgornik, 1998).

Monolitni nosilci so ena zadnjih generacij v razvoju kromatografskih nosilcev. Predstavljajo vmesno stopnjo med nosilci v obliki delcev in membranami. Polimerni

monolitni nosilec je porozen monolit v enem kosu, zgrajen iz medsebojno polimeriziranih mikrometrskih kroglic (Štrancar in sod., 2002). Med mikronskimi zrni so večji in manjši kanali. T.i. bimodalna razporeditev omogoča majhne povratne tlake zaradi pretoka skozi makrokanale premera 1-3  $\mu\text{m}$  ter veliko specifično površino pretočnih mezokanalov premera 100 nm, v katerih poteka adsorpcija oz. desorpcija. Prenos molekul poteka praktično v celoti na osnovi konvekcije (Podgornik, 1998).

Poznamo več vrst monolitnih nosilcev; silikatne, poliakrilamidne, nosilce na osnovi celuloze, stiren-divinilbenzenske in poli(glicidimetakrilat-ko-etilendimetakrilat)-ne nosilce (Štrancar in sod., 2002). Slednji predstavljajo osnovo monolitnih enot s tržnim imenom CIM<sup>®</sup>. Od leta 1998 jih proizvaja podjetje BIA Separations d.o.o. (Ljubljana, Slovenija).

Najpomembnejše prednosti CIM<sup>®</sup> nosilcev v primerjavi s poroznimi delci so:

- od pretoka neodvisna ločljivost in dinamična kapaciteta,
- če se v monolitu ujamejo zračni mehurčki, jih izperemo iz monolita z mobilno fazo,
- ciljne molekule lahko izperemo v zelo koncentrirani obliki tako, da s stisnjenim zrakom potisnemo majhen volumen elucijskega pufra preko monolita,
- zmanjšana inaktivacija biomolekul zaradi kratkega kontaktnega časa s kromatografskim nosilcem,
- velika dinamična kapaciteta za zelo velike molekule (Štrancar, 2003).

Premer CIM<sup>®</sup> diska je 12 mm, njegova višina pa le 3 mm. Ta t.i. »kratki sloj« omogoča optimalno ločevanje velikih biomolekul, poveča hitrost ločevanja, zmanjša povratni tlak, preprečuje nespecifične vezave in spremembe v strukturi biomolekule, ločljivost za velike biomolekule pa ostane v pogojih gradientnega ločevanja praktično nespremenjena (Štrancar s sod., 2002).

### 2.2.1.3 Karakterizacija nosilca – adsorpcijska izoterma

Adsorpcija je proces, pri katerem se plin ali tekočina v obliki tankega filma molekul ali atomov (adsorbati) akumulira na površini trdnega ali tekočega adsorbenta. Med tekočino in trdnim nosilcem nenehno poteka izmenjava molekul (adsorpcija-desorpcija). Delež adsorpcije je delež spremembe pokritosti površine nosilca in se določi z merjenjem spremembe zasedenih in prostih adsorpcijskih mest v določenem času na nosilcu. Langmuirjeva izoterma opiše razmerje med adsorpcijo in desorpcijo (Atkins in de Paula, 2002).

Adsorpcijska izoterma je krivulja, ki opisuje odvisnost dinamične kapacitete nosilca od koncentracije molekule v mobilni fazi pri konstanti temperaturi. Iz njene oblike lahko ugotovimo, v kakšni meri se molekule vežejo na ligand nosilca (Branović, 2001).

Adsorpcijsko izotermo matematično opišemo s pomočjo Langmuirjeve enačbe:

$$q = \frac{q_{\max} \times C}{(K_{\text{dis}} + C)} \quad \dots(1)$$

$q$	masa molekul adsorbiranih na nosilec pri določeni koncentraciji molekul
$q_{\max}$	maksimalna adsorpcijska kapaciteta nosilca
$K_{\text{dis}}$	konstanta disociacije kompleksa
$C$	koncentracija molekul

#### 2.2.1.4 Karakterizacija nosilca – kapaciteta

Kapaciteta kromatografskega nosilca za določeno makromolekulo je pomemben parameter, saj vpliva na učinkovitost procesov ločevanja. Dinamično kapaciteto določamo s pomočjo prebojne krivulje. Prek stacionarne faze nosilca črpamo raztopino z znano koncentracijo makromolekule – topljenca. Molekule topljenca se adsorbirajo na aktivno površino stacionarne faze. Ko se prečrpa zadostna količina raztopine in je večina aktivnih mest zasedenih z molekulami topljenca, se ostale molekule topljenca ne morejo več adsorbirati na ligand. Pojavijo se v eluentu, zato (v primeru proteinov) zaznamo povečanje signala UV detektorja. Po določenem času postane hitrost adsorpcije molekul na ligand enaka hitrosti desorpcije, vzpostavi se dinamično ravnotežje. Dinamično kapaciteto določimo tako, da pri določenem odstotku maksimalne vrednosti signala izračunamo maso topljenca, ki se je vezala na volumen nosilca (Afeyan in sod., 1990). Kapaciteta je odvisna od različnih kromatografskih parametrov, kot so npr. pH mobilne faze, ionska jakost in hitrosti mobilne faze.

#### 2.2.2 2-D elektroforeza

Glavni koraki 2-D elektroforeze so (Görg in sod., 2007):

- ekstrakcija proteinov,
- separacija proteinov z 2-D elektroforezo,
- detekcija proteinov.

Po detekciji proteinov lahko sledi še računalniška analiza 2-D gelov ter identifikacija in karakterizacija proteinov.

Metodo je razvil O'Farrell (1975) v kombinaciji izoelektričnega fokusiranja v prvi dimenziji, v drugi dimenziji pa natrijev dodecilsulfat poliakrilamidne elektroforeze (Görg in sod., 2007).

Izoelektrično fokusiranje je elektroforezna tehnika za separacijo proteinov glede na njihovo izoelektrično točko (pI). Raztopina amfolitov (to so proteini, ki delujejo kot kisline ali kot baze) se najprej loči na tankem gelu, ki je nanosen na traku z imobiliziranim pH gradientom (IPG-trak). Potovanje molekul po IPG-traku v električnem polju je osnovano na pH gradientu. Ko dodamo mešanico različnih proteinov, IPG-trak priključimo na vir napetosti in steče električni tok. Na začetku so molekule proteinov nabite, pozitivno oz. negativno. Njihovo gibanje po IPG-traku se zaustavi pri tisti pH vrednosti, kjer protein

nima več naboja, to je v njegovi izoelektrični točki. Kot rezultat dobimo proteine razporejene po IPG-traku glede na izoelektrično točko proteina (GE Healthcare, 2004).

Nato pa se proteini ločijo še glede na molekularno maso (druga dimenzija). Ta dimenzija se imenuje poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti ionske površinsko aktivne snovi, npr.: natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE). IPG-trak iz prve dimenzije ročno prenesemo na vrh SDS-PAGE gela. Zaradi vezave SDS-a na protein, dobijo enote negativen naboj, proteini se začno premikati v gelu proti anodi.

Hidrofobni del SDS-a se zelo močno veže na dve aminokislini v denaturirani polipeptidni verigi. Vsaka molekula SDS-a ima dva negativna naboja. S tem prekrije naboj, ki bi ga protein lahko imel. Razmerje med dolžino verige proteina v kompleksu z SDS-om je enako za vse proteine, ki imajo zato tudi enako elektroforezno mobilnost (Kočevar in sod., 2007).

Za prekinitev inter- in intra molekularnih disulfidnih vezi v proteinih uporabimo dodatek reducentov kot sta 2-merkaptoetanol in ditiotreitrol (DTT) (Görg in sod., 2007). Uporabljajo se tudi detergenti, kot sta CHAPS in Triton X-100, da preprečimo hidrofobne interakcije med proteini. S tem preprečimo agregacijo in obarvanje proteinov. Dodatek glicerola izniči elektroosmotski učinek in s tem omogoča boljši prenos proteinov z IPG-traku v gel (Görg in sod., 2007).

Proteini nato potujejo po matriksu gela, ki ga predhodno pripravimo s polimerizacijo akrilamida in N,N-dimetil-bisakrilamida (bisakrilamid). Med polimerizacijo nastane zamrežena struktura gela (nastanejo pore). Stopnja zamreženosti je odvisna od razmerja akrilamida in bisakrilamida (Wittmann-Liebold in sod., 2006). Večji proteini potujejo počasneje, manjši hitreje. Na razpon ločenih mas pa lahko vplivamo z gostoto gela in s pogoji elektroforeze (čas in napetost) (GE Healthcare, 2004). Po končani elektroforezi fiksiramo proteine v gelu, da ne difundirajo znotraj gela in da odstranimo neproteinske komponente, ki bi ovirale nadaljnje postopke barvanja z ustreznimi barvili – vizualizacija (Görg in sod., 2007).

Klasične metode za detekcijo proteinov na 2-D gelu vključujejo barvanje z anionskimi barvili (Coomassie Blue), negativno barvanje s kovinskimi kationi (Zn-imidazol), barvanje s srebrom, fluorescenčno barvanje (Sypro Ruby) in označevanje z radioaktivnimi izotopi (Ramagli, 1999). Specifične metode barvanja za detektiranje proteinov na 2-D gelih se uporabljajo za določevanje post-translacijskih modifikacij proteinov. Za fosforilirane proteine se uporablja fluorescentna detekcija z uporabo selektivnega barvila Pro-Q Diamond. Prednost te metode je, da je preprosta in hitra. V praksi se uporablja tudi prenos proteinov na membrane (blotting) in detektiranje z uporabo specifičnih monoklonskih protiteles (Görg in sod., 2007).

Po končani detekciji je na vrsti dokumentacija obarvanih 2-D gelov z uporabo različnih kamer in fotoaparátov. Sledi še računalniška obdelava slik.

Ena večjih prednosti 2-D elektroforeze je ta, da lahko na enem gelu vidimo več tisoč elektroforetskih lis proteinov. Detektiramo lahko elektroforetske lise, ki vsebujejo manj kot



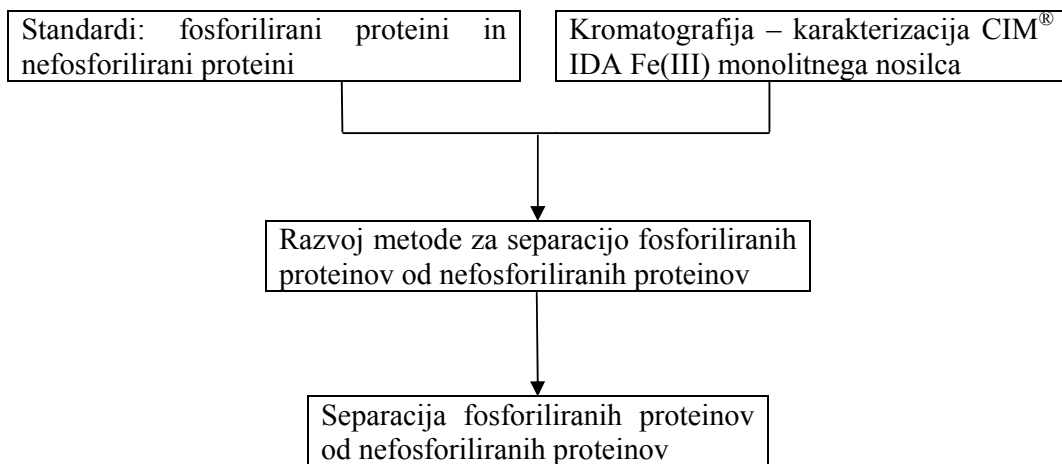
1 ng proteinov in proučujemo proteine po post-translacijskih modifikacijah (Görg in sod., 2007).

Pomanjkljivost te tehnike je v tem, da ne moremo analizirati proteinov, ki imajo ekstremne izoelektrične točke in ne moremo analizirati tistih proteinov, ki so manjši od 15 kDa (Humphery-Smith, 2003). Velika koncentracija prisotnih soli (>100 mM) ovira elektroforezno separacijo, poveča prevodnost pri IEF, zato je potrebno predhodno odstraniti prisotne soli z obarjanjem, dializo oz. 2-D očiščevalnim kompletom (GE Healthcare, 2004). Veliki koncentraciji soli pri IEF se lahko izognemo tako, da v začetni fazi uporabimo manjšo napetost – okoli 100V (Görg in sod., 2007).

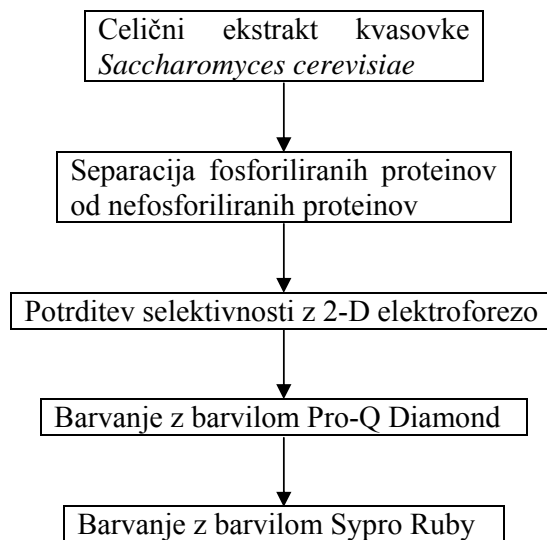
### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 POTEK DELA

1. korak: razvoj metode za selektivno čiščenje



2. korak: razvoj metode za potrditev selektivno očiščenih fosforiliranih proteinov



Slika 1: Hodogram poteka dela

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Kemikalije

#### 3.2.1.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija

- Merck:
  - dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
  - klorovodikova kislina –  $\text{HCl}$
  - natrijev hidrogenkarbonat –  $\text{NaHCO}_3$
  - natrijev klorid –  $\text{NaCl}$
  - nikljev sulfat heksahidrat –  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
  - tris (hidroksimetil)-aminometan –  $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$
  
- Fluka:
  - bakrov sulfat pentahidrat –  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
  - imidazol –  $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$
  - železov(III) klorid heksahidrat –  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
  - železov(III) klorid anhidrid –  $\text{FeCl}_3$
  
- Kemika:
  - EDTA

#### 3.2.1.2 2-D elektroforeza

- GE Healthcare:
  - »2-D Clean Up« komplet
  - CHAPS
  - IPG puffer 4-7
  
- Kemika:
  - natrijev acetat
  
- Merck:
  - acetonitril (100 %)
  - glicin
  - klorovodikova kislina (37 %)
  - metanol (100 %)
  - očetna kislina (100 %)

Sigma:

- agaroz
- akrilamid/bisakrilamid (30 % / 0,8 %)
- APS
- bromfenol modro
- DTT
- glicerol
- JAA
- mineralno olje
- SDS
- TEMED
- urea
- tiourea

### 3.2.2 Rastopine

#### 3.2.2.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija

Rastopine kovinskih ionov:

1 M raztopina  $\text{CuSO}_4$

1 M raztopina  $\text{NiSO}_4$

0,5 M raztopina  $\text{FeCl}_3$

250 mM raztopina  $\text{FeCl}_3$

Rastopine za spiranje kovinskih ionov:

1 M raztopina  $\text{HCl}$

0,01 M raztopina  $\text{HCl}$

Rastopine za razvoj metode:

Mobilna faza A<sub>1</sub>: 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 M  $\text{NaCl}$ , pH 7,4

Mobilna faza A<sub>2</sub>: 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 M  $\text{NaCl}$ , 250 mM imidazol, pH 7,4

Mobilna faza B<sub>1</sub>: 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 M  $\text{NaCl}$ , 20 mM imidazol, pH 7,4

Mobilna faza B<sub>2</sub>: 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 M  $\text{NaCl}$ , 250 mM imidazol, pH 7,4

Mobilna faza C<sub>1</sub>: 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 M  $\text{NaCl}$ , pH 7,1

Mobilna faza C<sub>2</sub>: 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 M  $\text{NaCl}$ , 250 mM imidazol, pH 7,1

Mobilna faza D<sub>1</sub>: 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 M  $\text{NaCl}$ , 20 mM imidazol, pH 7,1

Mobilna faza D<sub>2</sub>: 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 M  $\text{NaCl}$ , 250 mM imidazol, pH 7,1

Mobilna faza E <sub>1</sub> :	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4
Mobilna faza E <sub>2</sub> :	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 100 mM imidazol, pH 7,4
Mobilna faza F <sub>1</sub> :	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4
Mobilna faza F <sub>2</sub> :	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4
Mobilna faza G <sub>1</sub> :	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4
Mobilna faza G <sub>2</sub> :	100 mM glicin, pH 3,0
Mobilna faza H <sub>1</sub> :	20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4
Mobilna faza H <sub>2</sub> :	20 mM NaHCO <sub>3</sub> , 0,5 M NaCl, pH 9,6

### 3.2.2.2 2-D elektroforeza

#### Raztopina za rehidracijo IPG-trakov:

Preglednica 1: Priprava raztopine za rehidracijo IPG-trakov

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
urea	10,5 g	7 M
tiourea	3,8 g	2 M
CHAPS	0,5 g	2 % (w/v)
IPG pufer 4-7	500 µL	2 % (v/v)
bromfenol modro	0,0005 g	0,002 (w/v)
bidestilirana voda do 25 mL		

Pred uporabo raztopini za rehidracijo trakov dodamo 5,6 mg DTT/2 mL raztopine.

#### Raztopine za pripravo ločilnega gela:

- 1,5 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8  
Zatehtamo 36,3 g Tris-a, dodamo 150 mL bidestilirane vode, uravnamo pH vrednost na 8,8 s koncentrirano HCl, dodamo bidestilirano vodo do 200 mL.
- 10 % (w/v) raztopina SDS  
Zatehtamo 10,0 g SDS-a in dopolnimo do 100 mL z bidestilirano vodo.
- Raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 % / 0,8 %).
- 10 % (w/v) raztopina APS  
Zatehtamo 0,1 g APS in dodamo do 1 mL bidestilirano vodo.

Ločilni gel debeline 1 mm:

Preglednica 2: Priprava ločilnega gela z debelino 1 mm z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida

Sestavina	Količina sestavin za pripravo akrilamidnega gela 12 % (w/v)
akrilamid/bisakrilamid (30 % / 0,8 %)	15,7 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	9,8 mL
10 % (w/v) raztopina SDS	0,4 mL
bidestilirana voda	13,0 mL
10 % (w/v) raztopina APS	195 µL
TEMED	13 µL

Raztopino APS in TEMED dodamo k raztopini preostalih sestavin (akrilamid/bisakrilamid + raztopina Tris-HCl + raztopina SDS + bidestilirana voda), ki smo jo predhodno razplinili na ultrazvočni kopeli (15 minut). Količine ustrezajo za pripravo dveh gelov debeline 1 mm ( $V = 19 \text{ mL}$ ).

Osnovni raztopina za uravnoteženje:

Preglednica 3: Priprava osnovne raztopine za uravnoteženje

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5 mL	50 mM
urea	36 g	6 M
glicerol	30 mL	30 % (v/v)
SDS	2 g	2 % (w/v)
bromfenol modro	0,002 g	0,002 % (w/v)
bidestilirana voda do 100 mL		

Raztopina za uravnoteženje I:

Zatehtamo 0,2 g DDT in dopolnimo do 20 mL z osnovno raztopino za uravnoteženje.

Raztopina za uravnoteženje II:

Zatehtamo 0,96 g JAA in dopolnimo do 20 mL z osnovno raztopino za uravnoteženje.

Raztopini za uravnoteženje I in II pripravimo sveže.

Agarozna raztopina:

V 250 mL infuzijsko steklenico zatehtamo 0,5 g agaroze in dodamo 100 mL 1 x SDS elektroforeznega pufra. Raztopino segrejemo v mikrovalovni pečici in dodamo kristalček barvila bromfenol modro. Tako pripravljeno raztopino lahko hranimo na sobni temperaturi 1 mesec.

SDS elektroforezni pufer:

Preglednica 4: Priprava SDS elektroforeznega pufera

Sestavina	5 x SDS elektroforezni pufer		1 x SDS elektroforezni pufer	
	Količina	Končna koncentracija	Količina	Končna koncentracija
Tris	15,0 g	260 mM	3,0 g	52 mM
glicin	72,0 g	960 mM	14,4 g	192 mM
SDS	5,0 g	0,5 % (w/v)	1,0 g	0,1 % (w/v)
bidestilirana voda do 1000 mL				

Fiksacijska raztopina:

Preglednica 5: Priprava fiksacijske raztopine

Sestavina	Količina (mL)
50 % metanol (v/v)	500
10 % očetna kislina (v/v)	100
bidestilirana voda do 1000 mL	

Raztopina za razbarvanje I:

Preglednica 6: Priprava raztopine za razbarvanje I

Sestavina	Količina (mL)
1 M natrijev acetat, pH 4,0	50
100 % acetonitril (v/v)	200
bidestilirana voda do 1000 mL	

Raztopina za razbarvanje II:

Preglednica 7: Priprava raztopine za razbarvanje II

Sestavina	Količina (mL)
10 % metanol (v/v)	100
7 % očetna kislina (v/v)	70
bidestilirana voda do 1000 mL	

**3.2.3 Vzorci**Standardni proteini:

- fosforilirana proteina:
  - beta-kazein (Sigma)
  - fosfitin (Sigma)
- nefosforiliran protein:
  - BSA (albumin govejega seruma (Sigma))

### Realni vzorec:

- Celični ekstrakt kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* (celokupna koncentracija vodotopnih proteinov 2 g/L)

### **3.2.4 Oprema**

#### 3.2.4.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija

##### Kromatografski nosilci:

Za razvijanje metode smo uporabljali monolitni nosilec CIM<sup>®</sup> IDA (BIA Separations). Kot referenčni nosilec smo uporabljali agarozni nosilec HiTrap IMAC (GE Healthcare). Na monolitni in agarozni nosilec smo po ustreznih postopkih imobilizirali kovinske ione. Dobili smo selektivni CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec in HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> agarozni nosilec. Obe selektivno ločujeta fosforilirane proteine od nefosforiliranih proteinov.

#### 3.2.4.2 2-D elektroforeza

##### Prva dimenzija:

- komercialni IPG-trakovi z imobiliziranim pH gradientom (GE Healthcare),
- podstavek z režami in pokrovom za rehidracijo IPG-trakov (GE Healthcare),
- Multiphor II elektroforetska enota (GE Healthcare),
- steklen podstavek z elektrodnimi priključki (GE Healthcare),
- plastična posoda z vdolbinami (GE Healthcare),
- elektrodni trakovi (GE Healthcare),
- elektrodi (GE Healthcare),
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare),
- termostatski cirkulator MultiTemp III (GE Healthcare).

##### Druga dimenzija:

- vertikalni diskontinuirni elektroforetski sistem SE 600 Hoeffler Scientific Instruments,
- 1-mm distančniki,
- steklene plošče,
- zgornja in spodnja posoda z elektrodama,
- hladilni sistem v obliki pretočne cevi,
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare),
- ultrazvočna kopel (Sonis Pio).

##### Programska oprema:

- sistem za dokumentacijo 2-D gelov G BOX:HR (Syngene)
- računalniški program za obdelavo gelov 2-D Dymension (Syngene).



### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija

Metodo za selektivno ločevanje fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov smo razvijali z uporabo sistema za visokotlačno tekočinsko kromatografijo, HPLC. Sistem HPLC smo sestavili iz naslednjih delov: dveh črpalk Knauer (HPLC Pump 64), 10 mL analitskih glav, injektorja, injekcijske zanke 10  $\mu$ L, UV detektorja Knauer (UV-VIS detektor VWM Knauer 36801), interface Knauer. Vse dele smo povezali s kapilarami. Sestavljen sistem HPLC smo upravljali z vnašanjem parametrov v programski paket Eurochrom 2000 za Windows. Uporabljali smo linearne in stopenjske gradiente, od 100 % vezne mobilne faze ( $A_1$ - $H_1$ ) do 100 % elucijske mobilne faze ( $A_2$ - $H_2$ ). S spreminjanjem gradienta obeh črpalk in kombinacijo veznega in elucijskega pufra smo spreminjali sestavo mobilne faze.

Standardne proteine smo raztapljali v različnih raztopinah vezne mobilne faze  $A_1$ - $H_1$ . Celični ekstrakt kvasovke so pripravili na Biotehniški fakulteti, na Katedri za Biotehnologijo. Za vezavo fosforiliranih proteinov na kromatografski nosilec smo uporabljali različne vezne mobilne faze ( $A_1$ - $H_1$ ), z različnimi pH vrednostmi (7,1-7,4). Za elucijo komponent smo uporabljali različne kombinacije elucijskih mobilnih faz ( $A_2$ - $H_2$ ) z različnimi vrednostmi pH (3,0-9,6) in različnimi koncentracijami imidazola (0-250 mM). Raztopine proteinov smo med posameznimi nanosi hranili v hladilniku pri 4 °C. Pretok je bil konstanten (3 mL/min). Temperatura je bila 25 °C. Absorbanco smo merili z UV detektorjem pri valovni dolžini 280 nm.

##### 3.3.1.1 Določanje dinamične kapacitete za kovinske ione

Kovinske ione smo imobilizirali na CIM<sup>®</sup> IDA monolitni nosilec. To je epoksi nosilec, na katerega je kovalentno vezana iminodiocetna kislina. CIM<sup>®</sup> IDA nosilec tvori komplekse s kovinskimi ioni. Uporabljali smo že pripravljene CIM<sup>®</sup> IDA monolitne nosilce. Pomembno pri imobilizaciji kovinskih ionov je, da se le-ti v zadostni količini vežejo na nosilec, saj le ti selektivno vežejo proteine. Količino kovinskih ionov na nosilcu podajamo kot kapaciteta za kovinske ione. Enačba za izračun kapacitete kovinskih ionov:

$$q = \frac{(\phi \times t_{50\%} - V_{mrtvi}) \times C_{raztopine}}{V_{nosilca}} \quad \dots(2)$$

q	kapaciteta za kovinske ione na nosilcu ( $\mu$ mol/mL)
$\Phi$	pretok mobilne faze (mL/min)
$t_{50\%}$	čas pri 50 % preboju (min)
$V_{mrtvi}$	mrtev volumen sistema (mL)
$C_{raztopine}$	koncentracija raztopine kovinskega iona (mol/mL)
$V_{nosilca}$	volumen kromatografskega nosilca (mL)

Pretok mobilne faze ( $\Phi$ ) preko sistema smo merili z merilnim valjem (volumen mobilne faze na časovno enoto). Raztopino kovinskih ionov znane koncentracije ( $C_{raztopine}$ ) smo pripravili tako, da smo zatehtali ustrezno količino kovinskih ionov v obliki soli, jo raztopili

in dopolnili do ustreznega volumna. Mrtvi volumen ( $V_{\text{mrtvi}}$ ) smo določili eksperimentalno. Vrednost preboja pri 50 % ( $t_{50\%}$ ) maksimalne vrednosti absorbance smo odčitali iz prebojne krivulje kromatograma. Volumen nosilca ( $V_{\text{nosilca}}$ ) je 0,34 mL.

### 3.3.1.2 Določanje dinamične kapacitete za standardne proteine

Proteini se reverzibilno vežejo na kromatografski nosilec. Glede na število vezavnih mest na nosilcu lahko določimo, kolikšna količina proteina se bo vezala na nosilec. Kapaciteta za proteine nam pove, koliko proteinov (mg) se bo vezal na volumsko enoto nosilca (mL). Dinamično kapaciteto smo določali iz prebojnih krivulj. Nosilec oz. CIM<sup>®</sup> IDA disk z imobiliziranim kovinskim ionom smo najprej spirali z vezno mobilno fazo, dokler signal na detektorju ni dosegel konstantne vrednosti. Nato smo preko nosilca črpali standardno raztopino beta-kazeina v vezni mobilni fazi. Iz prebojne krivulje, ki se je izrisala na kromatogramu, smo odčitali čas pri preboju 50 % maksimalne vrednosti absorbance. Dinamično kapaciteto smo izračunali po enačbi 2 (poglavje 3.3.1.1).

### 3.3.2 Priprava celičnega ekstrakta celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

K 0,6 g mokre kvasne biomase smo dodali 2,5 mL sterilnega ohlajenega pufru (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) in 3 g sterilnih cirkonij kremenčevih kroglic. Sledilo je razbijanje celic 5 x po 1 minuto na vrtničniku z vmesnimi 1-minutnimi intervali na ledu. Tako dobljeni homogenat smo centrifugirali pri 20000 g 20 minut pri 4 °C. Supernatant (ekstrakt) smo do analize hranili pri -80 °C. Koncentracijo proteinov v ekstraktu smo določili po Bradfordovi metodi (Bradford, 1976).

### 3.3.3 2-D elektroforeza

#### 3.3.3.1 Čiščenje vzorcev z uporabo »2-D Clean Up« kompleta

- prenos vzorcev (volumni frakcije) v mikrocentrifugirko,
- dodatek trikratnega volumna precipitanta (glede na volumen vzorca), mešanje na vrtničniku in inkubacija na ledu 15 minut,
- dodatek trikratnega volumna ko-precipitanta mešanici vzorca (glede na volumen vzorca) in precipitanta, kratko mešanje na vrtničniku,
- centrifugiranje pri 8000 g 10 min pri temperaturi 4 °C,
- odstranitev supernatanta s previdnim pipetiranjem, sediment se ne sme resuspendirati,
- dodatek 80 µL ko-precipitanta (prekrije sediment) in inkubacija na ledu 5 minut,
- centrifugiranje pri 8000 g 5 minut pri temperaturi 4 °C, odstranitev supernatanta,
- dodatek 50 µL bidestilirane vode (prekrije sediment), mešanje na vrtničniku, da se sediment resuspendira,
- dodatek 1 mL pufru za izpiranje (ohlajen na temperaturo -20 °C 1 uro) in 5 µL aditiva, mešanje na vrtničniku (resuspendiranje sedimenta),
- inkubacija pri temperaturi -20 °C 30 minut, mešanje na vrtničniku 20-30 sekund vsakih 10 minut,
- centrifugiranje pri 10000 g 10 minut pri temperaturi 4 °C,
- odstranitev supernatanta (viden bel sediment), sušenje sedimenta na zraku največ 5 minut,

- raztopitev sedimenta v raztopini za rehidracijo IPG-trakov in mešanje na vrtničniku do popolnega raztapljanja sedimenta,
- centrifugiranje pri 8000 g 10 minut pri temperaturi 20 °C ter nanos supernatanta na IPG-trak in uporaba IPG-traka v 1. dimenziji 2-D elektroforeze oz. hranjenje IPG-traka pri temperaturi -80 °C.

### 3.3.3.2 Prva dimenzija

#### Rehidracija IPG-trakov:

Uporabili smo IPG-trakove z imobiliziranim pH gradientom (4,0 – 7,0 ) dolžine 13 cm, ki smo jih hranili pri temperaturi -20 °C. Za rehidracijo smo uporabili podstavek z režami in pokrovom. Podstavek smo najprej uravnali v ravnovesno lego, nato pa v sredino reže odpipetirali 250 µL raztopine za rehidracijo trakov z vključenim vzorcem (v 250 µL je 60 µg vzorca). S traku z anodnega konca smo odstranili plastično folijo, ki je prekrivala gel, in ga previdno položili z gelom navzdol v režo ter prekrili z 2,5 mL mineralnega olja. Vse smo pokrili s pokrovom. Rehidracija je potekala 13 ur.

#### Izoelektrično fokusiranje:

Po končani rehidraciji smo trakove sprali z bidestilirano vodo in jih osušili na filter papirju, obrnjene z gelom navzgor. Na ploščo, ki zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C med potekom IEF, smo nanесли 3 – 4 mL mineralnega olja, čezenj postavili steklen podstavek z elektrodnimi priključki. V podstavek smo dali plastično ploščo z vdolbinami, pred tem pa v podstavek nalili 10 mL mineralnega olja. V vdolbine plastične plošče smo položili IPG-trakove z gelom navzgor. Odrezali smo dva enako dolga elektrodna trakova, ju omočili v bidestilirani vodi in rahlo osušili ter položili pravokotno na oba konca trakov. Čez niju smo namestili elektrodi. IPG-trakove smo prelili s 170 mL mineralnega olja. Pogoji IEF so bili sledeči:

Preglednica 8: Pogoji izoelektričnega fokusiranja

Faza IEF	Napetost (V)	Čas trajanja (min)
1. faza	300	1
2. faza	3500	90
3. faza	3500	260

IEF je potekalo pri temperaturi 20 °C. Po končanem IEF smo trakove shranili v plastični mapi pri temperaturi -80 °C do izvedbe druge dimenzije.

### 3.3.3.3 Druga dimenzija

#### Vlivanje gelov:

Med stekleni plošči, ki skupaj z ostalimi sestavnimi deli tvorijo kalup, smo vlili ločilni gel (19 mL za en gel) z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida (debelina gela je 1 mm). Na zgornjo površino gela smo z mikropipeto nanесли tanko plast bidestilirane vode, ki gelu prepreči stik s kisikom ter omogoča enakomerno polimerizacijo. Ko je gel polimeriziral, smo vodo odlili in površino gela dobro osušili s fenom.

Uravnoteženje IPG-trakov:

IPG-trakove smo vzeli iz zamrzovalnika in jih prenesli v epruvete z 10 mL pufru za uravnoteženje I. Nato smo jih dali na stresalnik za 15 minut. Iz pufru za uravnoteženje I smo IPG-trakove prenesli v epruvete z 10 mL pufru za uravnoteženje II in jih dali na stresalnik še za 15 minut. IPG-trakove smo pred prenosom na ločilni gel osušili na filter papirju.

Prenos IPG-trakov na nosilni gel:

Na površino ločilnega gela smo nalili agarozno raztopino, ki je bila segreta na 80 °C in takoj, previdno, brez tvorbe mehurčkov, spustili skozi IPG-trak, ki se je usedel na površino gela. Ko se je agarozni gel strdil, smo nadaljevali z SDS PAGE.

SDS PAGE:

Ko se je agarozna raztopina strdila, smo kalup namestili med dve posodi, kjer se nahajata elektrodi. Obe posodi smo napolnili z 1 x SDS elektroforeznim pufrom. Potovanje vzorcev je potekalo s hlajenjem v smeri anode najprej 15 minut pri konstantnem toku 20 mA/gel in nato pri konstantnem toku 40 mA/gel, dokler barvilo bromfenol modro ni doseglo spodnjega roba. Po končani elektroforezi smo odstranili steklene plošče in gele obdelovali v postopku barvanja.

## 3.3.3.4 Barvanje gelov

Barvanje z barvilom Pro-Q Diamond:

Po končani elektroforezi smo gele barvali s selektivnim fluorescentnim barvilom Pro-Q Diamond, ki se selektivno veže na fosforilirane proteine. Postopek barvanja je vključeval predhodno fiksacijo proteinov v gelu, izpiranje gela, barvanje z barvilom in ponovno izpiranje. Protokol barvanja je v preglednici 9.

Preglednica 9: Barvanje z barvilom Pro-Q Diamond

	Korak	Raztopina	Volumen raztopine (mL)	Čas (min)	Ponovitev
1	fiksacija	fiksacijska raztopina	100	30	2 x
2	izpiranje	bidestilirana voda	200	10	3 x
3	barvanje	barvilo Pro-Q Diamond	200	120	1 x
4	razbarvanje	raztopina za razbarvanje I	100	30	4 x
5	izpiranje	bidestilirana voda	200	5	4 x

Po končanem protokolu barvanja s Pro-Q Diamond barvilom smo gele fotografirali in shranili slike za nadaljnjo elektronsko obdelavo in ovrednotenje.

### Barvanje z barvilom Sypro Ruby:

Gele smo po barvanju s Pro-Q Diamond prenesli nazaj v plastične posode in nadaljevali s protokolom barvanja z drugim fluorescentnim barvilom Sypro Ruby, ki se selektivno veže na bazične aminokisliline in polipeptidno verigo. S tem smo dobili celoten proteinski profil našega vzorca. Protokol barvanja je v preglednici 10.

Preglednica 10: Barvanje z barvilom Sypro Ruby

	Korak	Raztopina	Volumen raztopine (mL)	Čas (min)	Ponovitev
1	barvanje	Sypro Ruby	200	480	1 x
2	razbarvanje	raztopina za razbarvanje II	200	30	2 x
3	izpiranje	bidestilirana voda	200	5	2 x

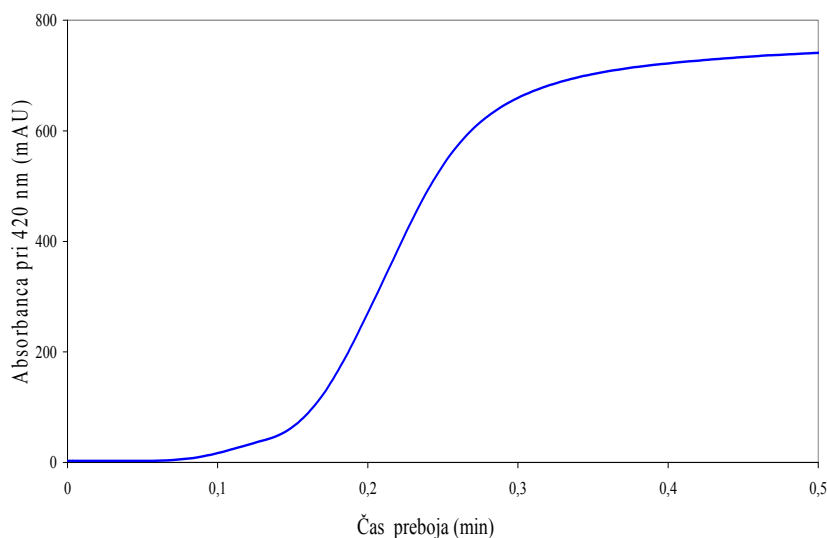
## 4 REZULTATI

Namen diplomske naloge je bil razvoj metode za ločevanje fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov. Prvi korak je bila imobilizacija kovinskih ionov na monolitni kromatografski nosilec in njegova karakterizacija. Nato je sledil razvoj metode selektivne obogatitve standardnih fosforiliranih proteinov in uporaba razvite metode na realnem vzorcu kvasnega ekstrakta *Saccharomyces cerevisiae*. V drugem koraku smo rezultate ločevanja potrdili z metodo 2-D elektroforeze.

### 4.1 VISOKOTLAČNA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA

#### 4.1.1 Eksperimentalno določanje mrtvega volumna sistema

Celoten mrtvi volumen sistema ( $V_{\text{mrtvi sistema}}$ ) je sestavljen iz volumna kapilar med ohišjem in detektorjem, volumna ohišja in volumna por monolita. Volumen por monolitnega nosilca ( $V_{\text{por}}$ ) je 0,2 mL. Določili smo mrtvi volumen sistema od začetka ohišja do detektorja skupaj s kapilarami brez monolitnega nosilca v ohišju. Pripravili smo raztopino kovinskih ionov znane koncentracije ( $c_{\text{raztopine}}$ ). Raztopino kovinskih ionov smo pripeljali po kapilah HPLC sistema do začetka ohišja. S programom Eurochrom 2000 za Windows smo napisali ustrezno kromatografsko metodo in tako računalniško spremljali odziv absorbance na detektorju. V programu se je izrisala prebojna krivulja kovinskih ionov, kjer smo odčitali čas pri 50 % preboju ( $t_{50\%}$ ). Zaradi natančnosti smo merili pretok mobilne faze. V stekleno čašo smo zbirali eluent in s tehtanjem eluenta v določenem času izračunali izmerjen pretok ( $\Phi$ ). Iz podatka  $t_{50\%}$  in  $\Phi$  smo izračunali mrtvi volumen sistem ( $V_{\text{mrtvi sistema}}$ ), ki znaša 0,185 mL.



Slika 2: Prebojna krivulja brez monolitnega nosilca – eksperimentalno določanje mrtvega volumna sistema

Celoten mrtvi volumen sistem ( $V_{\text{mrtvi celoten}}$ ) je tako seštevek volumna por ( $V_{\text{por}}$ ) in mrtvega volumna sistema brez kromatografskega nosilca ( $V_{\text{mrtvi sistema}}$ ). Celoten mrtvi volumen sistema je 0,385 mL. Ta podatek smo uporabljali pri nadaljnjih izračunih.

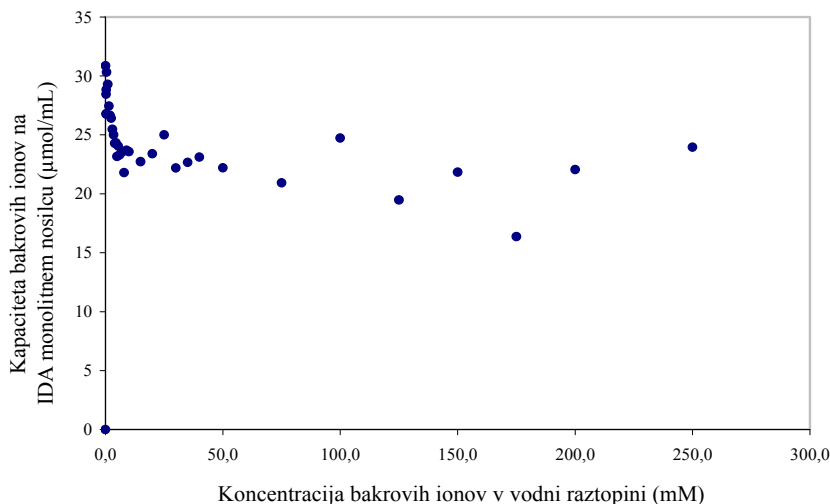
#### 4.1.2 Karakterizacija CIM<sup>®</sup> IDA Cu<sup>2+</sup> monolitnega nosilca

Naredili smo adsorpcijsko izotermo bakrovih ionov. Pripravili smo raztopine bakrovih ionov z različnimi koncentracijami od 0,5 mM do 250 mM iz predhodno pripravljene 1 M raztopine bakrovih ionov. Pri vsaki koncentraciji raztopine smo naredili prebojno krivuljo in pri tem merili pretok. Nastavljen pretok je bil s pomočjo programske opreme 3 mL/min, vendar smo za natančno merjenje uporabljali merilni valj in v časovni enoti merili dejanski pretok. Na detektorju je bila nastavljena valovna dolžina 310 nm, ker imajo bakrovi ioni pri tej vrednosti absorpcijski maksimum. Iz prebojne krivulje smo odčitali čas pri preboju  $t_{50\%}$  in iz zbranih podatkov izračunali kapaciteto bakrovih ionov na nosilcu. Iz podatkov o kapaciteti bakrovih ionov pri dani koncentraciji smo naredili adsorpcijsko izotermo. Po vsakem nalaganju bakrovih ionov na nosilec smo le-te sprali z 1 M raztopino HCl in s tem pripravili nosilec za ponovno nalaganje bakrovih ionov. Kapaciteto bakrovih ionov smo izračunali po enačbi 2 (poglavje 3.3.1.1). Podatki so zbrani v preglednici št. 11 in prikazani na sliki 3.

Preglednica 11: Podatki za adsorpcijsko izotermo bakrovih ionov na CIM<sup>®</sup> IDA monolitnem nosilcu

Koncentracija (mM)	Izmerjen pretok (mL/min)	Odčitani t <sub>50%</sub> (min)	Kapaciteta (μmol/mL)
0,05	3,020	69,620	30,9
0,30	3,039	10,737	28,5
0,35	2,984	8,853	26,8
0,40	3,105	8,018	28,8
0,45	3,070	6,710	26,8
0,50	3,144	6,679	30,3
1,0	3,129	3,306	29,3
1,5	3,123	2,115	27,4
2,0	3,117	1,577	26,7
2,5	3,185	1,249	26,4
3,0	3,141	1,042	25,5
3,5	3,142	0,896	25,0
4,0	3,132	0,782	24,3
4,5	3,109	0,715	24,3
5,0	3,131	0,626	23,2
5,5	3,122	0,600	24,1
6,0	3,084	0,553	23,3
7,0	3,102	0,492	23,5
8,0	3,130	0,419	21,8
9,0	3,119	0,410	23,7
10,0	3,094	0,384	23,6
15,0	3,045	0,296	22,7
20,0	3,097	0,253	23,4
25,0	3,072	0,236	25,0
30,0	3,048	0,209	22,2
35,0	3,089	0,196	22,7
40,0	3,155	0,184	23,1
50,0	3,142	0,171	22,2
75,0	3,139	0,153	20,9
100,0	3,185	0,147	24,7
125,0	3,135	0,140	19,5
150,0	3,126	0,139	21,8
175,0	3,153	0,132	16,4
200,0	3,146	0,134	22,1
250,0	3,166	0,132	23,9





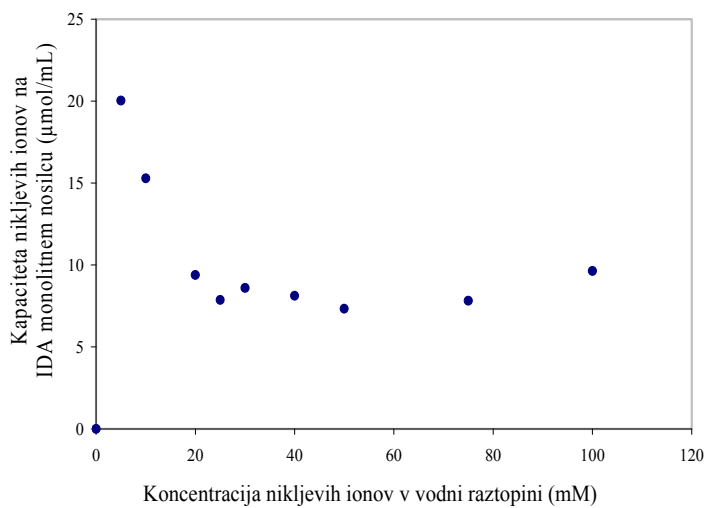
Slika 3: Adsorpcijska izoterma za bakrove ione na CIM® IDA monolitnem nosilcu pri različnih koncentracijah bakrovih ionov v vodni raztopini

#### 4.1.3 Karakterizacija CIM® IDA Ni<sup>2+</sup> monolitnega nosilca

Naredili smo adsorpcijsko izotermo nikeljevih ionov. Pripravili smo si raztopine nikeljevih ionov različnih koncentracij od 0,5 mM do 100 mM iz predhodno pripravljene 1 M raztopine nikeljevih ionov. Adsorpcijsko izotermo smo določili na enak način kot v točki 4.1.2. Na detektorju je bila nastavljena valovna dolžina 380 nm, ker imajo nikeljevi ioni pri tej vrednosti absorpcijski maksimum. Kapaciteto nikeljevih ionov smo izračunali po enačbi 2 (poglavje 3.3.1.1). Podatki so zbrani v preglednici 12 in prikazani na sliki 4.

Preglednica 12: Podatki za adsorpcijsko izotermo nikeljevih ionov na CIM® IDA monolitnem nosilcu

Koncentracija (mM)	Izmerjen pretok (mL/min)	Odčitani t <sub>50%</sub> (min)	Kapaciteta (µmol/mL)
5,0	3,020	0,577	20,0
10,0	3,003	0,299	15,3
20,0	3,026	0,178	9,4
25,0	3,030	0,160	7,9
30,0	3,060	0,156	8,6
40,0	3,054	0,147	8,1
50,0	2,967	0,144	7,3
75,0	3,023	0,137	7,8
100,0	3,059	0,134	9,6



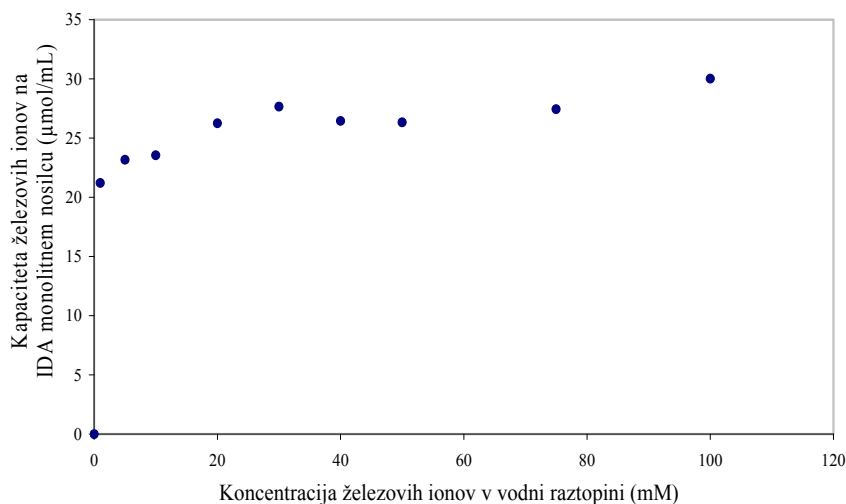
Slika 4: Adsorpcijska izoterma za nikljeve ione na CIM® IDA monolitnem nosilcu pri različnih koncentracijah nikljevih ionov v vodni raztopini

#### 4.1.4 Karakterizacija CIM® IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnega nosilca

Naredili smo adsorpcijsko izotermo železovih ionov. Pripravili smo si raztopine železovih ionov različnih koncentracij od 1 mM do 100 mM iz predhodno pripravljene 250 mM raztopine železovih ionov. Adsorpcijsko izotermo smo določili na enak način kot v točki 4.1.2. Na detektorju je bila nastavljena valovna dolžina 420 nm, ker imajo železovi ioni pri tej vrednosti absorpcijski maksimum. Po vsakem nalaganju železovih ionov na nosilec, smo le te sprali z 1 M raztopino HCl in s tem pripravili nosilec za ponovno nalaganje železovih ionov. V kolikor je ostal monolitni nosilec po spiranju z 1 M raztopino HCl še vedno obarvan, smo ga čez noč pustili v 1 M raztopini HCl. Kapaciteto železovih ionov smo izračunali po enačbi 2 (poglavje 3.3.1.1). Podatki so zbrani v preglednici 13 in prikazani na sliki 5.

Preglednica 13: Podatki za adsorpcijsko izotermo železovih ionov na CIM® IDA monolitnem nosilcu

Koncentracija (mM)	Izmerjen pretok (mL/min)	Odčitani t <sub>50%</sub> (min)	Kapaciteta (µmol/mL)
1,0	3,075	2,469	21,2
5,0	3,080	0,634	23,2
10,0	3,091	0,381	23,5
20,0	3,107	0,265	26,3
30,0	3,131	0,221	27,7
40,0	3,120	0,193	26,4
50,0	3,117	0,179	26,3
75,0	3,173	0,158	27,4
100,0	3,149	0,153	30,0

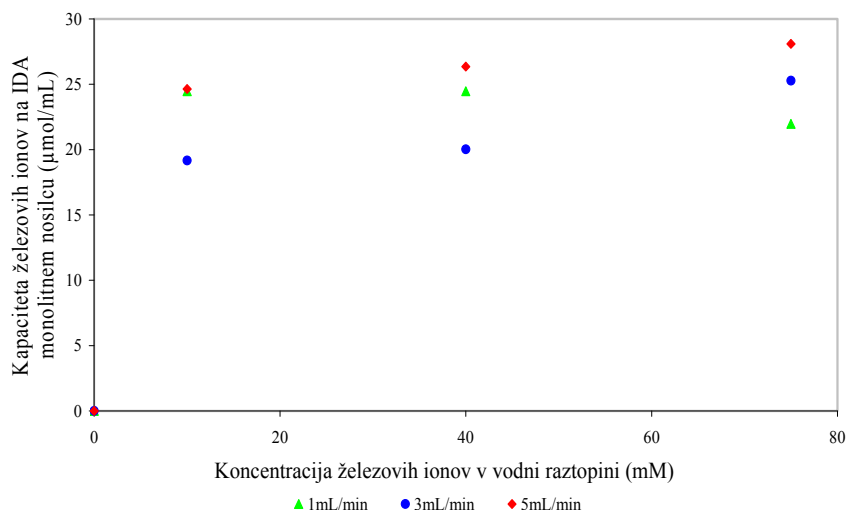


Slika 5: Adsorpcijska izoterma za železove ione na CIM® IDA monolitnem nosilcu pri različnih koncentracijah železovih ionov v vodni raztopini

Prednost monolitnih nosilcev je od pretoka neodvisna kapaciteta, zato smo naredili adsorpcijsko izotermo pri različnih pretokih raztopine železovih ionov. Slika 6 nam pokaže kapacitete nosilca za železove ione v odvisnosti od njihovih koncentracij pri pretokih 1, 3 in 5 ml/min. Posamezne meritve niso bile narejene v paralelkah. Vse vrednosti kapacitet za železove ione so pri vsakem pretoku razpršene v območju med 20 in 28 µmol/mL. Zato lahko sklepamo, da je dinamična kapaciteta neodvisna od pretoka (preglednica 14).

Preglednica 14: Podatki za adsorpcijsko izotermo železovih ionov na CIM® IDA monolitnem nosilcu

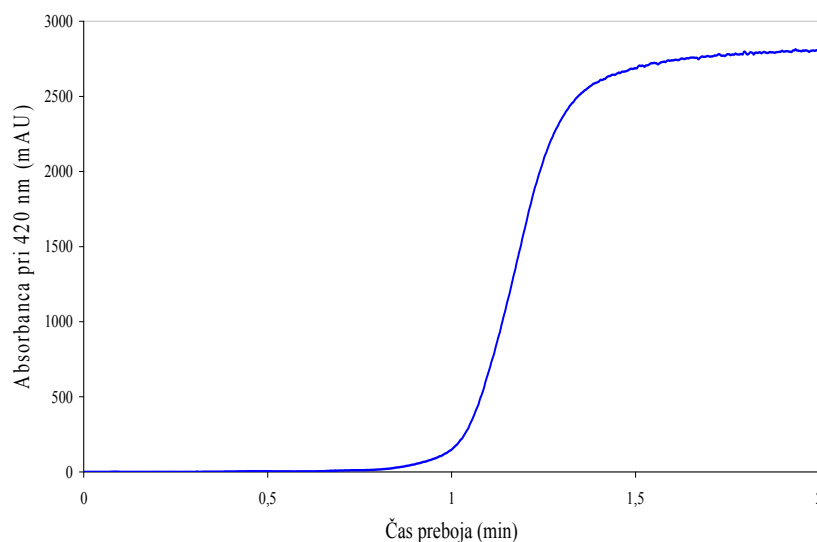
Koncentracija (mM)	Izmerjen pretok (mL/min)	Odčitani $t_{50\%}$ (min)	Kapaciteta (µmol/mL)
10,0	1,028	1,178	24,5
40,0	1,041	0,563	24,5
75,0	1,027	0,465	22,0
10,0	3,102	0,332	19,2
40,0	3,119	0,176	20,0
75,0	3,143	0,157	25,3
10,0	4,776	0,255	24,6
40,0	4,707	0,128	26,4
75,0	4,704	0,108	28,1



Slika 6: Adsorpcijske izoterme za železove ione različnih koncentracij na CIM<sup>®</sup> IDA monolitnem nosilcu pri različnih pretokih

#### 4.1.5 Karakterizacija HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> delčnega nosilca

Del eksperimenta je primerjava karakteristik monolitnega nosilca z delčnim nosilcem. Za delčni nosilec smo uporabili HiTrap IMAC agarozni nosilec proizvajalca GE Healthcare. Nosilec se razlikuje po volumnu in po vrsti stacionarne faze (1 mL pri HiTrap IMAC koloni). Pod enakimi pogoji kot na CIM<sup>®</sup> IDA nosilec smo nalagali raztopino železovih ionov na HiTrap IMAC nosilec. Predhodno smo ga kondicionirali z 0,01 M raztopino HCl. Pretok pri nalaganju železovih ionov je bil 1 mL/min. Med meritvijo smo merili dejanski pretok. Kapaciteto železovih ionov smo izračunali po enačbi 2 (poglavje 3.3.1.1). Podatki so zbrani v preglednici 15. Na sliki 7 je prikazana prebojna krivulja.



Slika 7: Prebojna krivulja železovih ionov na HiTrap IMAC nosilcu

Preglednica 15: Podatki za adsorpcijsko izotermo železovih ionov na HiTrap IMAC nosilcu

Koncentracija (mM)	Izmerjen pretok (mL/min)	Odčitani $t_{50\%}$ (min)	Kapaciteta ( $\mu\text{mol/mL}$ )
50,0	1,050	1,313	25,3
100,0	1,054	1,176	36,7

#### 4.1.6 Iskanje pogojev za vezavo in elucijo fosforiliranih proteinov

V prvem koraku razvoja metode je bilo potrebno najti ustrezne pogoje za vezavo standardnih fosforiliranih proteinov na nosilec. Pri tem smo uporabili več različnih mobilnih faz z različnimi vrednostmi pH. Ko se je vzorčni protein vezal na nosilec, je sledil drugi korak. V tem koraku je bilo potrebno izbrati ustrezne pogoje, da se protein eluira (odstrani) z nosilca.

Za standardni fosforilirani protein smo uporabljali protein beta-kazein. Koncentracija proteina v vezni mobilni fazi je bila vedno 1 mg/mL. Raztopino proteina smo si pripravili vedno na enak način. V majhno stekleno posodico smo zatehtali količino proteina in ga raztopili v ustreznem volumnu vezne mobilne faze, da je bila koncentracija proteina 1 mg/mL. Vzorec smo nanašali na nosilec prek nanašalnega ventila, na katerem je bila 10  $\mu\text{L}$  zanka. S stekleno nanašalno iglo smo odmerili 30  $\mu\text{L}$  vzorca. Z 20  $\mu\text{L}$  smo predhodno sprali zanko. Vzorcev raztopljenih proteinov nismo filtrirali.

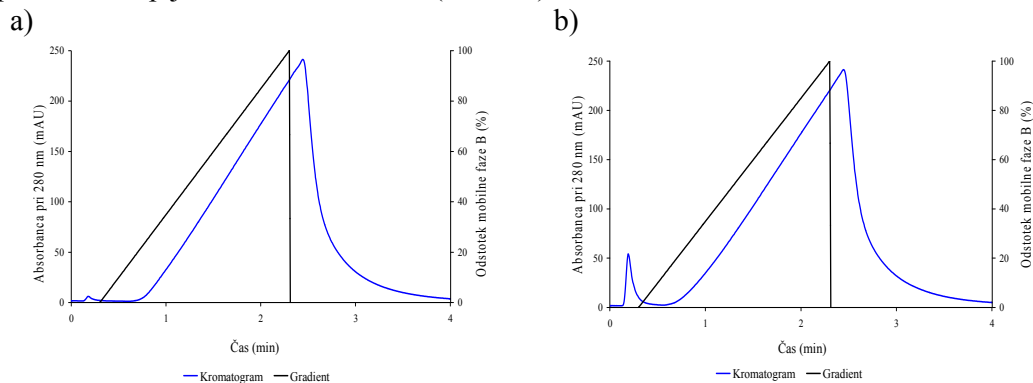
Na črpalko A na HPLC sistemu smo postavili vezno mobilno fazo ( $A_1$ - $H_1$ ). Na črpalko B na HPLC sistemu smo postavili elucijsko mobilno fazo ( $A_2$ - $H_2$ ). Uporabljali smo kombinacije vezne mobilne faze  $A_1$  in elucijske mobilne faze  $A_2$ , v naslednjem koraku je bila vezna mobilna faza  $B_1$  in elucijska mobilna faza  $B_2$  vse do zadnje kombinacije mobilnih faz  $H_1$  in  $H_2$ .

S programom Eurochrom 2000 za Windows smo uravnavali odstotek pretoka posamezne mobilne faze in s tem dobivali linearne in stopenjske gradiente od 0 do 100 % elucijske mobilne faze. S tem smo spreminjali vezne pogoje na nosilcu. Pretok mobilne faze je vseskozi 3 mL/min.

Nosilec smo pred pričetkom metode kondicionirali z vezno mobilno fazo, dokler ni bil signal na UV detektorju pri valovni dolžini 280 nm konstanten oz. do vrednosti pH vezne mobilne faze.

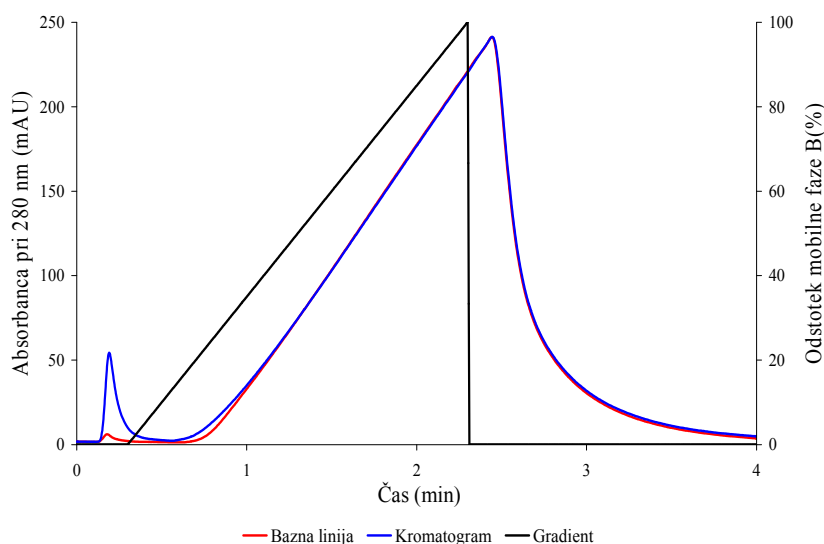
4.1.6.1 Uporaba mobilne faze A<sub>1</sub> in A<sub>2</sub>

Mobilna faza A<sub>1</sub> ne vsebuje imidazola, v mobilni fazi A<sub>2</sub> pa je imidazol (250 mM raztopina). Vrednost pH mobilnih faz je 7,4. Standarden fosforiliran protein smo raztopili v mobilni fazi A<sub>1</sub>. Monolitni nosilec smo predhodno kondicionirali z mobilno fazo A<sub>1</sub> do vrednosti pH 7,4. Na nosilec smo nanесли mobilno fazo A<sub>1</sub> in tako posneli odziv mobilnih faz na nosilcu (slika 8a). Nato smo na nosilec nanесли standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi A<sub>1</sub> (slika 8b).



Slika 8: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne A<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,4) in elucijske mobilne faze A<sub>2</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4); volumen vezne faze A<sub>1</sub> 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min; b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi A<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,4); volumen nanesenega vzorca 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min

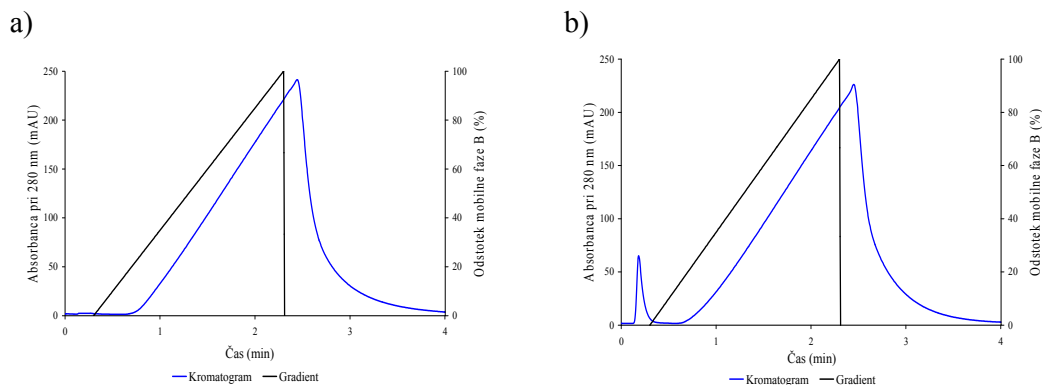
Na sliki 9 je prikazana primerjava: na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilec smo nanесли mobilno fazo A<sub>1</sub> in standardni fosforilirani protein raztopljen v mobilni fazi A<sub>1</sub>.



Slika 9: Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi A<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,4). Vezna mobilna faza je 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,4, elucijska mobilna faza je 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4. Volumen nanesenega vzorca 10  $\mu$ L; pretok 3 mL/min

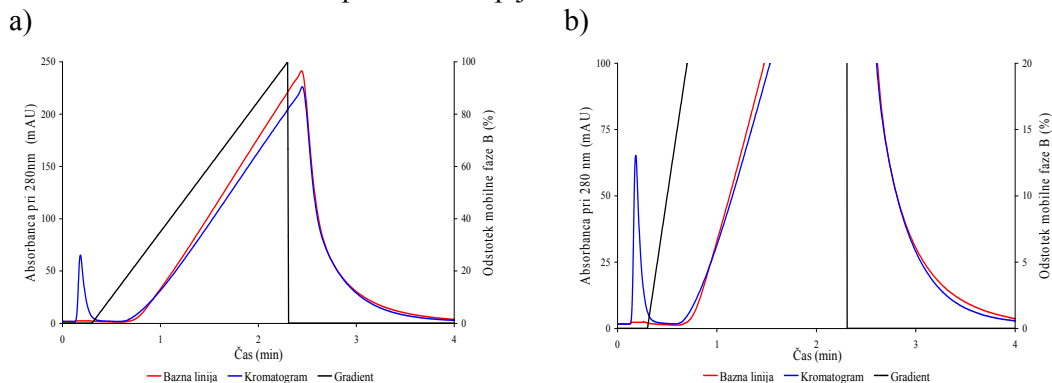
4.1.6.2 Uporaba mobilne faze B<sub>1</sub> in B<sub>2</sub>

Mobilna faza B<sub>1</sub> vsebuje imidazol (20 mM raztopina). Prisotnost manjše koncentracije imidazola stimulira vezavo proteinov. Mobilna faza B<sub>2</sub> vsebuje več imidazola (250 mM raztopina). Vrednost pH obeh mobilnih faz je 7,4. Na nosilec smo nanесли mobilno fazo B<sub>1</sub> in tako dobili odziv mobilnih faz na nosilcu (slika 10a) in standardni fosforilirani protein raztopljen v mobilni fazi B<sub>1</sub> (slika 10b).



Slika 10: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne B<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4) in elucijske mobilne faze B<sub>2</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4); volumen vezne faze B<sub>1</sub> 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min; b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina ( $c = 1$  mg/mL) v mobilni fazi B<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4); volumen nanesenega vzorca 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min

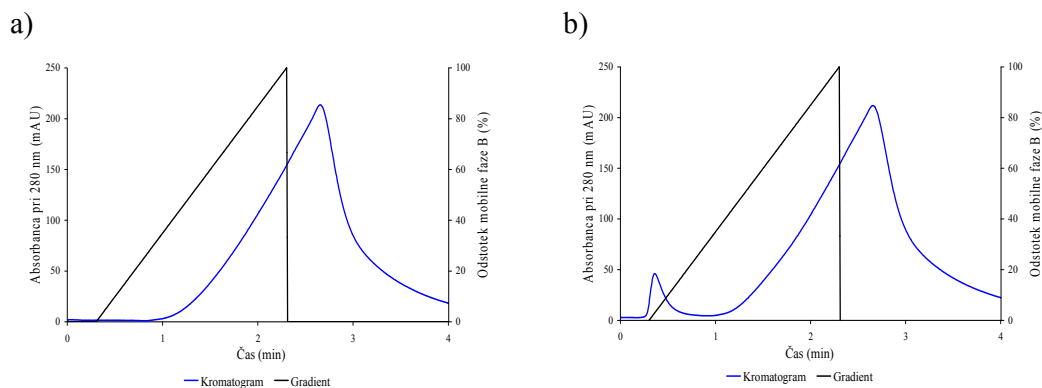
Na sliki 11 je prikazana primerjava: na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilec smo nanесли mobilno fazo B<sub>1</sub> in standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi B<sub>1</sub>.



Slika 11: a) Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi B<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4). Vezna mobilna faza je 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4, elucijska mobilna faza je 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4. Volumen nanesenega vzorca 10  $\mu$ L; pretok 3 mL/min; b) Povečana slika 11a

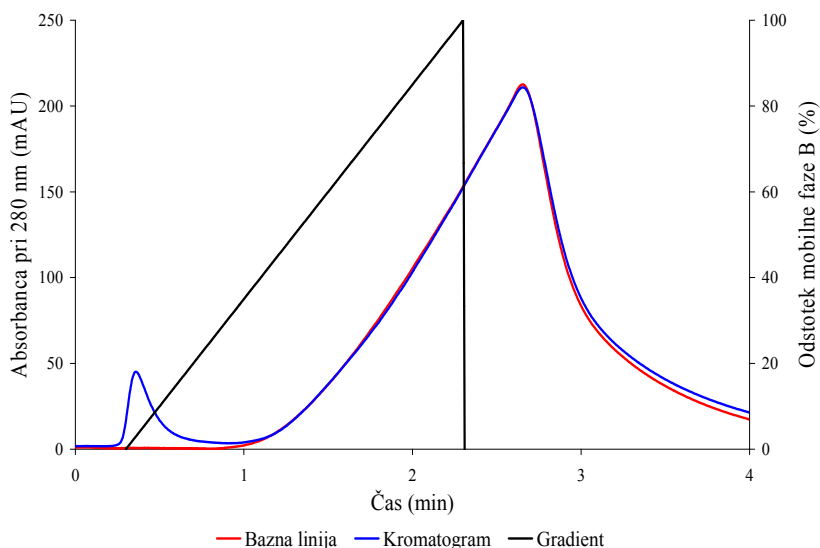
4.1.6.3 Uporaba mobilne faze C<sub>1</sub> in C<sub>2</sub>

Standardni fosforiliran protein se v mobilni fazi A<sub>1</sub> in B<sub>1</sub> pri pH 7,4 ni vezal na nosilec, zato smo spremenili pH vrednost mobilne faze C<sub>1</sub> na pH 7,1. Na nosilec smo nanесли mobilno fazo C<sub>1</sub> in tako dobili odziv mobilnih faz na nosilcu (slika 12a) in standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi C<sub>1</sub> (slika 12b).



Slika 12: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne C<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,1) in elucijske mobilne faze C<sub>2</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,1); volumen vezne faze C<sub>1</sub> 10 μL, pretok 3 mL/min; b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi C<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,1); volumen nanesenega vzorca 10 μL, pretok 3 mL/min

Na sliki 13 je prikazana primerjava: na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilec smo nanесли mobilno fazo C<sub>1</sub> in standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi C<sub>1</sub>.

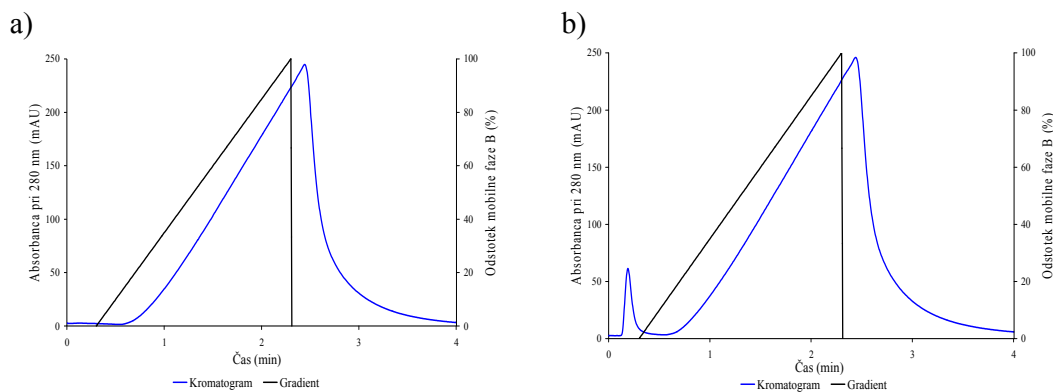


Slika 13: Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi C<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,1). Vezna mobilna faza je 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,1, elucijska mobilna faza je 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,1. Volumen nanesenega vzorca 10 μL; pretok 3 mL/min



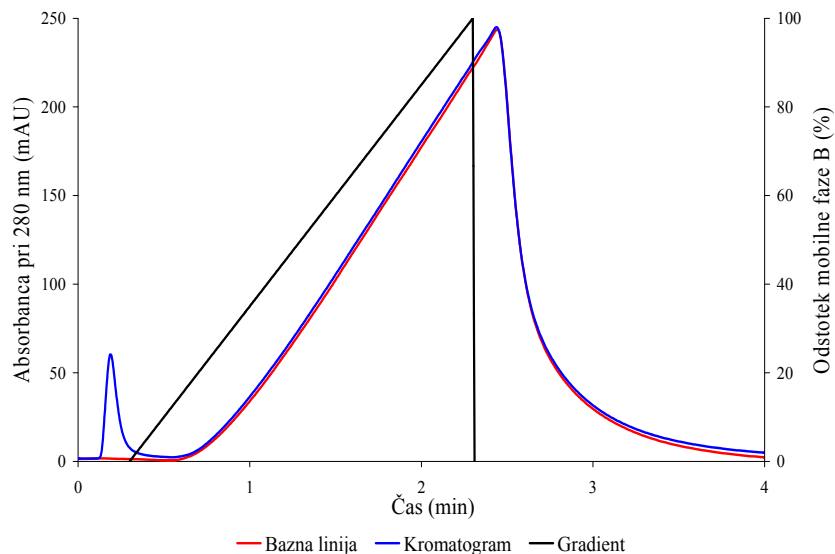
4.1.6.4 Uporaba mobilne faze D<sub>1</sub> in D<sub>2</sub>

V mobilni fazi D<sub>1</sub> smo uporabili imidazol (20 mM raztopina) pri vrednosti pH 7,1. Na nosilec smo nanesti mobilno fazo D<sub>1</sub> in tako dobili odziv mobilnih faz na nosilcu (slika 14a). Nato smo na nosilec nanesti standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi D<sub>1</sub> (slika 14b).



Slika 14: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne D<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,1) in elucijske mobilne faze D<sub>2</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,1); volumnen vezne faze D<sub>1</sub> 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min; b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi D<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,1); volumnen nanesenega vzorca 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min

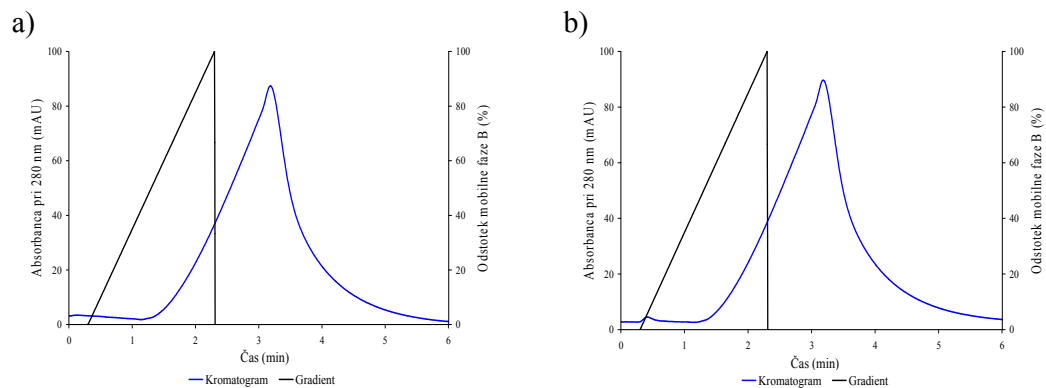
Na sliki 15 je prikazana primerjava: na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilec smo nanesti mobilno fazo D<sub>1</sub> in standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi D<sub>1</sub>.



Slika 15: Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi D<sub>1</sub> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,1). Vezna mobilna faza je 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,1, elucijska mobilna faza je 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,1. Volumnen nanesenega vzorca 10  $\mu$ L; pretok 3 mL/min

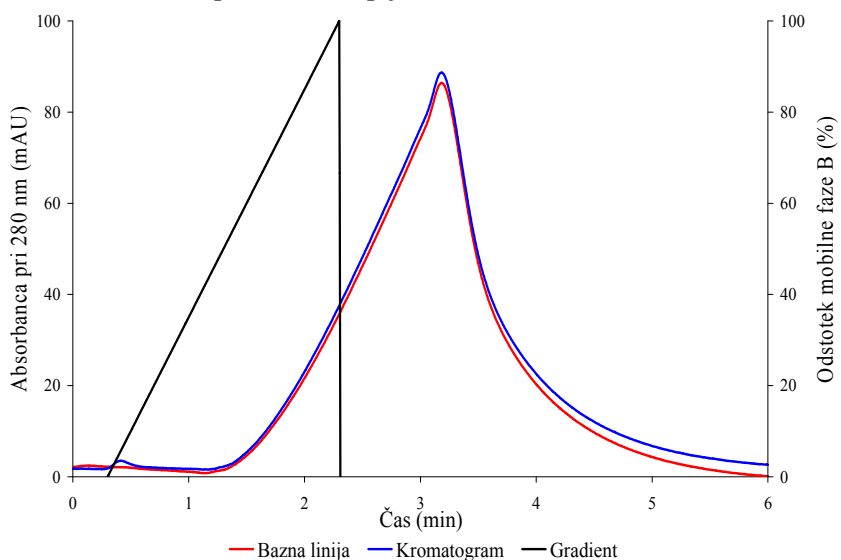
4.1.6.5 Uporaba mobilne faze E<sub>1</sub> in E<sub>2</sub>

Predpostavili smo, da se standardni fosforiliran protein ne veže na nosilec zaradi prisotnosti fosfatnih skupin v veznih mobilnih fazah. Uporabili smo drugo vezno mobilno fazo in sicer 20 mM Tris, 0,5M NaCl, pH 7,4. Na nosilec smo nanесли mobilno fazo E<sub>1</sub> in tako dobil odziv mobilnih faz na nosilcu (slika 16a) in standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi E<sub>1</sub> (slika 16b).



Slika 16: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne E<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) in elucijske mobilne faze E<sub>2</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 100 mM imidazol, pH 7,4); volumen vezne faze E<sub>1</sub> 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min; b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina ( $c = 1$  mg/mL) v mobilni fazi E<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4); volumen nanesenega vzorca 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min

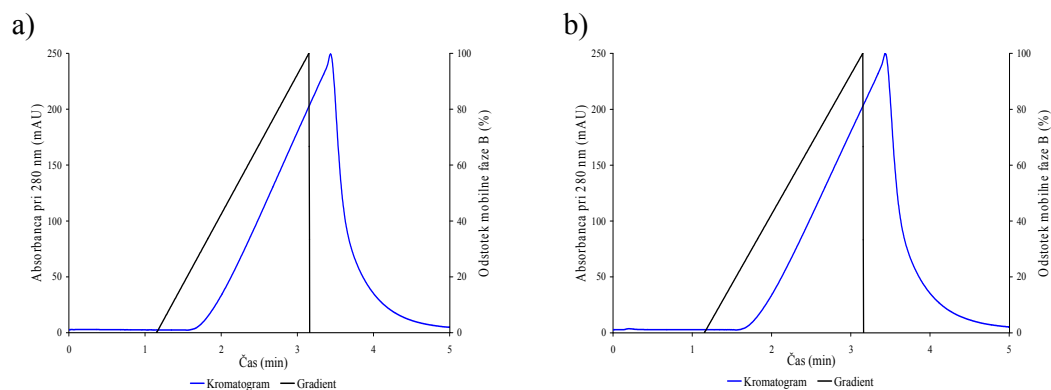
Na sliki 17 je prikazana primerjava: na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilec smo nanесли mobilno fazo E<sub>1</sub> in standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi E<sub>1</sub>.



Slika 17: Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi E<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4). Vezna mobilna faza je 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4, elucijska mobilna faza je 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 100 mM imidazol, pH 7,4. Volumen nanesenega vzorca je 10  $\mu$ L; pretok 3 mL/min

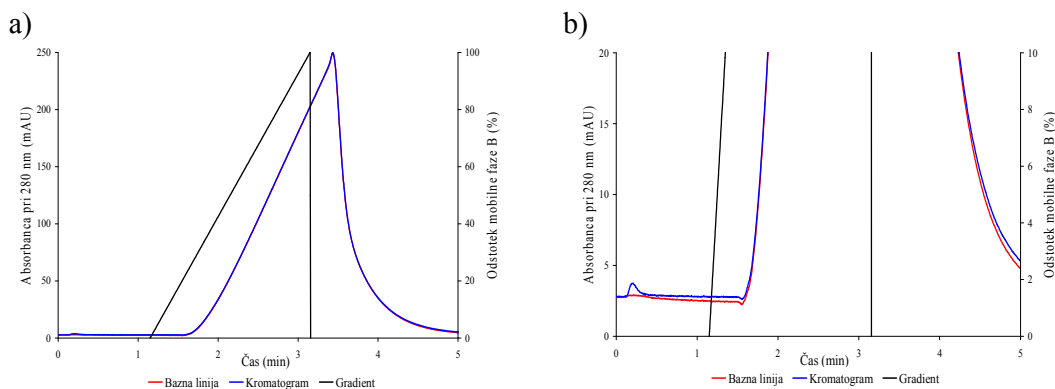
4.1.6.6 Uporaba mobilne faze F<sub>1</sub> in F<sub>2</sub>

Po vezavi standardnega fosforiliranega proteina na nosilec je sledil drugi korak, v katerem smo protein eluirali z nosilca. Uporabili smo imidazol (250 mM raztopino) v mobilni fazi F<sub>2</sub> pri vrednosti pH 7,4. Na nosilec smo nanegli mobilno fazo F<sub>1</sub> in tako dobil odziv mobilnih faz na nosilcu (slika 18a) in standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi F<sub>1</sub> (slika 18b).



Slika 18: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne F<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) in elucijske mobilne faze F<sub>2</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4); volumen vezne faze F<sub>1</sub> 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min; b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina ( $c = 1$  mg/mL) v mobilni fazi F<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4); volumen nanesenega vzorca 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min

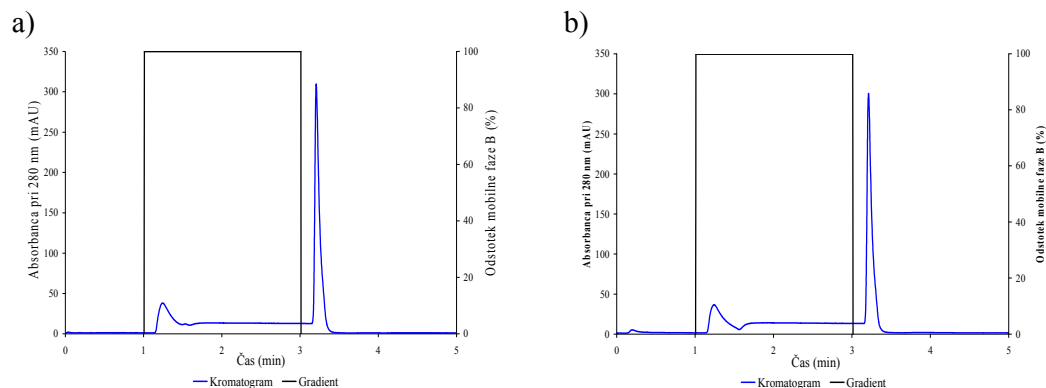
Na sliki 19 je prikazana primerjava: na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilec smo nanegli mobilno fazo F<sub>1</sub> in standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi F<sub>1</sub>.



Slika 19: a) Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi F<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4). Vezna mobilna faza je 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4, elucijska mobilna faza je 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4. Volumen nanesenega vzorca 10  $\mu$ L; pretok 3 mL/min; b) Povečana slika 19a

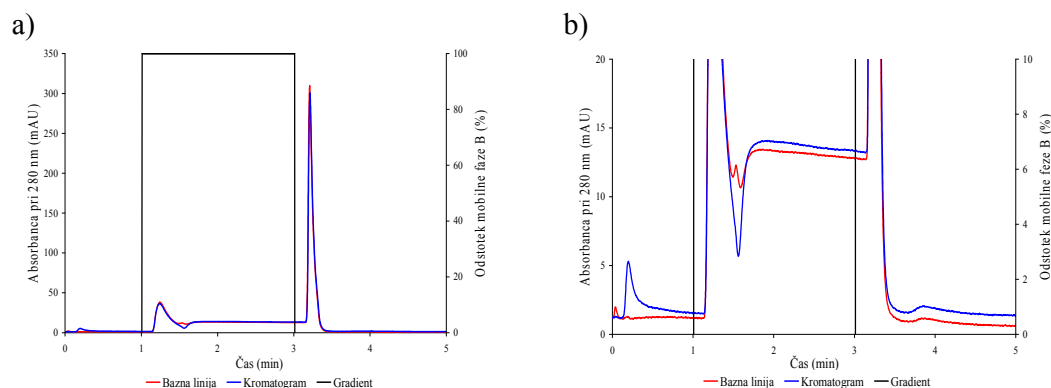
4.1.6.7 Uporaba mobilne faze G<sub>1</sub> in G<sub>2</sub>

Pri mobilni fazi G<sub>2</sub> smo uporabili pH gradient. Standardni fosforiliran protein smo raztopili v 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Za mobilno fazo G<sub>2</sub> smo uporabili 100 mM glicin, pH 3,0. Na nosilec smo nanegli mobilno fazo G<sub>1</sub> in tako dobili odziv mobilnih faz na nosilcu (slika 20a) in standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi G<sub>1</sub> (slika 20b).



Slika 20: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne G<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) in elucijske mobilne faze G<sub>2</sub> (100 mM glicin, pH 3,0); volumen vezne faze G<sub>1</sub> 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min; b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi G<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4); volumen nanesenega vzorca 10  $\mu$ L, pretok 3 mL/min

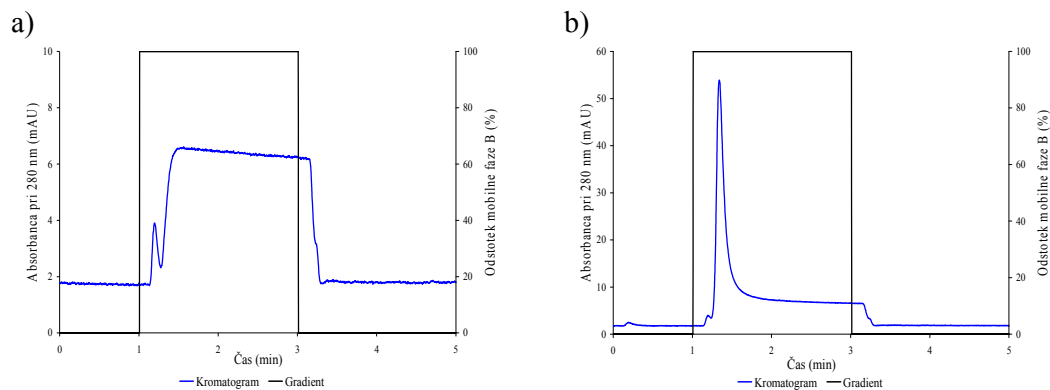
Na sliki 21 je prikazana primerjava: na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilec smo nanegli mobilno fazo G<sub>1</sub> in standardni fosforiliran protein raztopljen v mobilni fazi G<sub>1</sub>.



Slika 21: a) Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiliranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi G<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4). Vezna mobilna faza je 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4, elucijska mobilna faza je 100 mM glicin, pH 3,0. Volumen nanesenega vzorca 10  $\mu$ L; pretok 3 mL/min; b) Povečana slika 21a

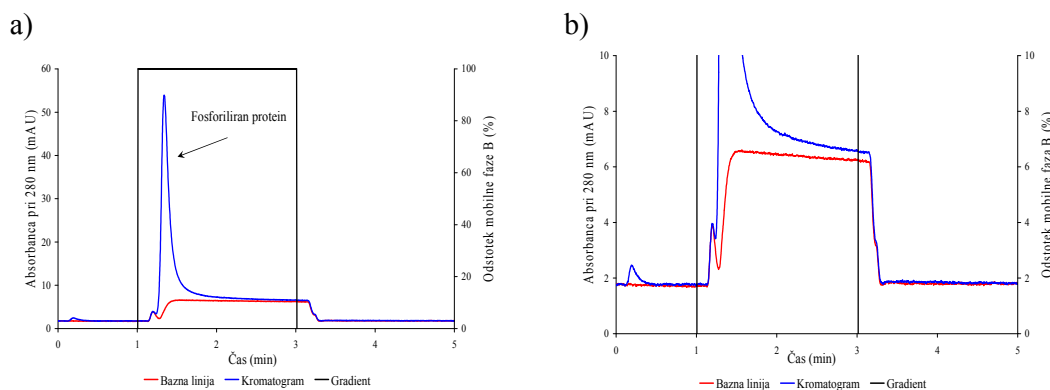
4.1.6.8 Uporaba mobilne faze H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub>

Pri mobilni fazi H<sub>2</sub> smo uporabili pH gradient. Standardni fosforilirani protein smo raztopili v 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Za mobilno fazo H<sub>2</sub> smo uporabili 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 9,6. Na nosilec smo nanesti mobilno fazo H<sub>1</sub> in tako dobili odziv mobilnih faz na nosilcu (slika 22a) in standardni fosforilirani protein raztopljen v mobilni fazi H<sub>1</sub> (sliki 22b).



Slika 22: a) Začetni kromatogram (bazna linija) vezne H<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4) in elucijske mobilne faze H<sub>2</sub> (20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 9,6); volumen vezne faze H<sub>1</sub> 10 µL, pretok 3 mL/min; b) Kromatogram raztopljenega standardnega fosforiranega proteina beta-kazeina (c = 1 mg/mL) v mobilni fazi H<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4); volumen nanesenega vzorca 10 µL, pretok 3 mL/min

Na sliki 23 je prikazana primerjava: na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilcu smo nanesti mobilno fazo H<sub>1</sub> in standardni fosforilirani protein raztopljen v mobilni fazi H<sub>1</sub>.



Slika 23: a) Primerjava začetnega kromatograma (bazne linije) in kromatograma raztopljenega standardnega fosforiranega proteina beta-kazeina v mobilni fazi H<sub>1</sub> (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4). Vezna mobilna faza je 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4, elucijska mobilna faza je 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 9,6. Volumen nanesenega vzorca 10 µL; pretok 3 mL/min; b) Povečana slika 23a

#### 4.1.7 Določanje kapacitete za proteine na kromatografskih nosilcih

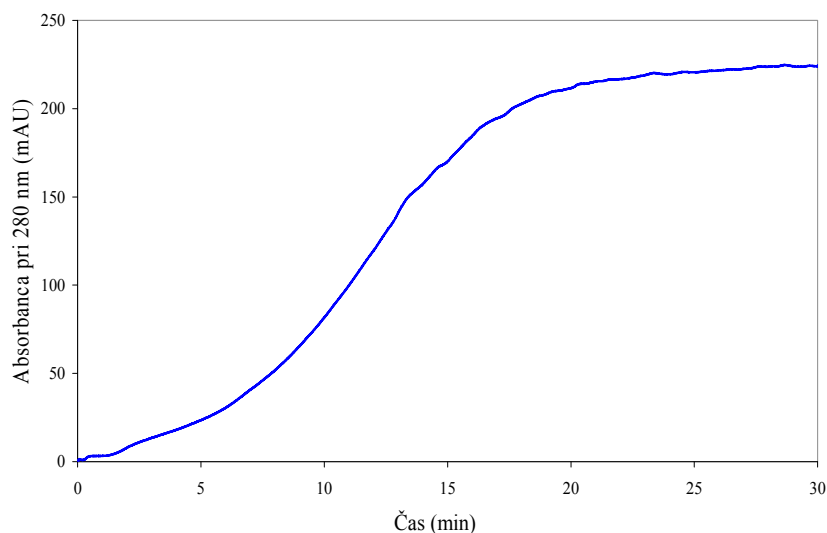
Pomembna karakteristika nosilca je njegova dinamična kapaciteta, saj nam pove, koliko spojine (proteina, DNA) lahko vežemo na nosilec. Kapaciteto za protein smo določali iz prebojne krivulje. Monolitni in delčni nosilec smo najprej spirali z vezno mobilno fazo 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Signal na detektorju je vedno dosegel konstantno vrednost. Nato smo prek nosilca pričeli črpati raztopino standardnega fosforiliranega proteina. Iz prebojne krivulje, ki se je izrisala na kromatogramu, smo odčitali čas pri 50 % preboju. Dinamično kapaciteto smo izračunali po enačbi 2 (poglavje 3.3.1.1).

##### 4.1.7.1 Kapaciteta za protein na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu

Koncentracija standardnega fosforiliranega proteina je bila 0,51 mg/mL. Raztopino proteina smo nalagali na nosilec pri pretoku 1 mL/min. Zaradi nihanj v pretoku na HPLC sistemu smo merili dejanski pretok preko nosilca. V časovni enoti smo merili pretečen volumen. Kapaciteto za protein smo izračunali po enačbi 2 (poglavje 3.3.1.1). Podatki so zbrani v preglednici 16. Na sliki 24 je prikazana prebojna krivulja standardnega fosforiliranega proteina na monolitnem nosilcu.

Preglednica 16: Kapaciteta za protein na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilcu

Koncentracija (mg/mL)	Izmerjen pretok (mL/min)	Odčitani t <sub>50%</sub> (min)	Kapaciteta (mg/mL)
0,51	1,085	11,685	18,5



Slika 24: Prebojna krivulja standardnega fosforiliranega proteina na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilcu

Ker je za monolitne nosilce značilno, da je kapaciteta nosilca od pretoka neodvisna, smo naredili še kapacitete za protein pri različnih pretokih. Podatki so zbrani v preglednici 17. Kapacitete za protein se z večanjem pretoka manjša.

Preglednica 17: Kapaciteta za protein pri različnih pretokih na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilcu

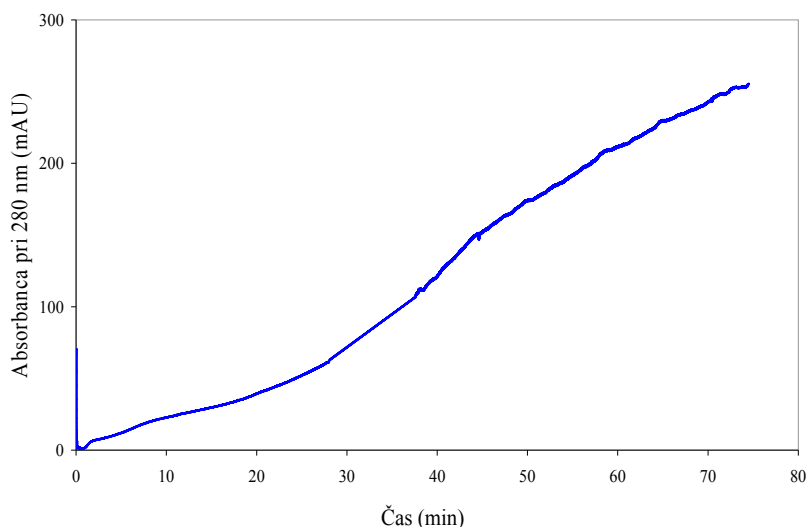
Koncentracija (mg/mL)	Izmerjen pretok (mL/min)	Odčitani t <sub>50%</sub> (min)	Kapaciteta (mg/mL)
0,51	1,07	11,64	18,1
0,50	2,30	5,06	16,5
0,51	4,33	2,04	12,6

#### 4.1.7.2 Kapaciteta za protein na HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> delčnem nosilcu

Koncentracija standardnega fosforiliranega proteina je bila 0,915 mg/mL. Raztopino proteina smo nalagal na nosilec pri pretoku 1 mL/min. Zaradi nihanj v pretoku na HPLC sistemu smo merili dejanski pretok preko nosilca. V časovni enoti smo merili pretečen volumen. Podatki so zbrani v preglednici 18. Na sliki 25 je prikazana prebojna krivulja standardnega fosforiliranega proteina na delčnem nosilcu.

Preglednica 18: Kapaciteta za protein na HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> nosilcu

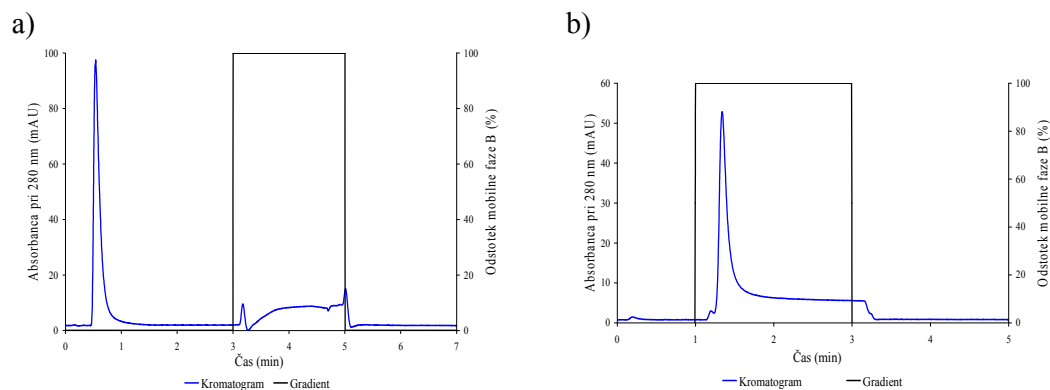
Koncentracija (mg/mL)	Izmerjen pretok (mL/min)	Odčitani t <sub>50%</sub> (min)	Kapaciteta (mg/mL)
0,915	1,05	40,82	38,5

Slika 25: Prebojna krivulja standardnega fosforiliranega proteina na HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> nosilcu

#### 4.1.8 Preverjanje razvite metode s standardnimi proteini

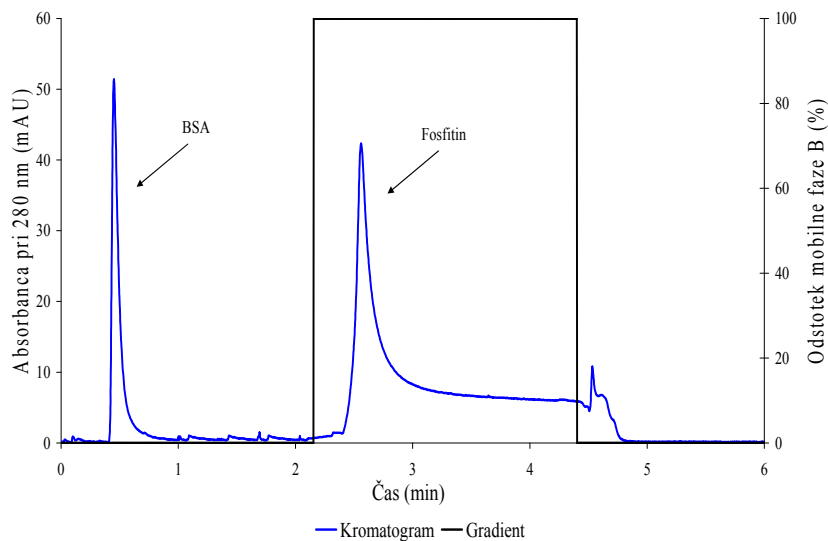
Ko smo CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnemu nosilcu določili lastnosti (kapaciteta kovinskega iona, kapaciteta za protein) in na njem razvili metodo za vezavo in elucijo fosforiliranega proteina, smo preverili uspešnost metode s selektivno ločbo različnih standardnih fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov. Pripravili smo si raztopino nefosforiliranega proteina (BSA) in fosforiliranega proteina (fosfitin) s koncentracijo 1 mg/mL. Raztopili smo ju v vezni mobilni fazi 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Na pripravljen CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec smo nanegli posamezen protein. Slika 26a

prikazuje nanos nefosforiliranega proteina, slika 26b prikazuje nanos in vezavo fosforiliranega proteina.



Slika 26: a) Kromatogram nefosforiliranega proteina BSA ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) raztopljenega v vezni mobilni fazi H<sub>1</sub> 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Volumen nanesenega vzorca 10  $\mu\text{L}$ ; pretok 3 mL/min; b) Kromatogram vezave standardnega fosforiliranega proteina fosfitina ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) raztopljenega v vezni mobilni fazi H<sub>1</sub> 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Volumen nanesenega vzorca je 10  $\mu\text{L}$ ; pretok 3 mL/min

Pripravili smo raztopino BSA in fosfitina s koncentracijo 0,5 mg/mL ter ju zmešal skupaj. Na nosilec CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> smo nanesli vzorec in preverili selektivnost monolitnega nosilca. Selektivna ločba je prikazana na sliki 27.



Slika 27: Kromatogram selektivna ločbe fosforiliranega (fosfitin,  $c = 0,5 \text{ mg/mL}$ ) od nefosforiliranega (BSA,  $c = 0,5 \text{ mg/mL}$ ) proteina na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu. BSA ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) in fosfitin ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) smo raztopili v vezni mobilni fazi H<sub>1</sub> 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4 ter ju zmešali skupaj. Volumen nanesenega vzorca (BSA in fosfitin) 10  $\mu\text{L}$ , pretok 3 mL/min



#### 4.1.9 Uporaba razvite metode na monolitnem nosilcu za realni vzorec *S. cerevisiae*

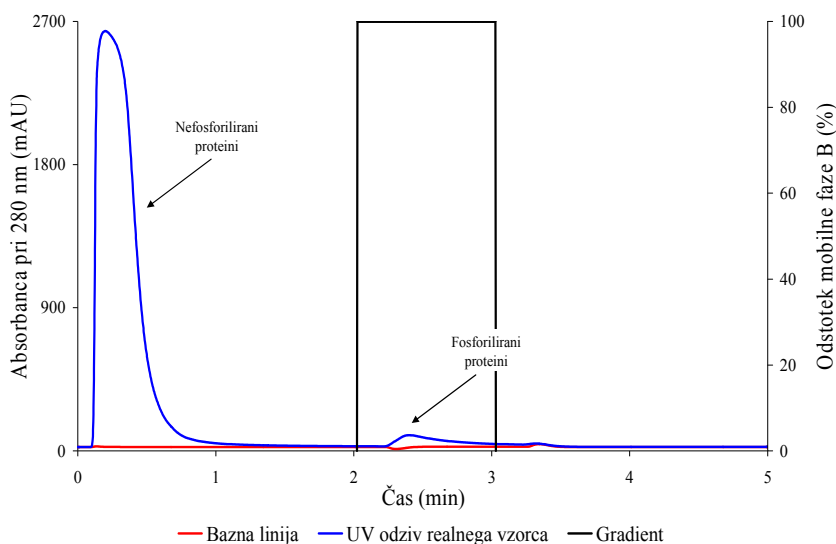
Uporabili smo razvito metodo na standardnih fosforiliranih proteinih pri selektivnem čiščenju realnega vzorca. Za realni vzorec smo uporabili celični ekstrakt kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* s celokupno koncentracijo vodotopnih proteinov 2 g/L, merjeno po metodi Bradford. Priprava vzorca je opisana pod točko 3.2.2.

Vzorec je bil pripravljen v vezni mobilni fazi 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Za elucijsko mobilno fazo smo uporabili 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 9,6. Volumen vzorca nanesenega na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec je 500 µL.

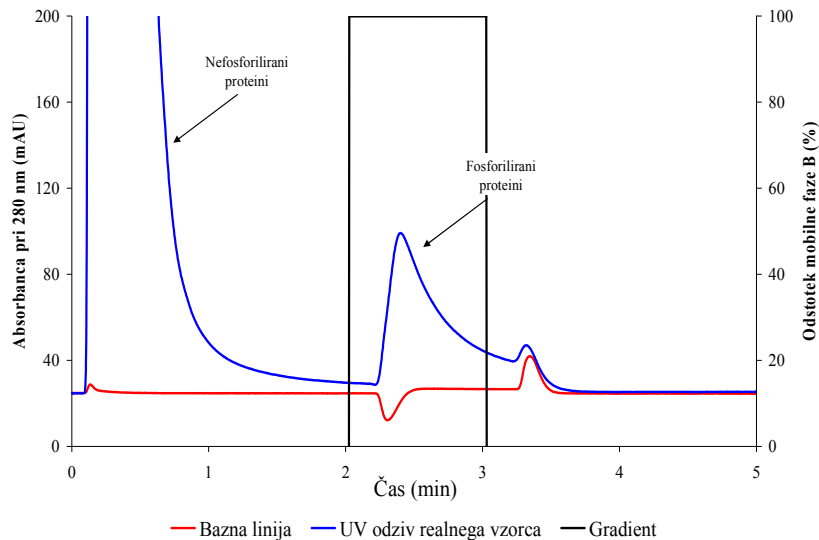
Za potrditev uspešnosti ločevanja fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov z 2-D elektroforezo, smo potrebovali posamezne frakcije proteinov. Za prvi vzorec smo zbrali začetni vzorec celičnega ekstrakta kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* (frakcija 1). Drugi vzorec so nevezani proteini na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilcu (frakcija 2), tretji vzorec so proteini, katere smo eluirali iz CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilca (frakcija 3). V frakciji 2 so nefosforilirani proteini, v frakciji 3 so fosforilirani proteini. Na sliki 28 je prikazana vezava in elucija realnega vzorca s primerjavo glede na bazno linijo (nanesena vezna mobilna faza). Na sliki 29 je prikazana povečava kromatograma frakcije fosforiliranih proteinov. Pregled podatkov je zbran v preglednici 19.

Preglednica 19: Pregled zbranih frakcij kvasnega ekstrakta *Saccharomyces cerevisiae* za 2-D elektroforezo

Oznaka frakcije	Opis frakcije	Volumen nanašanja (µL)
1	Začetni vzorec (pred nanosom na kolono)	500
2	Nefosforilirani proteini	500
3	Fosforilirani proteini	500



Slika 28: Kromatogram selektivnega ločevanja fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov v realnem vzorcu kvasnega ekstrakta *Saccharomyces cerevisiae* na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu. Vzorec pripravljen v vezni mobilni fazi H<sub>1</sub> 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Volumen realnega vzorca 500 µL, pretok 3 mL/min. Vrh 1: nefosforilirani proteini, vrh 2: fosforilirani proteini



Slika 29: Povečava slike 28

## 4.2 2-D ELEKTROFOREZA

### 4.2.1 Določanje koncentracije proteinov v zbranih frakcijah

Zbranim frakcijam smo določili koncentracijo proteinov po metodi Bradford (Bradford, 1976).

### 4.2.2 Čiščenje z »2-D Clean Up« kompletom

V zbranih frakcijah proteinov je prisoten NaCl v koncentraciji 0,5 M, ki ostane in lahko ovira postopek izoelektričnega fokusiranja. Zato smo zbrane frakcije predhodno očistili z »2-D Clean Up« kompletom, pri čemer smo oborili proteine, odstranili prisotne nečistoče in proteine nato ponovno raztopili v rehidracijskem pufu. Postopek je opisan pod točko 3.3.3.1.

### 4.2.3 Masa proteinov za nanos na IPG-trakove

Pri 2-D elektroforezi je omejitev glede največjega volumna vzorca in najmanjše koncentracije proteinov v tem volumnu, katere je še možno detektirati na gelu s posameznimi barvili. Na posamezen IPG-trak smo nanesli 60  $\mu\text{g}$  proteinov pobranih v frakcijah 1 in 2, v primeru frakcije 3 smo bili zaradi mase omejeni in je bil nanos le 20  $\mu\text{g}$ . Da so slike 2-D elektroforeze lepo vidne, je priporočljiva masa proteinov v vzorcu 100  $\mu\text{g}$  v 250  $\mu\text{L}$ .

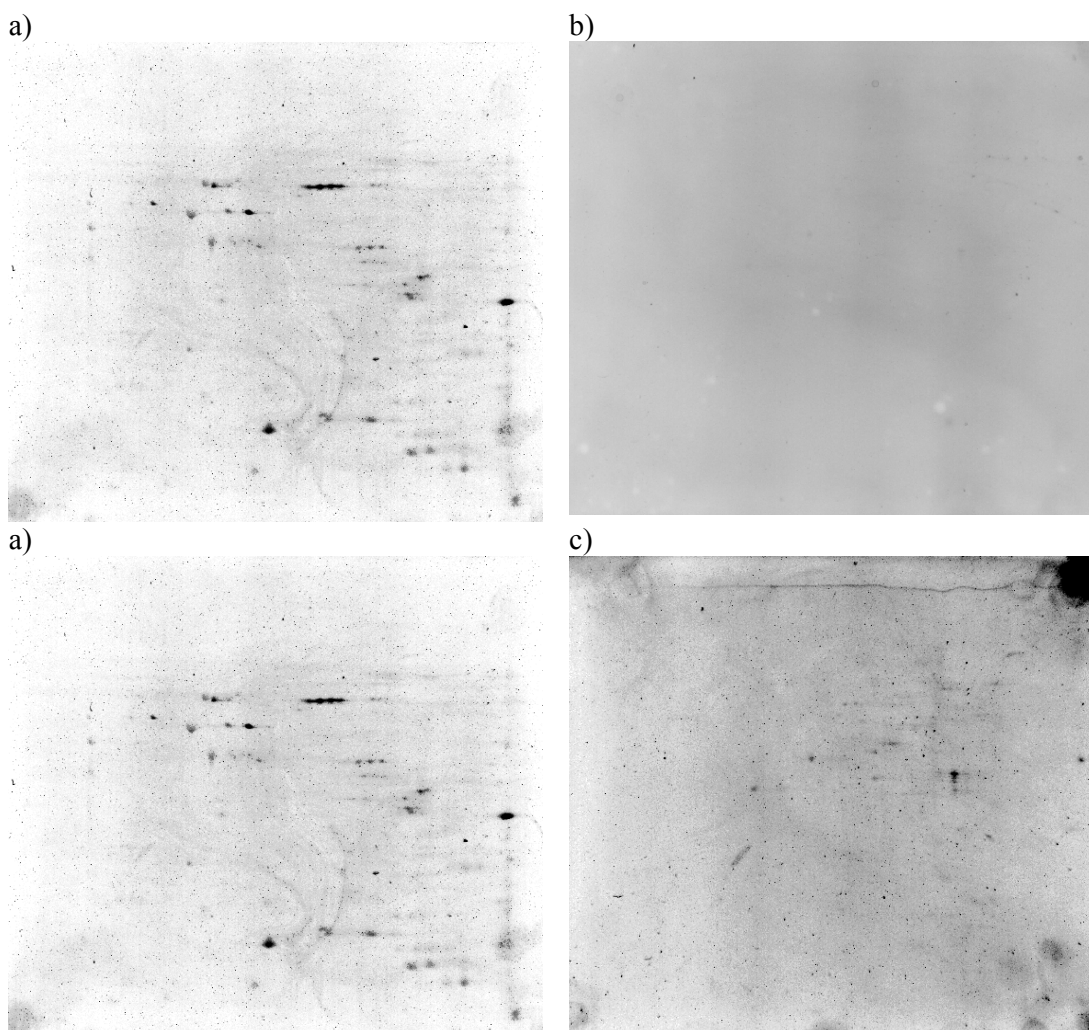
Preglednica 20: Masa proteinov kvasnega ekstrakta *Saccharomyces cerevisiae* v posamezni frakciji

Oznaka frakcije	Koncentracija proteinov ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Končna masa proteinov ( $\mu\text{g}$ ) v 250 $\mu\text{L}$ frakcije
1	2,22	60
2	0,58	60
3	0,08	20

Sledil je nanos vzorca na IPG-trakove (rehidracija), IEF, SDS-PAGE elektroforeza ter postopka barvanja. Vsi postopki so opisani pod poglavji 3.3.3.2., 3.3.3.3. in 3.3.3.4.

#### 4.2.4 Proteinski profili po barvanju z barvilom Pro-Q Diamond

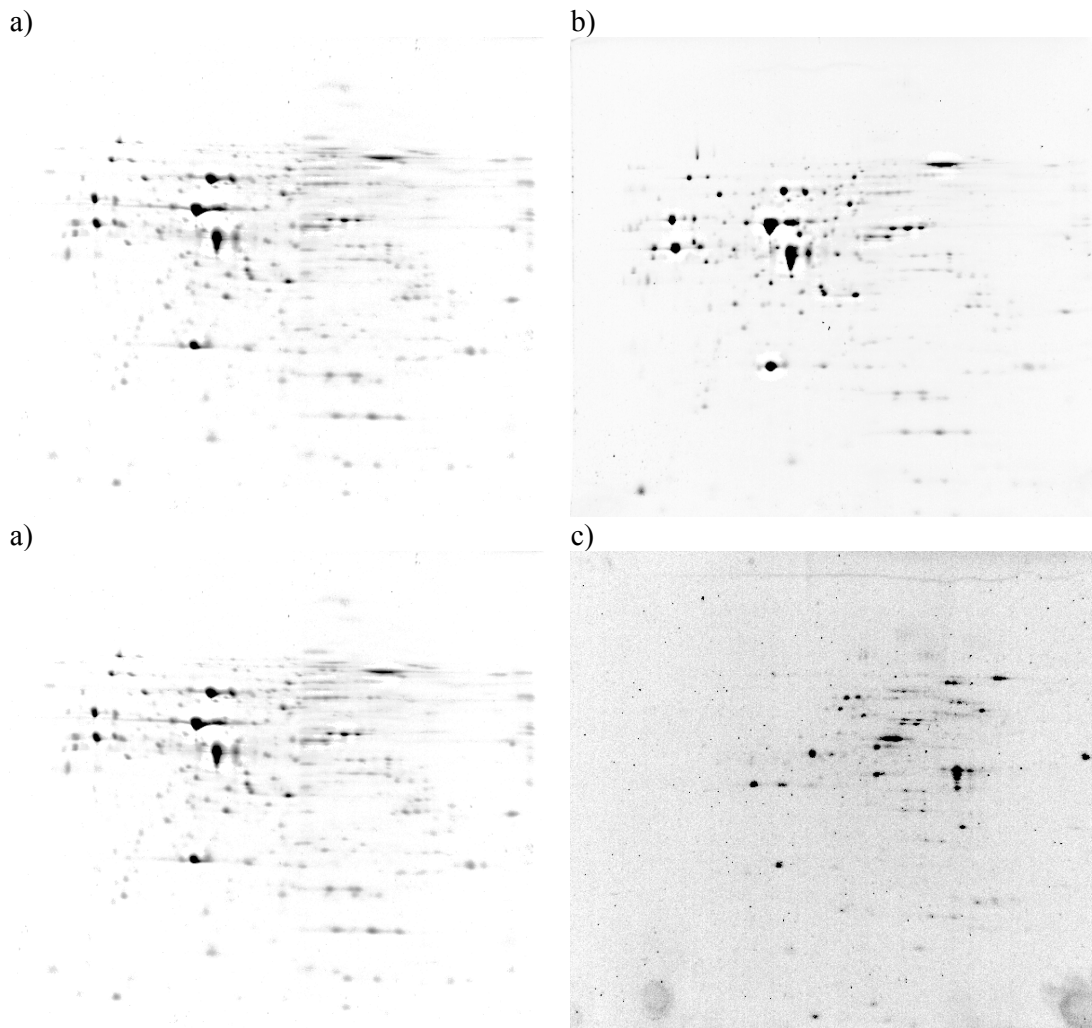
Gele smo barvali najprej z barvilom Pro-Q Diamond ter primerjali proteinski profil frakcije 2 (nefosforilirani proteini) in frakcije 3 (fosforilirani proteini) s frakcijo 1 (začetni realni vzorec). Po barvanju smo gele fotografirali.



Slika 30: a) Proteinski profil kvasnega ekstrakta *Saccharomyces cerevisiae* pred ločbo na nosilcu (frakcija 1) barvan z barvilom Pro-Q Diamond; b) Proteinski profil nefosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 2) barvan z barvilom Pro-Q Diamond; c) Proteinski profil fosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 3) barvan z barvilom Pro-Q Diamond

#### 4.2.5 Proteinski profili po barvanju z barvilom Sypro Ruby

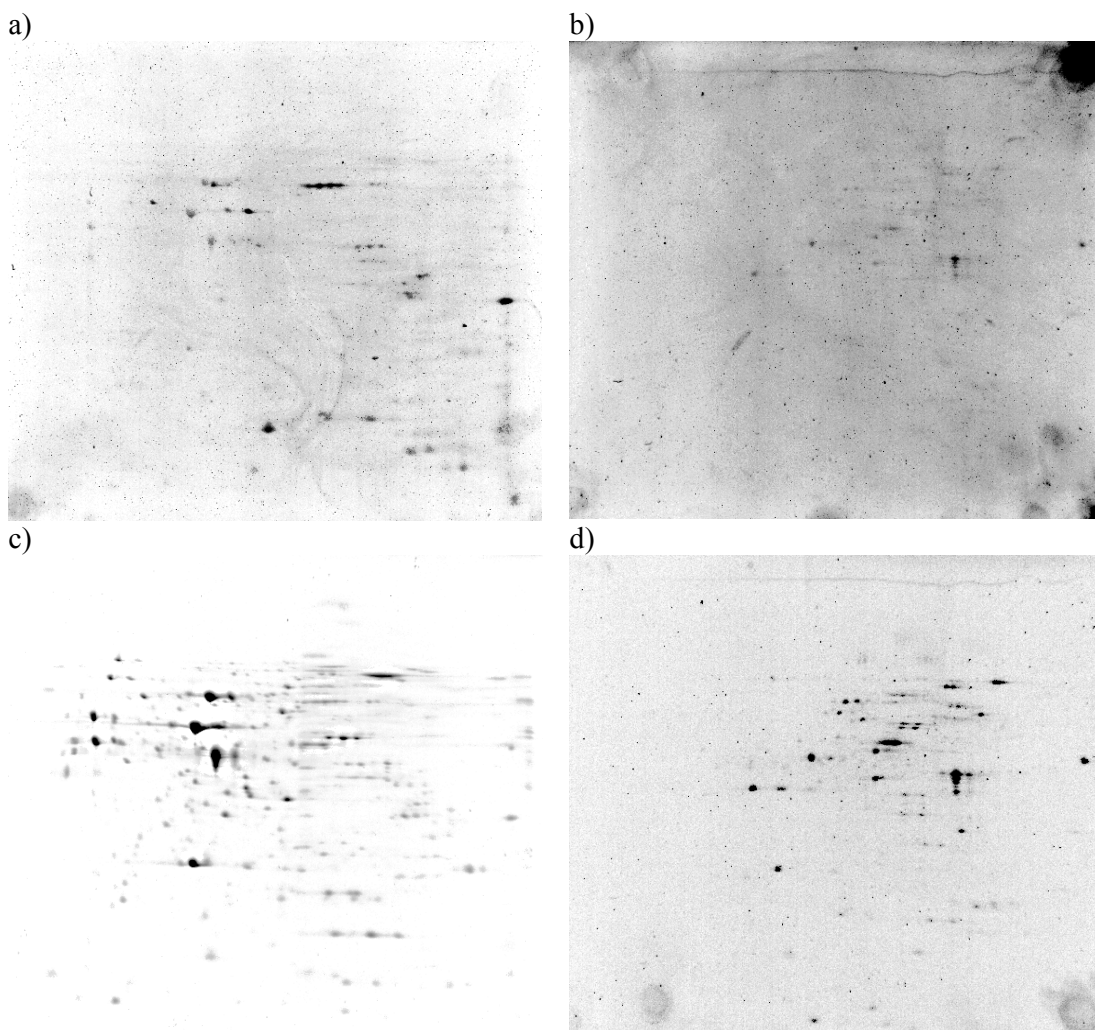
Po barvanju s Pro-Q Diamond smo gele barvali še s fluorescentnim barvilom Sypro Ruby. Je bolj občutljivo od barvila Pro-Q Diamond, vendar je manj specifično, saj se veže v ogrodje proteinov. Po barvanju smo gele fotografirali.



Slika 31: a) Proteinski profil kvasnega ekstrakta *Saccharomyces cerevisiae* pred ločbo na nosilcu (frakcija 1) barvan z barvilom Sypro Ruby; b) Proteinski profil nefosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 2) barvan z barvilom Sypro Ruby; c) Proteinski profil fosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 3) barvan z barvilom Sypro Ruby

#### 4.2.6 Primerjava gelov barvanih z različnimi barvili

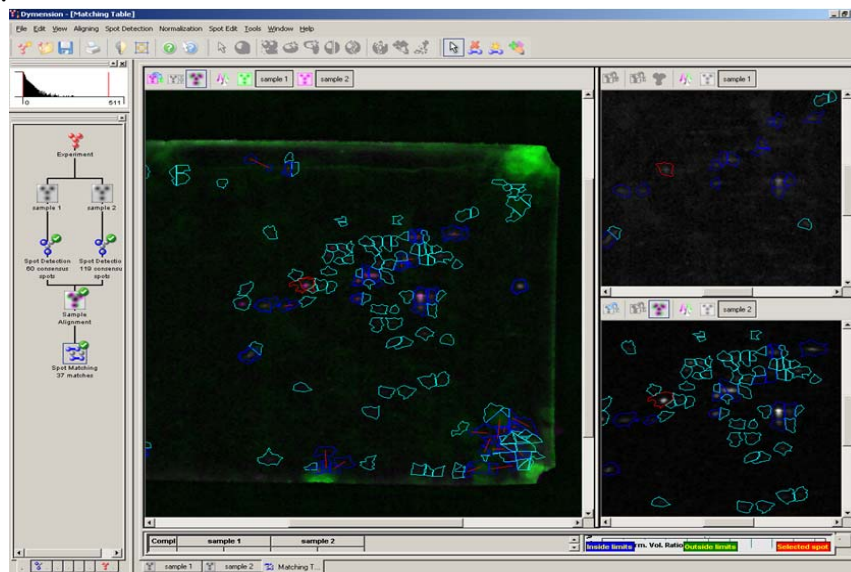
Pro-Q Diamond je selektivno barvilo in se veže na fosforilirane proteine. Sypro Ruby je občutljivejše barvilo in se veže na ogrodje proteinov. Slika 32a prikazuje proteinski profil fosforiliranih proteinov v frakciji 1, barvanih z barvilom Pro-Q Diamond. Slika 32c prikazuje proteinski profil vseh proteinov v frakciji 1, barvanih z barvilom Sypro Ruby. Slika 32b prikazuje proteinski profil fosforiliranih proteinov v frakciji 3, barvanih z barvilom Pro-Q Diamond. Slika 32d prikazuje proteinski profil vseh proteinov v frakciji 3, barvanih z barvilom Sypro Ruby.



Slika 32: a) Proteinski profil kvasnega ekstrakta *Saccharomyces cerevisiae* pred ločbo na nosilcu (frakcija 1) barvan z barvilom Pro-Q Diamond; b) Proteinski profil fosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 3) barvan z barvilom Pro-Q Diamond; c) Proteinski profil začetnega vzorca pred ločbo na nosilcu (frakcija 1) barvan z barvilom Sypro Ruby; d) Proteinski profil fosforiliranih proteinov po ločbi na nosilcu (frakcija 3) barvan z barvilom Sypro Ruby

#### 4.2.7 Ovrednotenje fosforiliranih proteinov s programom 2-D Dymension

S programom 2-D Dymension smo ovrednotili gel, kjer je frakcija fosforiliranih proteinov. Gel smo najprej barvali z barvilom Pro-Q Diamond, nato z barvilom Sypro Ruby. V program 2-D Dymension smo vnesli obe sliki ter ju prekrili in tako določili lise, ki se prekrivajo (temno modro obrobljene lise). Te nakazujejo prisotnost fosforiliranih proteinov.



Slika 33: Primerjava gela fosforiliranih proteinov (frakcija 3) barvanega s Pro-Q Diamond in Sypro Ruby. Temno modro obrobljene lise prikazujejo ujemanje in prekrivanje lis fosforiliranih proteina na gelu.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Fosforilirani proteini se v celicah nahajajo v zelo majhnih koncentracijah. S klasičnimi postopki obarjanja se lahko proteini, ki so v manjših koncentracijah, izgubijo iz vzorca. Zato smo želeli na CIM<sup>®</sup> monolitnih nosilcih postaviti hitro in selektivno metodo za koncentracijo fosforiliranih proteinov v vzorcu. Učinkovitost metode smo želeli potrditi z 2-D elektroforezo, kjer smo gele barvali s selektivnimi fluorescentnimi barvili.

#### 5.1.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija

##### 5.1.1.1 Karakterizacija kapacitete na kovinski ion na kromatografskih nosilcih

Pomembna karakteristika nosilca je njegova dinamična kapaciteta, saj nam pove, koliko spojine (kovinski ion, protein) lahko vežemo na nosilec. Proteini, ki so fosforilirani, imajo na določenih aminokislinah vezane fosfatne skupine. Te imajo tudi sposobnost koordinativne vezave. Potrebno je bilo izbrati ustrezen kromatografski nosilec. Odločili smo se za CIM<sup>®</sup> IDA monolitni nosilec, ker ima v svoji osnovni strukturi imobilizirano iminodiocetno kislino, ki tvori komplekse s kovinskimi ioni. Za fosforilirane proteine pa so že Porath in sodelavci (1975) dokazali, da se koordinativno vežejo z železovimi ioni. Na ta način smo izbrali monolitni nosilec in centralni atom.

Zaradi že poznanega postopka (Porath, 1992) imobilizacije bakrovih in nikljevih ionov na CIM<sup>®</sup> IDA monolitni nosilec in njihovega spiranja, smo ponovili postopek imobilizacije in spiranja le teh ter preverili njihove kapacitete za kovinske ione. Za CIM<sup>®</sup> IDA Cu<sup>2+</sup> monolitni nosilec je kapaciteta nosilca znašala okoli 25  $\mu\text{mol/mL}$  (preglednica 11). Za CIM<sup>®</sup> IDA Ni<sup>2+</sup> monolitni nosilec je kapaciteta nosilca znašala okoli 17  $\mu\text{mol/mL}$  (preglednica 12). Kovinske ione smo odstranili z nosilca s črpanjem 1 M raztopine HCl preko nosilca.

Železov(III) klorid smo raztopili v 0,01 M raztopini HCl. Pri nižji pH vrednosti smo se izognili tvorbi kovinskih hidroksidov. S tem smo dobili stabilno raztopino železovih ionov pri sobni temperaturi. Ker je količina proteinov, ki se bo vezala na nosilec, odvisna od količine imobiliziranih kovinskih ionov na nosilcu, smo določili kapaciteto za železove ione na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu. V povprečju je dosegla vrednosti 26  $\mu\text{mol/mL}$  (preglednica 13). Ione železa smo z nosilca odstranili s črpanjem 1 M raztopine HCl preko nosilca. Železovi ioni se močneje vežejo v kompleks z iminodiocetno kislino kot bakrovi ali nikljevi ioni. Po spiranju nosilca z 1 M raztopino HCl so kovinski ioni železa ostali še vedno vezani na nosilec (obarvan nosilec). Za popolno odstranitev železovih ionov iz matriksa nosilca smo pustili nosilce preko noči v 1 M raztopini HCl.

Adsorpcijska izoterma nam opisuje ravnotežje med kovinskimi ioni v mobilni fazi in veznimi mesti na površini stacionarne faze. Iz slik 3, 4 in 5 je razvidno, da je ravnotežje pomaknjeno k stacionarni fazi. To pomeni, da je večja adsorpcija kovinskih ionov na površino stacionarne faze kot desorpcija. Prav tako ostane ravnotežje pomaknjeno k

stacionarni fazi, ne glede na hitrost pretoka mobilne faze. Slika 6, preglednica 14 in komentar v poglavju 4.1.4 kažejo na neodvisnost kapacitete nosilca za železove ione od pretoka.

Za primerjavo s konkurenčnimi nosilci smo izbrali kelatni HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> nosilec proizvajalca GE Healthcare, ki smo mu prav tako določili kapaciteto za železove ione. V povprečju je kapaciteta znašala 30  $\mu\text{mol/mL}$  (preglednica 15), kar je nekoliko več kot kapaciteta CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> nosilca.

#### 5.1.1.2 Razvoj metode na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu

Uporabili smo beta-kazein, ki je standarden fosforiliran protein. Poiskati je bilo potrebno pogoje vezave fosforiliranega proteina na nosilec in pogoje elucije z nosilca. Naredili smo pregled (screening) mobilnih faz. Ker se standardni fosforiliran protein veže koordinativno v kompleks z železovim ionom, smo izločili možne ionske interakcije vzorca z nosilcem tako, da smo v mobilne faze dodali 0,5 M NaCl. Pred nanosom vzorca na nosilec smo naredili pri vsaki kombinaciji mobilnih faz še test vezave mobilnih faz. Dobili smo osnovno stanje nosilca z izbranimi mobilnimi fazami (bazno linijo). Pred vsakim nanašanjem vzorca ali vezne mobilne faze na nosilec, smo nosilec kondicionirali z vezno mobilno fazo do konstantnega signala na detektorju oziroma do vrednosti pH vezne mobilne faze.

Pogosto se za ločevanje bioloških vzorcev uporabljajo fosfatne mobilne faze. Pripravili smo vezno mobilno fazo A<sub>1</sub>: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,4, v kateri smo raztopili protein. Elucijo smo izvedli z gradientom imidazola. Imidazol se v večji koncentraciji pogosto uporablja kot eluent, saj tekmuje z vzorcem za vezavna mesta na nosilcu in na ta način izpodriva vezane proteine. Pripravili smo mobilno fazo A<sub>2</sub>: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4. Protein se v mobilni fazi A<sub>1</sub> ni vezal na nosilec (slika 8b in 9).

Mobilni fazi B<sub>1</sub>: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,4 smo dodali 20 mM imidazol. Uporabili smo elucijsko mobilno fazo B<sub>2</sub>: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4. Prisotnost manjše količine imidazola lahko stimulira vezavo fosforiliranega proteina. Protein se v mobilni fazi B<sub>1</sub> ni vezal na nosilec (slika 10b in 11).

Ker se vzorec pri vrednosti pH 7,4 ni vezal na nosilec, smo spremenili vrednost pH. V mobilni fazi C<sub>1</sub>: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,1 smo raztopili protein. Uporabili smo elucijsko mobilno fazo C<sub>2</sub>: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,1. Protein se v mobilni fazi C<sub>1</sub> ni vezal na nosilec (slika 12b in 13).

V mobilni fazi D<sub>1</sub>: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,1 smo raztopili protein. Uporabili smo elucijsko mobilno fazo D<sub>2</sub>: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,1. Protein se v mobilni fazi D<sub>1</sub> ni vezal na nosilec (slika 14b in 15).

V mobilni fazi s hidrogenfosfatom(V) nismo dosegli vezave fosforiliranega proteina na nosilec. Fosfatne skupine prisotne v mobilni fazi zasedejo vezna mesta na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu. Ker je koncentracija fosfatnih ionov v mobilni fazi večja kot je



koncentracija fosforiliranih proteinov v mobilni fazi, se fosforilirani proteini ne vežejo na nosilec. Tudi če bi se vezali, bi jih fosfatni ioni v mobilni fazi kompetitivno izpodrinili z nosilca. Zato smo uporabili drugo vezno mobilno fazo.

Protein smo raztopili v vezni mobilni fazi E<sub>1</sub>: 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Za elucijsko mobilno fazo pa smo uporabili E<sub>2</sub>: 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 100 mM imidazol, pH 7,4. Ker v mobilni fazi ni bilo več fosfatnih ionov, se je protein vezal na nosilec (slika 16b). V elucijski mobilni fazi E<sub>2</sub> se protein ni eluiral z nosilca (slika 17).

Protein je bil vezan na kromatografski nosilec, vendar ga z imidazolom (100 mM raztopina) nismo odstranili. Za vezno mobilno fazo smo uporabili F<sub>1</sub>: 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Povečali smo koncentracijo imidazola v elucijski mobilni fazi F<sub>2</sub>: 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4. Kljub večji koncentraciji imidazola, se protein ni eluiral z nosilca (slika 19).

Z imidazolom standardnega fosforiliranega proteina nismo odstranili. Pri afinitetni kromatografiji se poleg solnih gradientov, gradientov z imidazolom, uporablja tudi pH gradient za elucijo vezanih proteinov. Vezna mobilna faza je ostala enaka G<sub>1</sub>: 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Za elucijsko mobilno fazo smo uporabili G<sub>2</sub>: 100 mM glicin, pH 3,0. Protein se je vezal na nosilec (slika 20), pri nižji pH vrednosti se ni eluiral z nosilca (slika 21).

Nižja pH vrednost ni vplivala na elucijo proteina, niti ni vplivala na izpiranje kovinskega iona z nosilca. Zato smo v naslednjem koraku uporabili vezno mobilno fazo H<sub>1</sub>: 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4 in za elucijsko mobilno fazo H<sub>2</sub>: 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 9,6. S to elucijsko fazo smo odstranili vezan protein z nosilca (slika 23).

#### 5.1.1.3 Karakterizacija kapacitete za proteine na kromatografskih nosilcih

Poleg kapacitete za kovinski ion smo določili na kromatografskih nosilcih tudi kapaciteto za proteine. Ko smo določili pogoje vezave in elucije fosforiliranega proteina, smo določili še kapaciteto za proteine na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu in HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> delčnem nosilcu. Kapaciteta za proteine je odvisna od kapacitete za imobilizirane kovinske ione. Za CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec je bila kapaciteta za protein 18,5 mg/mL pri konstantnem pretoku 1 mL/min (preglednica 16), za HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> delčni nosilec pa 38,5 mg/mL pri konstantnem pretoku 1 mL/min (preglednica 18).

Preverili smo še vpliv pretoka na kapaciteto za protein na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu. Kapaciteta naj bi bila neodvisna od pretoka mobilne faze. Pri ponovitvi eksperimenta pri pretoku 1 mL/min smo dosegli podobno kapaciteto za protein in sicer 18,1 mg/mL. Pri pretoku 2 mL/min je bila kapaciteta za protein 16,5 mg/mL. Pri pretoku 4 mL/min smo dosegli nižjo kapaciteto in sicer 12,6 mg/mL (preglednica 17). Zmanjšanje kapacitete je možno zaradi uporabe istega standardnega fosforiliranega proteina, katerega smo po posameznem nalaganju čistili (zamenjali mobilno fazo) s PD10 kolono. Možno da je protein beta-kazein izgubil svojo vezavno aktivnost (spremenjena oblika proteina) ali pa je ostalo še nekaj elucijske mobilne faze v vezni mobilni fazi.

#### 5.1.1.4 Selektivna separacija fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov

Za preizkus selektivnosti smo pripravili mešano raztopino fosforiliranega proteina beta-kazeina in nefosforiliranega proteina BSA. Raztopili smo ju v vezni mobilni fazi 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4 in nanесли na kondicioniran CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec. Proteina sta se uspešno ločila (slika 27).

#### 5.1.1.5 Separacija vzorca celičnega ekstrakta kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

Na realnem vzorcu smo hoteli pokazati selektivno ločbo fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu z uporabo razvite metode na standardnih fosforiliranih proteinih. Kvasni ekstrakt je bil pripravljen v mobilni fazi 20 mM Tris 0,5 M NaCl pH 7,4. Na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec smo nanесли 500 µL vzorca. Začetnega vzorca (frakcija 1) nismo filtrirali. Na kromatogramu smo spremljali odziv absorbance in pobrali vrh nefosforiliranih proteinov (frakcija 2) in vrh fosforiliranih proteinov (frakcija 3), katere smo kasneje analizirali z 2-D elektroforezo. Že sama kromatografska ločba je pokazala, da je nosilec delno selektiven (slika 28 in 29).

### 5.1.2 2-D elektroforeza

Da bi bila metoda selektivnega ločevanja hitra, smo hoteli pobrane frakcije brez vmesnih postopkov uporabiti za analizo z 2-D elektroforezo. Vendar je bila v frakcijah prisotna večja količina soli, kar ovira postopek izoelektričnega fokusiranja, ker poveča prevodnost v vzorcu. Zaradi teh omejitev smo predhodno izvedli čiščenje vzorcev z »2-D Clean Up« kompletom, pri čemer smo odstranili prisotne soli in druge neproteinske snovi.

Z izoelektričnim fokusiranjem smo v prvi dimenziji 2-D elektroforeze ločili proteine glede na izoelektrične točke. Z SDS-PAGE v drugi dimenziji smo tako ločene proteine ločili še glede na molekulsko maso. Po končanem postopku SDS-PAGE, smo proteine v gelih fiksirali s fiksacijsko raztopino, sicer lahko proteini difundirajo znotraj gela. Vzporedno pa s fiksacijsko raztopino dosežemo tudi izpiranje nečistoč, ki bi ovirale postopek barvanja.

#### 5.1.2.1 Slike po barvanju z barvilom Pro-Q Diamond

Gele smo po fiksaciji barvali s selektivnim fluorescentnim barvilom Pro-Q Diamond. Le-ta se veže na fosfatne skupine fosforiliranih proteinov. Gele smo slikali in z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension ovrednotili slike. Na sliki 30a in 30c je prikazan proteinski profil frakcije 1, kjer je razvidno, da so prisotni fosforilirani proteini v začetnem vzorcu. Na sliki 30b je prikazan proteinski profil frakcije 2, to so nefosforilirani proteini in jih v gelu z barvilom Pro-Q Diamond nismo zaznali. Na sliki 30c je prikazan proteinski profil frakcije 3, to so fosforilirani proteini, kateri so se selektivno ločili na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu. Ker pa je bila masa proteinov v tej frakciji pri nanosu na IPG-trakove manjša (20 µg), zaznamo na gelu manj lis fosforiliranih proteinov. Možno je, da so se na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec vezali še kakšni drugi proteini z negativnim neto nabojem, ki imajo afiniteto do železovega iona. S tem so zasedli del vezavnih mest. Le-teh pa pri barvanju z barvilom Pro-Q Diamond nismo zaznali. Ker je proteinski signal za fosforilirane proteine manj zaznaven (frakcija 2), je možno, da se je poleg fosforiliranih proteinov na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec vezala tudi molekula DNA, ki je prisotna v začetnem realnem vzorcu (frakcija 1). Molekula DNA vsebuje veliko fosfatnih skupin, ki ji

dajejo skupno negativen neto naboj. Zaradi fosfatnih skupin bi se lahko le ta vezala na nosilec in zasedla mesta fosforiliranim proteinom ter zaradi svoje velikosti v primerjavi s proteini prekrila druga prosta vezna mesta.

Poleg selektivnega barvanja gelov smo vzporedno razvijali tudi postopek barvanja z barvilom Pro-Q Diamond. Manjša intenziteta obarvanosti gelov je lahko posledica prekratkega kontaktnega časa barvanja. Pomembno na intenziteto obarvanja vpliva tudi čas osvetljevanja pred slikanjem (čas odprtja zaslonke). Ta dva parametra sta mogoče vplivala tudi na to, da fosforiliranih proteinov na gelu nismo zaznali (slika 30b).

#### 5.1.2.2 Slike po barvanju z barvilom Sypro Ruby

Fluorescentno barvilo Sypro Ruby se veže na ogrodje proteinov. Je manj selektivno od barvila Pro-Q Diamond, a bolj občutljivo. Z njim že zaznamo vsebnost proteinov od 1 ng do 1  $\mu$ g. Na sliki 31a je prikazan proteinski profil proteinov v frakciji 1. Na sliki 31b je prikazan proteinski profil frakcije 2, to so nefosforilirani proteini. Na sliki 31c je prikazan proteinski profil frakcije 3, to so fosforilirani proteini. Primerjava slik 31b in 31c pokaže, da je CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec delno selektiven, saj sta proteinska profila različna.

#### 5.1.2.3 Primerjava gelov barvanih z različnimi barvili

Na sliki 32a je prikazan proteinski profil frakcije 1, barvan z barvilom Pro-Q Diamond, na sliki 32b je prikazan proteinski profil frakcije 3, barvan z barvilom Pro-Q Diamond. Na sliki 32c je prikazan proteinski profil frakcije 1, barvan z barvilom Sypro Ruby, na sliki 32d je prikazan proteinski profil frakcije 3, barvan z barvilom Sypro Ruby. Na sliki 32a in 32c je razviden profil fosforiliranih proteinov barvan z različnima barviloma. Na sliki 32a je razvidno, da je barvilo Pro-Q Diamond selektivno barvilo, saj je intenziteta lis manjša v primerjavi s sliko 32c. Primerjava slik 32b in 32d je pokazala, da je nosilec delno selektiven, kar smo potrdili tudi z računalniško obdelavo teh slik z računalniškim programom 2-D Dymension (slika 33).

## 5.2 SKLEPI

Imobilizacija kovinskih ionov na CIM<sup>®</sup> IDA monolitni nosilec je enostavna in hitra. S široko paleto kovinskih ionov dobimo selektivne CIM<sup>®</sup> IMAC monolitne nosilce.

CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec je pri imobilizaciji kovinskih ionov neodvisen od pretoka. Kapaciteta kovinskega iona je v povprečju 26  $\mu\text{mol/mL}$ . Kapaciteta za proteine je pri pretoku 1 in 2 mL/min 18,5 in 16,5 mg/mL. Z večanjem pretoka se kapaciteta za proteine manjša.

HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> delčni nosilec ima kapaciteto kovinskega iona okoli 30  $\mu\text{mol/mL}$ . Kapaciteto za proteine ima 38,5 mg/mL.

CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec je primerljiv s konkurenčnim HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> delčnim nosilcem glede kapacitete za kovinski ion. Pomanjkljivost se pokaže v primerjavi z delčnim nosilcem pri kapaciteti za protein, kjer je za polovico manjša od konkurenčne.

Razvoj metod je z uporabo CIM<sup>®</sup> monolitnih nosilcev hiter, selektiven in enostaven. Zaradi konvektivnega prenosa omogoča hitre in selektivne ločbe. Omogoča delo pri velikih pretokih z majhnim zmanjšanjem tlaka. Monoliti so kemijsko in mehansko odporni. Delo z njimi je možno v širokem razponu pH in ionske jakosti.

Z optimizacijo metode selektivnega ločevanja fosforiliranih proteinov bi bil izvedljiv prenos vzorcev brez vmesnih postopkov obarjanja v analizo z 2-D elektroforezo.

S primerjavo in računalniško obdelavo slik barvanih z barvili Pro-Q Diamond in Sypro Ruby smo potrdili uspešno in selektivno ločbo fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov v realnem vzorcu.

CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec je delno selektiven nosilec za ločevanje fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov.

## 6 POVZETEK

Fosforilirani proteini nastajajo v celicah kot posledica post-translacijske modifikacije. Njihova koncentracija v celicah je zelo majhna. Brez preučitve fosfoproteoma je poznavanje celičnih procesov nepopolno. Za preučevanje fosfoproteoma je zelo pomembno, da je v očiščenih vzorcih zadostna količina fosforiliranih proteinov. Klasični postopki selektivne obogatitve vsebujejo postopke obarjanja, s tem se delež fosforiliranih proteinov izgublja. Z uporabo CIM<sup>®</sup> monolitnih nosilcev se lahko tem postopkom izognemo. Na CIM<sup>®</sup> IDA monolitni nosilec smo imobilizirali železove ione in dobili selektivno afinitetno stacionarno fazo. Lastnost, ki opiše stacionarno fazo, je kapaciteta za železove ione. Ta se giblje v območju med 20 in 28  $\mu\text{mol/mL}$  in je primerljiva s konkurenčno stacionarno fazo proizvajalca GE Healthcare, katere kapaciteta za železove ione je 30  $\mu\text{mol/mL}$ . Kapaciteta za ione železa je pri monolitnem nosilcu neodvisna od pretoka. Poleg kapacitete za kovinske ione smo monolitnemu in delčnemu nosilcu določili kapaciteto za fosforiliran protein beta-kazein. Proteinska kapaciteta pri pretoku 1 mL/min znaša pri CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnem nosilcu 18,5 mg/mL, pri HiTrap IMAC Fe<sup>3+</sup> delčnem nosilcu 38,5 mg/mL. Proteinska kapaciteta se razlikuje za več kot 50 % in ni primerljiva s konkurenčnim nosilcem. Kapaciteta za proteine se z večanjem pretoka manjša. S »screeningom« mobilnih faz smo izbrali ustrezne pogoje vezave in elucije standardnih fosforiliranih proteinov na CIM<sup>®</sup> monolitni nosilec. Za vezno mobilno fazo je bil izbran 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4. Za elucijsko mobilno fazo 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 9,6. Pokazali smo, da se na CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitni nosilec selektivno vežejo fosforilirani proteini. S separacijo proteinov v kvasnem ekstraktu *Saccharomyces cerevisiae*, s skupno koncentracijo 2 mg/mL vodotopnih proteinov, smo preverili selektivnost CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> monolitnega nosilca pri vezavi fosforiliranih proteinov od nefosforiliranih proteinov. Za potrditev selektivnosti smo pobrali 3 frakcije različnih vzorcev in jih analizirali z 2-D elektroforezo. Vzorce proteinov smo ločili v prvi dimenziji z izoelektričnim fokusiranjem v pH gradientu na osnovi njihovih izoelektričnih točk, v drugi dimenziji smo jih ločili z SDS-PAGE glede na njihove mase. Dobljene gele smo barvali s selektivnim fluorescentnim barvilom Pro-Q Diamond za fosforilirane proteine, s katerim smo potrdili prisotnost fosforiliranih proteinov v začetnem vzorcu in tudi prisotnost v elucijski frakciji. Poleg prisotnih fosforiliranih proteinov smo detektirali tudi druge proteine, zato sklepamo, da je monolitni nosilec CIM<sup>®</sup> IDA Fe<sup>3+</sup> delno selektiven nosilec.

## 7 VIRI

Afeyan N.B., Gordon N.F., Mazsaroff I., Varady L., Fulton S.P., Yang Y.B., Regnier F.E. 1990. Flow-through particles for the high-performance liquid chromatographic separation of biomolecules: Perfusion chromatography. *Journal of Chromatography B*, 519: 1-29.

Ahmed N., Rice G.E. 2005. Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps. *Journal of Chromatography B*, 815: 39-50.

Andersson L. 1996. The use of immobilized  $\text{Fe}^{3+}$  and other hard metal ions in chromatography of peptides and proteins. *International Journal of Biochromatography*, 2: 25-36.

Andersson L., Porath J. 1986. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal  $\text{Fe}^{3+}$  affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, 154: 250-254.

Anspach F.B. 1994. Silica-based metal chelate affinity sorbents I. Preparation and characterization of iminodiacetic acid affinity sorbents prepared via different immobilization techniques. *Journal of Chromatography A*, 672: 35-49.

Arnold H.F. 1991. Metal affinity separations: A new dimension in protein processing. *Bio/Technology*, 9: 151-159.

Atkins P., de Paula J. 2002. *Physical chemistry*. 7<sup>th</sup> ed. Oxford, Oxford University Press: 989-992.

Atkins P.W., Frazer M.J., Clugston M.J., Jones R.A.Y. 1995. *Kemija: zakonitosti in uporaba*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 47-48.

Azarkan M., Huet J., Baeyens-Volant D. 2007. Affinity chromatography: A useful tool in proteomics studies. *Journal of Chromatography B*, 849: 81-90.

Bailon P., Ehrlich G., Fung W.J., Berthold W. 2000. Affinity chromatography: Methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*, 147: 1-6.

Barut M., Podgornik A., Merhar M., Štrancar A. 2003. Short monolithic columns-rigid disks. V: *Monolithic materials, preparation, properties and application*. Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z. (eds.). Boston, Elsevier: 51-57.

Blowers D.P., Park A. 2000. Immobilized metal ion chromatography. V: *Encyclopedia of separation science*. Wilson I.D., Adlard E.R., Cooke M., Poole C.F. (eds.). Michigan, Academic Press: 277-283.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Branović K. 2001. Separacija bioloških makromolekula na monolitnim kromatografskim medijima. Doktorska disertacija. Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu: 23-24.

Brusic V., Marina O., Wu C.J., Reinherz E.L. 2007. Proteome informatics for cancer research: From molecules to clinic. *Proteomics*, 7: 976-991.

Chaga G., Porath J., Illéni T. 1993. Isolation and purification of amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*. *Biomedical Chromatography*, 7: 256-261.

Chaga G.S. 2001. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: Past, present and future. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49: 313-334.

Gaberc-Porekar V., Menart V. 2001. Perspectives of immobilised-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49: 335-360.

GE Healthcare. 2004. 2-D electrophoresis: Principles and methods. Little Chalfont, Amersham Biosciences UK Ltd, GE Healthcare: 168 str.  
[http://www6.gelifesciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/2A3643B6787885E0C12570BE000DC671/\\$file/80642960.pdf](http://www6.gelifesciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/2A3643B6787885E0C12570BE000DC671/$file/80642960.pdf) (avgust, 2008).

Görg A., Klaus A., Lück C., Weiland F., Weiss W. 2007. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: a laboratory manual. München, Technische Universität München: 166 str.

Hanash S. 2003. Disease proteomics. *Nature*, 422: 226-232.

Holmes L.D., Schiller M.R. 1997. Immobilized iron (III) metal affinity chromatography for the separation of phosphorylated macromolecules: Ligand and applications. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technology*, 20: 123-142.

Humphery-Smith I. 2003. Protein biochips and array-based proteomics. V: Protein arrays, biochips and proteomics: The next phase of genomic discovery. Albala J.S., Humphery-Smith I. (eds.). New York, Marcel Dekker: 1-80.

Jones K. 2000. Affinity separation. V: Encyclopedia of separation science. Wilson I.D., Adlard E.R., Cooke M., Poole C.F. (eds.). Michigan, Academic Press: 3-17.

Klumpp S., Krieglstein J. 2002. Serin/threonine protein phosphatases in apoptosis. *Current Opinion in Pharmacology*, 2: 458-462.

Kočevar N., Kreft S., Obermajer N. 2007. Identifikacija in karakterizacija bioloških zdravil ter analiza bioloških vzorcev. V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 136-184.

Krabbe J.G., Gao F., Li J., Ahlskog J.E., Lingeman H., Niessen W.M.A., Irth H. 2006. Selective detection and identification of phosphorylated proteins by simultaneous ligand-exchange fluorescence detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1130: 287-295.

McLachlin D.T., Chait B.T. 2001. Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5: 591-602.

Neverova I., Van Eyk J.E. 2005. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *Journal of Chromatography B*, 815: 51-63.

Patwardhan P., Miller W.T. 2007. Processive phosphorylation: Mechanism and biological importance. *Cellular Signalling*, 19: 2218-2226.

O'Farrell P.H. 1975. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250: 4007-4021.

Podgornik A. 1998. Imobilizacija in karakterizacija lastnosti nekaterih encimov in protiteles vezanih na kompakten poli-(glicidilmetakrilatnem-etilen-dimetakrilatnem) nosilcu. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 10-49.

Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. 1975. Metal chelate affinity chromatography: A new approach to protein fractionation. *Nature*, 258: 598-599.

Porath J. 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 3: 263-281.

Posewitz M.C., Tempst P. 1999. Immobilized gallium (III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Analytical Chemistry*, 71: 2883-2892.

Ramagli L.S. 1999. Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. V: 2-D proteome analysis protocols. Link J.A. (ed.). New Jersey, Humana Press: 99-103.

Riggs L., Seeley E.H., Reginer F.E. 2005. Quantification of phosphoproteins with global internal standard technology. *Journal of Chromatography B*, 817: 89-96.

Scopes K. R. 1994. *Protein purification: Principles and practice*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Springer: 380 str.

Štrancar A., Podgornik A., Barut M., Glover D. 2002. CIM convective interaction media: A new stationary phase for biochromatography. *BIOforum International* 3: 152-153.

Štrancar A. 2003. Monolithic supports for chromatography: Rapid technology for analytical, preparative, and industrial applications. *Genetic Engineering News*, 23: 50-51.



Trojer L., Stecher G., Feuerstein I., Lubbad S., Bonn G.K. 2005. Characterisation and evaluation of metal-loaded iminodiacetic acid-silica of different porosity for the selective enrichment of phosphopeptides. *Journal of Chromatography A*, 1079: 197-207.

Turková J. 1984. Bioaffinity chromatography. *New Comprehensive Biochemistry*, 8: 321-361.

Wittmann-Liebold B., Graack H.-R., Pohl T. 2006. Two-dimensional gel electrophoresis as a tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*, 6: 4688-4703.

Yan Jun X., Packer H. N., Gooley A., Williams L. K. 1998. Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acid. *Journal of Chromatography A*, 808: 23-41.

## ZAHVALA

Zahvala gre mentorju doc. dr. Alešu Podgorniku in somentorici doc. dr. Poloni Jamnik za strokovno vodenje pri eksperimentalnem delu, za strokovne nasvete in pripombe pri pisanju diplomskega dela. Zahvaljujem se recenzentki doc. dr. Milici Kač za strokoven pregled, za vse nasvete in kritike pri zaključevanju diplomskega dela. Zahvala vsem sodelavcem podjetja BIA Separations d.o.o. in BIA d.o.o. za prijetno delovno okolje in veliko pozitivne energije.

Zahvala staršema in sestri z družino, ki so me podpirali na moji poti. In na koncu zahvala vsem, ki ste verjeli vame in v moj zaključek dodiplomskega študija Živilske tehnologije.

V spomin dragemu atiju.