

Estrazione di proteine ad ultrasuoni da colture di tessuti e cellule

- **L'estrazione delle proteine è un passo essenziale nella preparazione dei campioni in proteomica.**
- **Le proteine possono essere estratte da tessuti vegetali e animali, lieviti e microrganismi.**
- **La sonicazione è un metodo di estrazione proteica affidabile ed efficiente che fornisce elevate rese proteiche entro un breve tempo di estrazione.**

Estrazione proteica

L'estrazione di proteine da tessuti e cellule coltivate è una fase essenziale di preparazione del campione che viene eseguita durante molte tecniche biochimiche e analitiche come ELISA, PAGE, Western blotting, spettrometria di massa o purificazione di proteine. La distruzione delle cellule ad ultrasuoni, la lisi e l'estrazione sono una tecnica controllabile con precisione per garantire alti rendimenti di proteine.



Omogeneizzatore di tessuti ultrasonici UP200St

Estrazione di proteine dal tessuto animale

Per la preparazione di tessuti interi (ad es. Reni, cuore, polmoni, muscoli ecc.), Il tessuto deve essere sezionato in piccoli pezzi con strumenti puliti, preferibilmente su ghiaccio e il più rapidamente possibile per prevenire la degradazione da parte delle proteasi (ad es. tampone di lisi come RIPA o tampone di lisi ipotonica contenente proteasi e cocktail di inibitori della fosfatasi). Dopo la dissezione, il campione viene immerso in azoto liquido per il congelamento a scatto. Il campione può essere conservato a -80 ° C per un uso successivo o essere conservato in ghiaccio per l'immediata omogeneizzazione. Immediatamente prima dell'estrazione ultrasonica, il tampone di lisi ghiacciato (con inibitori della proteasi DTT, leupeptina e aprotinina) viene rapidamente aggiunto nella provetta del campione (per ~ 10 mg di tessuto circa ~ 600 µL di tampone sono raccomandati). Circa. Si consigliano 20-60 mg di tessuto per provetta.

Omogeneizzazione ad ultrasuoni, lisi ed estrazione vengono eseguite con un omogeneizzatore ultrasonico come UP200Ht o UP200St, dotato di un sonotrodo a micro-punta. La durata della sonicazione è 60-90 sec. a una modalità di ciclo ultrasonico di 15 sec. sonicazione e 10 sec. tempo di riposo. Il campione dovrebbe essere tenuto tutto il tempo in ghiaccio.

Dopo omogeneizzazione / estrazione ad ultrasuoni, il lisato viene centrifugato a 27.000 g per ca. 20 minuti. Successivamente il supernatante viene raccolto, in modo che la concentrazione proteica possa essere determinata mediante un saggio proteico come il saggio della proteina Pierce BCA.

Estrazione proteica dal siero del sangue

Per una miscela omogenea del siero e del tampone fosfato, il campione viene agitato su vortex prima della lisi delle cellule ultrasoniche. Per la lisi ultrasonica, il campione viene sonicato con un omogeneizzatore da laboratorio ultrasonico come UP100H per 8 cicli con un'ampiezza del 20%, per cicli di 5 secondi su e 15 secondi di spegnimento. La sonorizzazione viene effettuata mediante sonicazione in cicli e ponendo il campione su ghiaccio in modo da evitare un surriscaldamento

e il degrado termico del campione. Poiché il siero contiene una grande quantità di proteine ad alto peso molecolare (come l'albumina, l' α 1-antitripsina, la transferrina, l'aptoglobulina, l'immunoglobulina G e l'immunoglobulina A), che interferiscono con la separazione delle proteine a basso peso molecolare durante l'IEF, si raccomanda di ridurle dal siero utilizzando una colonna di svuotamento.

Estrazione proteica dal tessuto vegetale

Il tessuto vegetale fresco e morbido, ad es. Muschio, ecc., Può essere facilmente distrutto semplicemente inserendo il materiale del campione sminuzzato nel tampone di lisi per la sonicazione. I tessuti vegetali duri e legnosi, come semi, aghi di abete ecc., Devono essere macinati a secco. Alcuni materiali vegetali duri e legnosi devono essere congelati e macinati in azoto liquido prima di essere estratti per sonicazione. Per le sospensioni di colture di cellule vegetali, un trattamento ultrasonico tra 30 e 150 secondi in un tampone di lisi è per lo più sufficiente. Materiale più duro come i semi di zucca richiedono una sonicazione più intensa come descritto di seguito.

Protocollo per l'estrazione a ultrasuoni di albumina dai semi di zucca



Omogeneizzatore di tessuti ultrasonici UP400St con S24d40 - per l'estrazione di proteine da tessuti vegetali e animali (Clicca per ingrandire!) Per l'estrazione di proteine ad ultrasuoni di albumina dalla polvere di semi di zucca a grana fine, 10 g di polvere di semi di zucca sgrassata e 100 mL di acqua deionizzata come solvente vengono aggiunti in un bicchiere di vetro da 250 mL. L'estrazione della proteina consiste in due fasi: in primo luogo, il campione viene sonicato con un ultrasonificatore sonda di tipo UP400St (400 W, 24 kHz) con sonotrodo montato S24d7. Il bicchiere di vetro viene posto in un bagno di acqua fredda durante l'omogeneizzazione a ultrasuoni. L'impostazione dell'ultrasonificatore UP400St con il sensore di temperatura plug-in assicurato che la temperatura del campione sia sempre mantenuta al di sotto dei 30 ° C. Con il preciso



VialTweeter per sonicazione indiretta.

vantaggi

- Rapido
- Alti rendimenti
- Altamente efficiente
- Controllo preciso sui parametri
- Risultati riproducibili
- Scalabilità lineare

controllo della temperatura durante la sonicazione, si evita una denaturazione dell'albumina. In secondo luogo, l'estrazione è stata eseguita con un miscelatore a 200 giri / min e a 30 ° C. Successivamente il becher viene trasferito in uno shaker termostatico. Globulina viene rimosso tramite dialisi con acqua distillata. Dopo la rimozione della globulina, l'estratto proteico può essere campionato per la determinazione del profilo dell'albumina e successivamente viene regolato in $pI = 3,0$ usando $HC1 0,1 M$ per la coagulazione dell'albumina. La fase solida viene separata per centrifugazione a 5000 g, 20 ° C e ridiisolta in acqua deionizzata. La coagulazione di albumina viene eseguita due volte per aumentare il rapporto proteico nel concentrato di albumina.

L'estrazione di proteine alcaline a ultrasuoni per la preparazione del concentrato proteico dalla crusca di riso mostra che il trattamento con ultrasuoni si traduce in una maggiore resa proteica in un tempo di estrazione significativamente più breve - rispetto ai metodi di estrazione convenzionali.

Protocollo di preparazione del campione per l'enzima funzionale iNOS

Per ottenere un enzima iNOS perfettamente funzionante (ad es. Per lo screening dei farmaci), si raccomanda il seguente protocollo: La sospensione cellulare deve essere posta su ghiaccio e sonicata con un UP100H a $10\mu m$ di ampiezza alla modalità ciclo di 5 sec. sonicazione e 25 sec. riposo sul ghiaccio La procedura dovrebbe essere ripetuta ca. 3 volte. Il tempo di riposo tra i cicli di sonicazione riduce l'aumento di temperatura e quindi riduce il rischio di denaturazione.



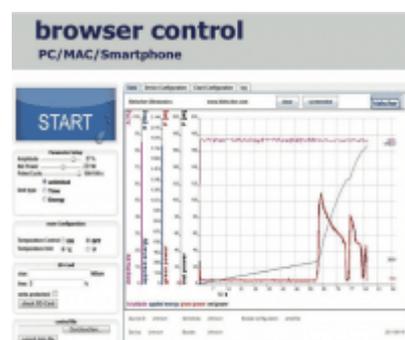
Omogeneizzatore di tessuti ultrasonici [UP200St](#) per l'estrazione efficiente di proteine

Solubilizzazione delle proteine ad ultrasuoni

La sonicazione può accelerare il processo di solubilizzazione della proteina, che di solito richiede diverse ore. Al fine di non surriscaldare il campione e prevenire il degrado e le modifiche delle proteine in soluzioni contenenti urea, le raffiche ultrasoniche non dovrebbero durare più di qualche secondo.

Istruzioni generali

Controllo della temperatura: per garantire un alto rendimento proteico senza denaturazione termica, è necessario controllare la temperatura durante l'estrazione. Gli omogeneizzatori ultrasonici di Hielscher, noti anche come disintegratori o sonificatori ultrasonici, sono perfettamente controllabili. Sono dotati di un sensore di temperatura collegabile. Nelle opzioni di impostazione dell'omogeneizzatore a ultrasuoni è possibile impostare una



Controllo del browser per operazioni precise e monitoraggio del processo di sonicazione

temperatura massima. Quando viene raggiunta questa temperatura massima, l'ultrasonificatore si arresta automaticamente fino a quando il campione si è raffreddato.

Buffer: La scelta di un tampone adatto e il giusto volume di tampone variano da tessuto a tessuto e devono essere individuati mediante test di prova ed errore.

Isolamento / purificazione: I lisati di proteine possono contenere un eccesso di biomolecole come il DNA o i carboidrati, che possono essere rimossi dalla precipitazione proteica (acido desossicolato-tricloroacetico) o dallo scambio tampone.

Chittapalo e Noomhorm (2009) hanno riportato che la resa proteica è aumentata usando la sonicazione e che l'omogeneizzazione del tessuto ultrasonico e il processo di lisi possono migliorare significativamente i processi di estrazione esistenti, consentendo nuove opportunità di estrazione commerciale.

Protezione acustica con custodia insonorizzata Hielscher SPB-L e dispositivo ultrasonico UP200St. (Clicca per ingrandire!)

Omogeneizzatore di tessuti ultrasonici UP200St per l'estrazione efficiente di proteine

Controllo preciso del trattamento ad ultrasuoni (clicca per ingrandire!)

Controllo del browser per operazioni precise e monitoraggio del processo di sonicazione

Apparecchiature ad ultrasuoni per l'estrazione di proteine

Hielscher Ultrasonics offre un'ampia gamma di omogeneizzatori ultrasonici per la disintegrazione di cellule, tessuti, batteri, microrganismi, lieviti e spore.

Gli ultrasuoni del laboratorio Hielscher sono potenti e facili da usare. Costruiti per il funzionamento 24 ore su 24, 7 giorni su 7, sono progettati come dispositivi da laboratorio e da banco robusti ed efficienti. Per tutti i dispositivi, l'energia emessa e l'ampiezza possono essere controllate con precisione. L'ampia gamma di accessori apre ulteriori opzioni di configurazione. I dispositivi digitali come VialTweeter, UP200Ht, UP200St e UP400St hanno un controllo della temperatura integrato e una scheda SD integrata per la registrazione automatica dei dati.

Per la sonicazione indiretta, senza contaminazione incrociata e simultanea di più campioni, offriamo il VialTweeter o il cuphorn ultrasonico.

Letteratura / Riferimenti

- Chittapalo T, Noomhorm A (2009): estrazione alcalina assistita da ultrasuoni di proteine dalla crusca di riso sgrassata e proprietà dei concentrati proteici. Int J Food Sci Technol 44: 1843-1849.
- Simões, André ES.; Pereira, Diane M.; Amaral, Joana D.; Nunes, Ana F.; Gomes, Sofia E.; Rodrigues, Pedro M.; Lo, Adrian C.; D'Hooge, Rudi; Steer, Clifford J.; Thibodeau, Stephen N.; Borralho, Pedro M

.; Rodrigues, Cecília MP (2013): recupero efficiente di proteine da più campioni di origine dopo estrazione di trizolo o trizolo LS RNA e conservazione a lungo termine. BMC Genomics 2013, 14: 181.

Fatti da sapere

proteomica

La proteomica è il campo di ricerca che indaga le proteine e il proteoma. Le proteine riempiono una vasta gamma di funzioni vitali all'interno degli organismi. Il proteoma è l'intero insieme di proteine espresse da un genoma, una cellula, un tessuto o un organismo in un determinato momento. Il proteoma varia con il tempo e con requisiti distinti, o sottolinea, che una cellula o un organismo subisce. Più specificamente, è l'insieme di proteine espresse in un dato tipo di cellula o organismo, in un dato momento, in condizioni definite. Il termine è una miscela di proteine e genoma. La proteomica è lo studio del proteoma.

Proteina

Le proteine sono grandi biomolecole, le cosiddette macromolecole, che sono composte da una o più lunghe catene di residui amminoacidici. Le proteine sono presenti in tutti gli organismi di origine sia vegetale che animale e sono cruciali per la maggior parte delle funzioni biologiche. Poiché le proteine contengono molte informazioni biologiche, vengono estratte per scopi analitici, ad esempio per la ricerca proteomica. La funzione più importante svolta dalle proteine include la catalisi delle reazioni metaboliche, la replicazione del DNA, la risposta agli stimoli e il trasporto di molecole da una posizione all'altra. Le proteine differiscono l'una dall'altra principalmente nella loro sequenza di amminoacidi, che è dettata dalla sequenza nucleotidica dei loro geni e che di solito si traduce nel ripiegamento delle proteine in una specifica struttura tridimensionale che determina la sua attività. Le proteine sono - oltre ai peptidi - uno dei componenti chiave del cibo. Pertanto, la proteomica è un potente strumento nelle scienze alimentari per ottimizzare i processi, la sicurezza alimentare e la valutazione nutrizionale.

Elettroforesi su gel

L'elettroforesi su gel è il metodo principale per la separazione e l'analisi di macromolecole come il DNA, l'RNA e le proteine così come i loro frammenti, in base alla loro dimensione e carica. Viene utilizzato in chimica clinica per separare le proteine per carica e / o dimensione (agarosio IEF, essenzialmente indipendente dalla dimensione) e in biochimica, biologia molecolare e proteomica per separare una popolazione mista di frammenti di DNA e RNA di lunghezza, per stimare la dimensione del DNA e frammenti di RNA o per separare le proteine per carica.

Culture cellulari

La coltura cellulare è il processo di crescita controllato mediante il quale le cellule vengono coltivate in condizioni controllate. Le condizioni della coltura cellulare variano a seconda del tipo di

cellula. In generale, l'ambiente di una coltura cellulare consiste in un recipiente adatto (ad es. Piastra di Petri) con substrato o terreno che fornisce i nutrienti essenziali (aminoacidi, carboidrati, vitamine, minerali), fattori di crescita, ormoni e gas (CO_2 , O_2) e regola l'ambiente fisico-chimico (tampone pH, pressione osmotica, temperatura). La maggior parte delle cellule ha bisogno di un substrato superficiale o artificiale, mentre altre colture cellulari possono essere coltivate libere galleggiando nel mezzo di coltura (coltura di sospensione, sospensione cellulare).

Le colture di massa di linee di cellule animali sono utilizzate nella produzione industriale di vaccini virali e di altri prodotti biotecnologicamente derivati. Le cellule staminali umane sono coltivate per espandere il numero di cellule e differenziare le cellule in vari tipi di cellule somatiche per scopi di trapianto.

Campioni di tessuto

Il termine tessuto descrive un intermedio cellulare, in cui il materiale cellulare si trova a livello organizzativo tra le cellule e un organo completo. Nel tessuto, vengono assemblate cellule simili, dalla stessa origine che svolgono insieme una funzione specifica. Con il raggruppamento funzionale di più tessuti, si formano le complesse strutture degli organi.

Il tessuto viene campionato per la ricerca in biologia, istologia / istopatologia, parassitologia, biochimica, immunoistochimica, nonché per coltivare ed estrarre il DNA. Può essere distinto tra animale (suddivisione: tessuto di mammifero) e tessuto vegetale. I tessuti animali sono raggruppati nei quattro tipi fondamentali di tessuto connettivo, muscolare, nervoso ed epiteliale. Il tessuto vegetale è suddiviso nei seguenti tre sistemi tissutali: l'epidermide, il tessuto macinato e il tessuto vascolare.

I campioni di tessuto possono essere preparati da parti di animali o piante, ad es. Ossa, muscoli, foglie, ecc.

Fluidi corporei

Sangue, siero, plasma, liquido cerebrospinale, saliva e liquido sinoviale sono fluidi corporei, che offrono una grande fonte di informazioni diagnosticamente rilevanti. Pertanto, una preparazione sofisticata di campioni di liquidi corporei per l'analisi è importante. La prima difficoltà è associata all'ampia gamma dinamica di componenti presenti nei fluidi corporei.

Determinazione della concentrazione di proteine

Il saggio Bradford, il saggio Lowry e il test dell'acido bicinconinico (BCA) sono test comuni per determinare la concentrazione di proteine. L'albumina sierica bovina (BSA) è uno degli standard proteici più frequentemente utilizzati.

Tampone di lisi

Il tampone di lisi deve essere scelto in base al materiale o al tessuto cellulare (coltura tissutale, pianta, batteri, funghi, ecc.) E se le cellule si trovano in una struttura e nel tipo di struttura. Una vasta gamma di tamponi di lisi per l'estrazione di proteine, membrane e organelli sono formulati con uno o più detergenti. Il detergente viene solitamente selezionato tramite test di prova ed errore o, se disponibile, secondo un protocollo di estrazione proteica esistente. Il detergente deve

essere compatibile con la fonte di tessuto e le proteine. In generale, il detergente più delicato che funziona per uno specifico tessuto / proteina, viene scelto al fine di mantenere la massima funzionalità dell'estratto. Inoltre, in caso di estrazione di membrane e organelli, un detergente delicato mantiene intatta la membrana.

Ad esempio, tessuti come cervello, fegato, intestino, rene, milza ecc. Possono essere semplicemente tamponati con RIPA - tuttavia dovrebbero essere inclusi inibitori della proteasi e DTT (ad esempio per elettroforesi su gel).

Tampone di lisi per tessuto muscolare scheletrico (ghiacciato): 20 mM Tris (pH 7,8), 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 10% (p / v) glicerolo, 1 mM EDTA , 1 mM ditiotreitolo integrato con cocktail di inibitori della proteasi e fosfatasi

Tabella dei tamponi comuni e il loro intervallo di pH. In generale, questi buffer sono normalmente utilizzati a concentrazioni di 20-50 mM.

Buffer	intervallo di pH
Acido citrico - NaOH	2.2 - 6.5
Citrato di sodio - acido citrico	3.0 - 6.2
Acetato di sodio - acido acetico	3.6 - 5.6
Sale di sodio acido cacodylic - HCl	5.0 - 7.4
MES - NaOH	5.6 - 6.8
Sodio diidrogeno fosfato - disodio idrogeno fosfato	5.8 - 8.0
Imidazolo - HCl	6.2 - 7.8
MOPS - KOH	6,6 - 7,8
Trietanolamina cloridrato - NaOH	6.8 - 8.8
Tris - HCl	7.0 - 9.0
HEPES - NaOH	7.2 - 8.2
Tricina - NaOH	7.6 - 8.6
Tetraborato di sodio - acido boricco	7.6 - 9.2
Bicine - NaOH	7.7 - 8.9
Glicina - NaOH	8.6 - 10.6

La maggior parte dei buffer mostra una dipendenza dal pH con la temperatura. Questo è particolarmente vero per i buffer Tris. Il pKa passa da 8,06 a 25 ° C a 8,85 a 0 ° C.

(pH e pKa di un tampone: il pH misura la concentrazione di ioni idrogeno in una soluzione acquosa. pKa (= costante di dissociazione dell'acido) è una misura correlata, ma più specifica, in quanto aiuta a prevedere come una molecola agirà in uno specifico valore del pH.)

TRizol

TRizol è una soluzione chimica utilizzata per estrarre RNA / DNA / proteina durante l'estrazione di guanidinio tiocianato-fenolo-cloroformio. L'uso dell'estrazione di TRizol con ultrasuoni ha come

risultato elevate rese di DNA, RNA e proteine dallo stesso campione ed eccelle quindi altri metodi di estrazione.