

# PRIPRAVA BRIOPORINSKIH NANOPOR IN NJIHOVA IZOLACIJA IZ UMETNIH VEZIKLOV

Raziskovalna naloga

Področje: biologija

DIJAKINJA

Mia Gale, 3. letnik

MENTOR

Tomaž Švigelj, mag. bioteh.

SOMENTOR

Ana Bavec, prof. biol.

2019/20

Zavod sv. Stanislava, Škofijska klasična gimnazija

## KAZALO

### Vsebina

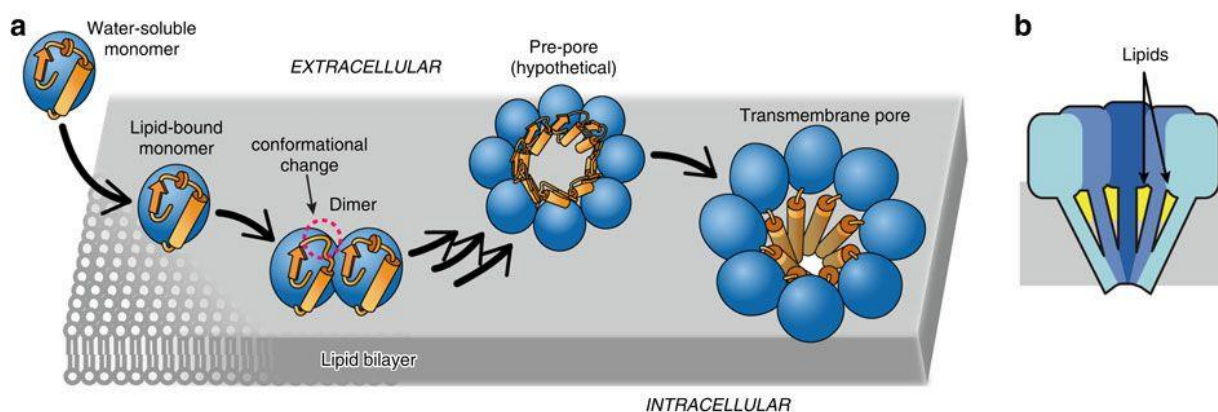
UVOD .....	3
TEORETIČNI DEL.....	4
PRIPRAVA LUV-ov .....	4
PRIPRAVA POR ZA NATIVNO ELEKTROFOREZO .....	4
NATIVNA ELEKTROFOREZA .....	5
IZOLACIJA POR IZ GELA.....	5
EKSPERIMENTALNI DEL .....	6
REZULTATI .....	10
RAZPRAVA .....	15
ZAKLJUČEK.....	15
LITERATURA.....	16

## UVOD

Aktinoporini so proteini, ki v celičnih membranah tvorijo značilne pore. Prvi aktinoporin je bil izoliran iz organizma iz rodu *Actinia* (morske vetrnice), od tod ime aktinoporini. Pri tej raziskovalni nalogi sem delala z brioporinom, ki ga naravno izraža navadni mah (*Physcomitrella patens*). Ne ve se še kaj je v naravi njegova funkcija, ve pa se, da ga mah bolj izraža v sušnih obdobjih.

Protein je bil rekombinantno izražen v *E.coli* in očiščen s kromatografijami. Brioporin lahko na določenih lipidnih membranah tvori pore, katere se da potem očistiti iz membran in jih uporabiti v biotehnologiji. Uporablja se jih lahko pri nanozaznavanju. Skozi poro teče električni tok in ko gre skozi ali mimo nje neka molekula, se pora delno zamaši, zato se spremeni tok skozi njo. S tem lahko zaznavamo različne molekule v vzorcu.

Za raziskovalno nalogo sem imela protein (brioporin) že pripravljen, z njim pa sem poskušala pripraviti pore. Glede na znano strukturo pore aktinoporina fragaceatoksina C predvidevamo, da se, tudi pri brioporinu, osem monomerov, po vezavi na lipidno membrano, razporedi v krogu in rahlo spremeni svojo konformacijo, da se skozi membrano tvori pora). [1, 3, 4]



Slika 1: skica nastajanja brioporinskih por

## TEORETIČNI DEL

### PRIPRAVA LUV-ov

Za pripravo 50 mmol/L veziklov, v molarnem razmerju 1:1:1 (1/3 1-palmitoil-2-oleoil-glicerol-3-fosfolipid (POPC; fosfolipid), 1/3 sfingomielina, 1/3 holesterola).

V čisto bučko dodamo holesterol in sfingomielin. Ker sta bila v trdem agregatnem stanju, smo ju najprej raztopili v kloroformu, potem pa s pipeto dodali še POPC. Pripravljeno zmes v bučki damo na rotavapor, kjer odhlapiamo kloroform in na stenah bučke nastane lipidni film. Posušeni lipidom dodamo 1 mL pufru (PBS, pH=7,4). Epico dobro pretresemo, da se vezikli odlepijo od stene in se tvorijo MLV-ji. Potem jih s tekočim dušikom šestkrat zamrzemo in odtajamo. S tem poskrbimo, da se vezikli enakomerno hidrirajo (napolnijo s pufrom). Ti vezikli so različnih velikosti in se lahko nahajajo en v drugemu.

Do LUV-ov pridemo tako, da MLV-je ekstrudiramo skozi membrane s 100nm porami. Tako dobimo 100 nm LUV-e.

### PRIPRAVA POR ZA NATIVNO ELEKTROFOREZO

V vodni raztopini oz. v pufru se brioporin veže na membrano s posebnimi receptorji. Tako naredi prostor v membrani, kjer pride do oligomerizacije. Po vstavljanju v membrano se tvorijo pore.

Za vse vzorce sem uporabila enako količino proteina ( $m=2\mu\text{g}$ ). Naredimo več različnih vzorcev, da bi našli optimalno možnost in sicer, pri katerem detergentu in pri kolikšni količini vnesenih veziklov lahko dobimo največ in najbolj homogene pore. Pripravimo osem vzorcev. Nekatere inkubiramo na 37 °C za 20 minut, druge pa sem pustimo 20 minut na sobni temperaturi.

Vzorcem dodamo različne detergente, ki so pore ločili od lipidov. Ko se pore ločijo od membran, dodamo nanašalni pufer, ki vsebuje glicerol (zaradi svoje gostote oteži vzorce, da se usedejo v jamice na gelu, preden se začne elektroforeza) in barvilo, ki potuje pred proteini in na podlagi tega vidimo, kdaj je elektroforeza potekla do konca. Pri nekaterih poskusih elektroforeze lahko v vzorce ali v katodni pufer dodamo še barvilo comassie brilliant blue G-250. To barvilo ima negativen naboj in se veže na proteine ter s tem dodatno negativno nabije proteine. Dodaten negativen naboj omogoča proteinom hitrejše potovanje po elektroforeznem gelu. [2, 5]

## NATIVNA ELEKTOFOREZA

Pri nativni elektroforezi ostajajo delci v svoji nativni obliki, torej se ne nevtralizirajo. Gel, ki ga uporabljamo, ima od vrha proti dnu 4% - 16% poliakrila. Manjši kot je njegov procent, hitreje lahko delci potujejo po gelu, ker je raztopina veliko redkejša. Pore se med elektroforezo razvrstijo glede na njihovo velikost in nabitost. Tako so prišli vzorci pri 250V po eni uri do dna gela. Eden izmed vzorcev je bil monomer (vzorec brez LUV in detergenta), da ga lahko primerjamo z ostalimi vzorci in ugotovimo, kateri detergenti so ohranili pore in kateri so jih razbili na monomere. [5]

## IZOLACIJA POR IZ GELA

Pore lahko izoliramo po dveh metodah. Prva je nekoliko počasnejša kot druga. Pri prvi metodi iz gela izrežemo pas, kjer so pore največje. Vsak izrezan vzorec namakamo v pufer z detergentom, ki smo ga uporabili za tisti vzorec. Količino detergenta za pripravo pufra izračunamo na podlagi kritične micelarne koncentracije (CMC; angl. Critical micelle concentration – to je koncentracija detergenta, nad katero detergent ni topen in tvori micle). Pri vsakem detergentu za delovno koncentracijo vzamemo trikratnik CMC-ja. Ko je gel v pufri, pore difundirajo iz gela in tako dobimo pore, ki so pripravljene za nanozaznavanje.

Druga metoda, ki je nekoliko bolj zapletena, a veliko hitrejša, je, da imamo gel prav tako v posebej pripravljenem pufri, le da s posebnim filtrom in elektrodama, ki ju priključimo na obe strani filtra, z električnim tokom potisnemo pore iz gela. [5]

## EKSPERIMENTALNI DEL

Raziskovalno nalogo sem začela s pripravo veziklov iz POPC, sfingomilina in holesterola, ki sem jih raztopila v kloroformu v razmerju 1:1:1. Z rotavaporjem sem izhlapela ves kloroform in tako so v bučki ostali le še lipidi. Potem sem dodala nekaj pufra in dobro pretresla epico, da sem spravila vse lipide s stene. Epico sem nato pomočila v tekoči dušik, da je pufer zamrznil in počakala, da se tekočina stali. Postopek sem ponovila 6x. S tem sem poskrbela, da se vezikli hidrirajo. Ko sem imela pripravljene MLV-je, sem z ekstrudorjem naredila 100nm LUV-e.

Pri pripravi por sem imela osem različnih vzorcev. Štiri vzorce sem zmešala v molarnem razmerju proteini:lipidi = 1:100, štiri pa v razmerju proteini:lipidi = 1:200. Po dva iz vsakega razmerja sem inkubirala 20 minut pri 37 °C, po dva pa sem 20 minut pustila pri sobni temperaturi.

Tabela 1: priprava vzorcev za prvo in drugo nativno elektroforezo

ŠT. VZORCA	BRIOPORIN	LUV	TEMPERATURA	DETERGENT
1	2 µg (=95 pmol)	9,5 nmol	21 °C	1% DDM
2	2 µg	9,5 nmol	21 °C	1% triton
3	2 µg	9,5 nmol	37 °C	1% DDM
4	2 µg	9,5 nmol	37 °C	1% triton
5	2 µg	19 nmol	21 °C	1% DDM
6	2 µg	19 nmol	21 °C	1% triton
7	2 µg	19 nmol	37 °C	1% DDM
8	2 µg	19 nmol	37 °C	1% triton

Po inkubaciji sem vsem vzorcem dodala še detergente. Te so nastale pore ločili od membrane. Preveriti sem želela, ali bo kateri od izbranih detergentov (DDM in triton) ločil pore od lipidov, ne da bi s tem razbil protein na oligomere. Pripravila sem še monomer, ki je vseboval le proteine, ki so bili v pufu.

Pred elektroforezo sem k 30 µL vseh vzorcev dodala 10 µL 4x nanašalnega pufra. Pripravila sem napravo za elektroforezo in v gel vnesla po 40 µL vsakega vzorca. S konstantno

napetostjo 250V sem čakala približno eno uro in pol, da so vsi vzorci prišli do dna gela. Gel sem pomočila v MQ in ga v mikrovalovni pečici segrela, da sem pospešila postopek. Posodico z gelom sem rahlo mešala. Po petih minutah sem MQ (ultračista voda) zamenjala z komercialnim barvilom Simply blue in ponovno dala posodico v mikrovalovno pečico. Segret gel z barvilom sem ponovno mešala in ga po desetih minutah zamenjala z MQ. Tako sem obarvala gel (glej sliko 2).

Ker prva elektroforeza ni bila najbolj uspešna, sem ponovila postopek. Pripravila sem osem (+ monomer) vzorcev kot prej, le s to razliko, da sem vsem vzorcem dodala še 0,5  $\mu$ L 5% comassie brilliant blue barvila, pufer pa sem pripravila z 20x Cathode Buffer Additivom (vsebuje comassie brilliant blue barvilo). Elektroforezo sem izvedla pri isti napetosti kot pri prejšnjih vzorcih. Ker je bilo barvilo za obarvanje proteinov v gelu že prisotno, je bilo potrebno zgolj razbarvati ozadje. To sem storila z 10% očetno kislino (fiksira proteine, da ne difundirajo iz gela) in 40% metanolom.

Tokrat so bili rezultati veliko boljši kot prvi (glej sliko 3). Vzorci si po vrsti sledijo: /, monomer, vzorec št. 1, vzorec št. 2, vzorec št. 3, vzorec št. 4, vzorec št. 5, vzorec št. 6, vzorec št. 7 in vzorec št. 8. Z monomerom sem si pomagala tako, da sem videla do kam potuje po gelu in ga primerjala z ostalimi vzorci. Iz vzorca je lepo razviden pas, kjer je predvsem detergent DDM razbil delce na monomere. V višjih pasovih kot se vzorec nahaja, večje so pore.

Triton sem izbrala za bolj primeren detergent za nadaljno raziskavo saj je DDM vse pore razbil do monomerne oblike. V nadaljnih poskusih sem testirala še dva detergenta, fos-holin-12 in fos-holin-16 ter namesto razmerja 1:200 uporabila razmerje 1:400 (proteini:lipidi). Za naslednje vzorce 4x povečala količino veziklov. Naprej sem vse delala pri temperaturi 37 °C. Pripravila sem novih šest vzorcev.

Tabela 2: priprava vzorcev za tretjo, četrto in peto nativno elektroforezo

ŠT. VZORCA	BRIPORIN	LUV	TEMPERATURA	DETERGENT
1	2 $\mu$ g (=95 pmol)	9,5 nmol	37 °C	1% triton
2	2 $\mu$ g	9,5 nmol	37 °C	1% FOS-CHOL 12
3	2 $\mu$ g	9,5 nmol	37 °C	1% FOS-CHOL 16
4	2 $\mu$ g	38 nmol	37 °C	1% triton
5	2 $\mu$ g	38 nmol	37 °C	1% FOS-CHOL 12
6	2 $\mu$ g	38 nmol	37 °C	1% FOS-CHOL 16

V vse vzorce sem dodala 4X nanašalni pufer in barvilo comassie brilliant blue, v pufer pa Cathode Buffer Additive, kot pri zadnji najuspešnejši elektroforezi. Celoten postopek je ostal enak, le da sem uporabila drugačne vzorce.

V prvem okvirčku se nahaja monomer, potem pa si sledijo vzorci po številkah 1, 2, 3, 4, 5, 6 (glej sliko 4). Razen v vzorcih 1 in 6 ni zaznati oligomerov, pa tudi tukaj ni dobro definirane lise, ki bi predstavljala večinski delež neke oblike por. Morda so pore detergenti razbili na monomere. Sklepala sem, da so pore lahko razpadle, ker so vzorci stari dva tedna. Zato sem celoten postopek z enakimi vzorci ponovila. Tokrat ozadja gela nisem razbarvala, ker sem hotela po elektroforezi izolirati pore z gela, metanol in očetna pa bi jih lahko denaturirala.

Tudi tokrat so bile lise s porami zelo slabo vidne (glej sliko 5). Zato sem poskusila na podlagi primerjave z 2. gelom (glej sliko 6) izrezati pas, kjer naj bi bile pore.

Za vsak izrezan del gela, kjer sem sklepala, da naj bi bile pore na podlagi 2. gela (na obeh gelih je po en popolnoma enak vzorec). Na podlagi CMC sem izračunala, koliko pufra in koliko detergenta moram pripraviti, da bo koncentracija detergenta trikratnik njegovega CMC-ja. Pripravila sem raztopine z 1% tritona, 0,141% fos-chol 12 in 0,01% fos-chol 16. Gele sem pomočila v ustrezen pufer in jih zmečkala, da so bili v celoti potopljeni v pufri. Potopljene gele sem pustila en dan stati, medtem pa sem poskusila dobiti kakšen gel, kjer se bi prelomi s porami bolje videli.

20x pufer za nativno elektroforezo sem razrečila in mu nisem dodala barvila. Le v vzorce sem še vedno dodala comassie brilliant blue barvilo in nadaljevala z elektroforezo po enakem postopku kot pri vseh ostalih poskusih (U=250V, 1h 30min).

Tudi tokratnem poskusu nisem bila uspešna. Gel (glej sliko 7) z opaznimi rezultati sem poskusila dobiti še tako, da sem v vzorce dala po 2x več vseh snovi kot jih je bilo v prvotnih.

Tabela 3: priprava vzorcev za šesto nativno elektroforezo

ŠT. VZORCA	BRIOPORIN	LUV	TEMPERATURA	DETERGENT
1	4 µg (=190 pmol)	19 nmol	37 °C	1% triton
2	4 µg	19 nmol	37 °C	1% FOS-CHOL 12
3	4 µg	19 nmol	37 °C	1% FOS-CHOL 16
4	4 µg	76 nmol	37 °C	1% triton
5	4 µg	76 nmol	37 °C	1% FOS-CHOL 12
6	4 µg	76 nmol	37 °C	1% FOS-CHOL 16



Barvilo sem dodala tako vzorcem kot tudi pufru. Elektroforeza je potekala tako kot pri prejšnjih gelih pri 250V za eno uro in pol.

Tudi tokrat nisem bila uspešna. Gel sem položila v metanol in očetno kislino ter ga segrevala v mikrovalovni pečici za 45s in jo rahlo tresla za 10 min. Po razbarvanju ozadja sem raztopino metanol/očetna zamenjala z 8 % očetno kislino, da so se proteini še bolje fiksirali v gelu. Toda tudi po tej metodi nisem dobila dobro definiranih lis s pričakovanimi porami (glej sliko 8).

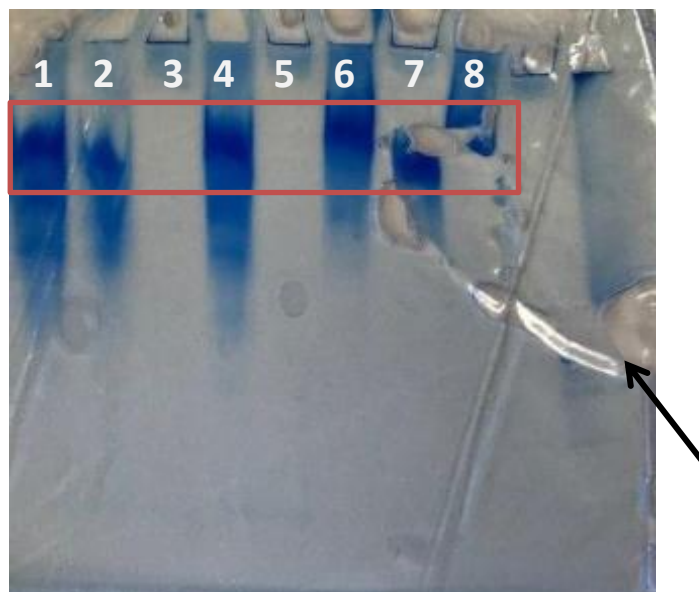
S ponovno elektroforezo izoliranih vzorcev z gela (glej sliko 9) , kjer sem izrezala dele gela s potencialnimi porami, sem želela dokazati, da sem izolirala pore. Po običajnem postopku na gelu ni bilo razvidnih zelenih pasov s porami, kar je bilo nekako pričakovano, saj smo nanесли zelo majhno količino proteina (med izolacijo iz gela lahko pride do precejšnjih izgub vzorca). Zato sem gel obarvala s Silver stain kitom (Invitrogen). Barvanje s srebrom je precej bolj občutljivo kot barvanje s comassie brilliant blue barvilom, zato smo upali, da bomo s tem postopkom lahko dokazali uspešno izolacijo por z gela.

Postopek barvanja s srebrom (pri vsakem koraku tekočino zamenjamo razen pri koraku 10.; gel moramo pri vsaki točki neprestano mešati):

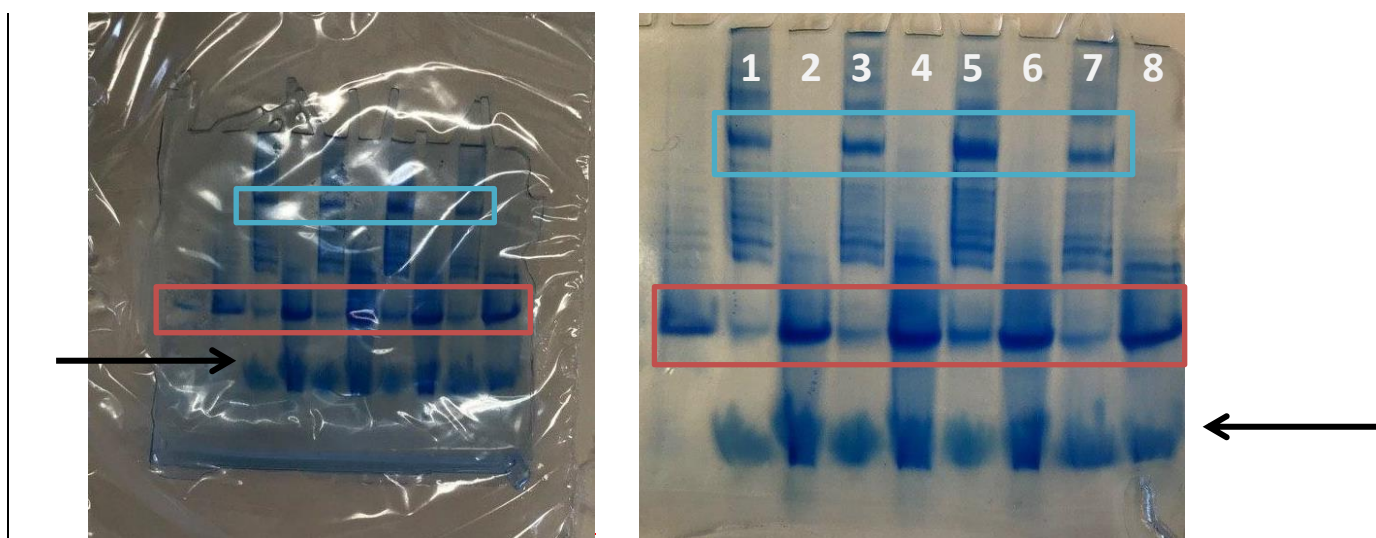
1. Spiranje z MQ za 5-10' ;
2. Fiksiranje (10 mL očetne kisline, 40 mL etanola, do 100 mL MQ) za 10' ;
3. 30 mL etanola, do 100 mL MQ za 10' ;
4. 30 mL etanola, 10 mL sensitizerja, do 100 mL MQ za 10' ;
5. 30 mL etanola, do 100 mL MQ za 10' ;
6. Spiranje gela (100 mL MQ) za 10' ;
7. 1 mL stainerja, do 100 mL MQ za 15' ;
8. Splakovanje gela (100 mL MQ) za 10-60''
9. 10 mL Developerja, 1 kapljica Developer enhancerja, do 100 mL MQ za 8' ;
10. V raztopino z gelom dodamo 10 mL stopperja (ustavimo barvanje) ;
11. 100 mL MQ za 10' .

Tudi po barvanju gela lise niso bile vidne oziroma so bile težko opazne. Morda je opaziti le nekaj lis monomerov in manjših oligomerov, kar pomeni, da so pore verjetno med izolacijo z gela razpadle.

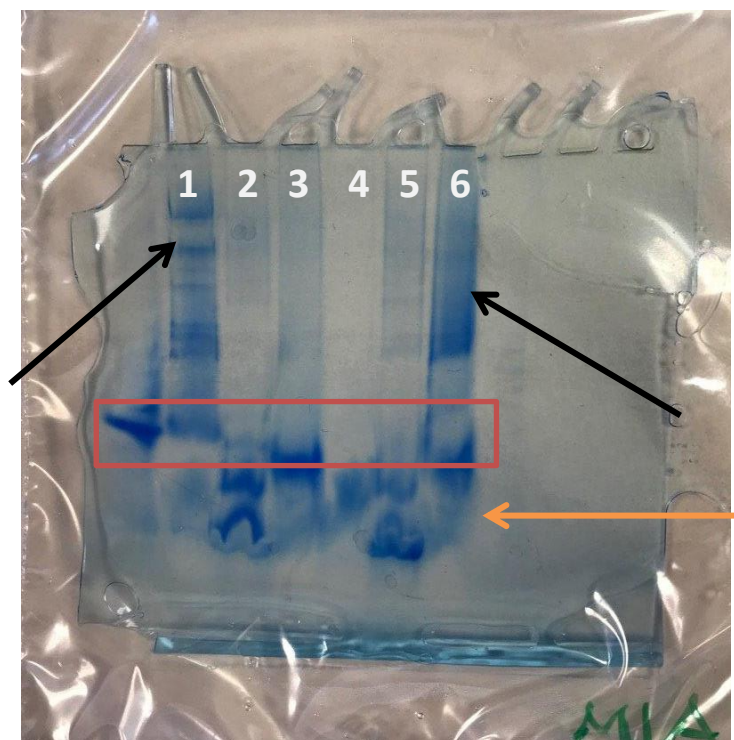
## REZULTATI



Slika 2: Na sliki je 1. gel z vzorci (glej tabelo 1) brez comassie brilliant blue. S puščico je označen monomer, v rdečem kvadratu pa naj bi se nahajale pore.



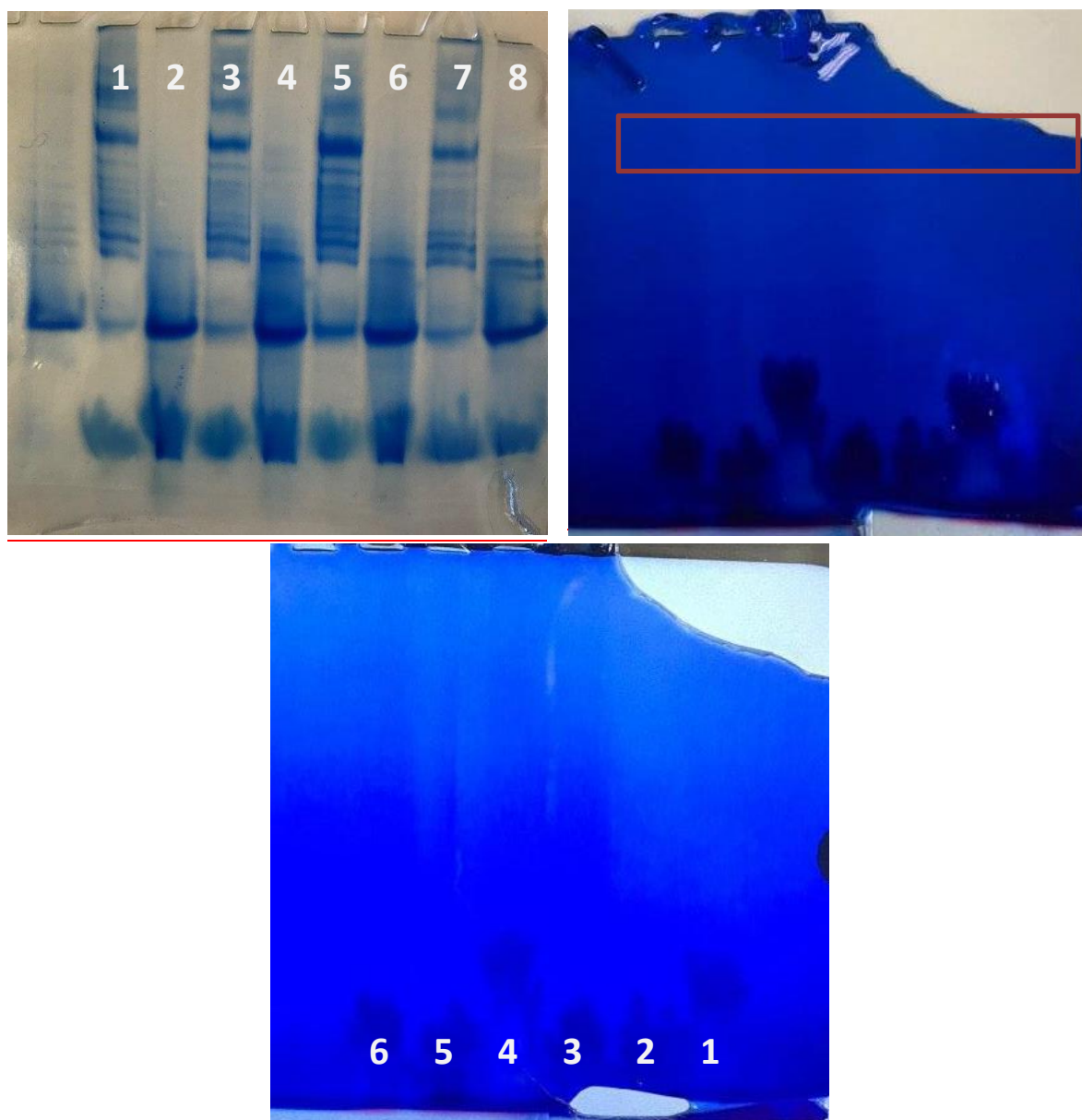
Slika 3: Na sliki je 2. gel z vzorci (glej tabelo 1) z comassie brilliant blue barvilom v vzorcih. V pufer, ki je bil uporabljen pri elektroforezi, je bil dodan Cathode Buffer Additive. Moder kvadratek označuje pore, rdeč monomere, puščica pa pas z detergenti. Na desni sliki si vzorci sledijo: monomer, vzorec št. 1, vzorec št. 2, vzorec št. 3, vzorec št. 4, vzorec št. 5, vzorec št. 6, vzorec št. 7 in vzorec št. 8.



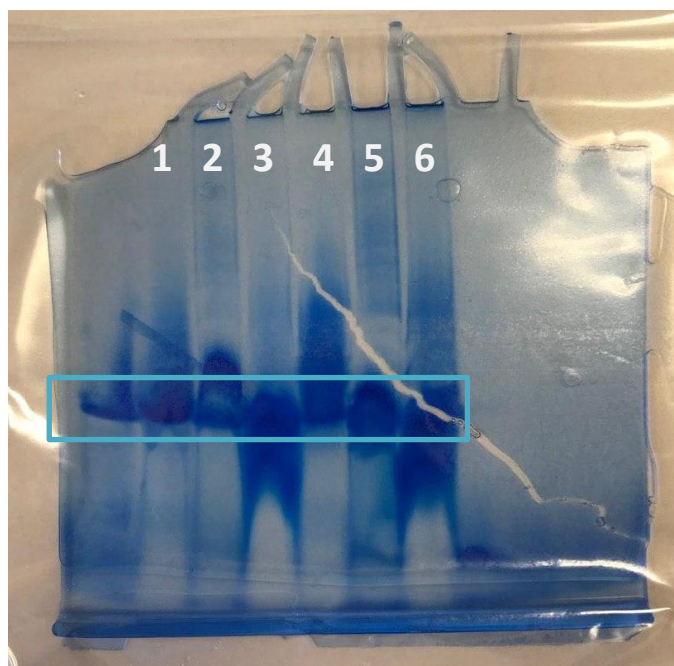
Slika 4: Na sliki je 3. gel z vzorci (glej tabelo 2) z comassie brilliant blue barvilom. Pri tem gelu sem uporabila detergente: triton, fos-chol 12 in fos-chol 16. Rdeč okvirček označuje monomere, oranžna puščica detergente, črni pušici pa kažeta na pore iz vzorcev 1 in 6.



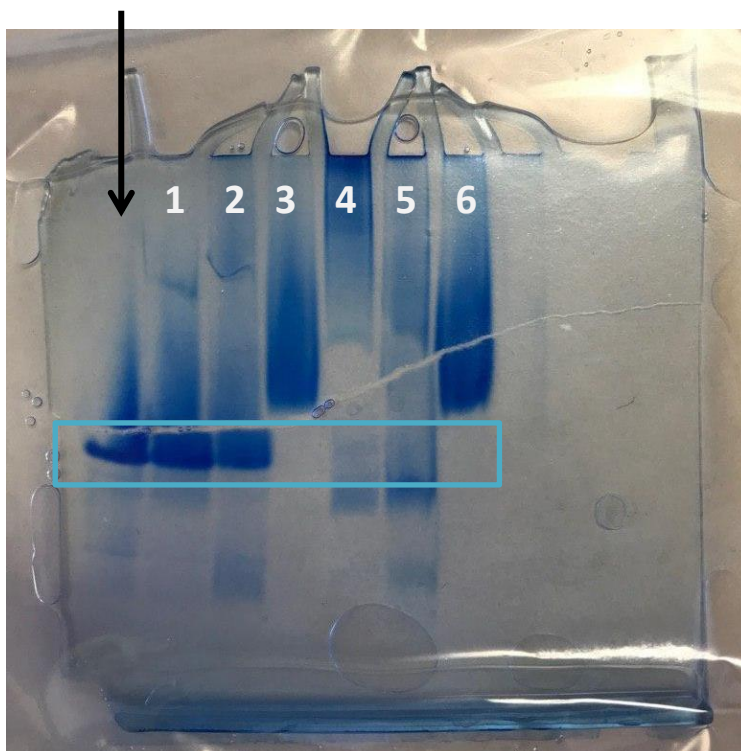
Slika 5: Na sliki je 4. gel (glej tabelo 2), pri katerem nisem razbarvala ozadja, ker sem želela iz gela izolirati pore, metanol in očetna pa bi jih lahko denaturirala.



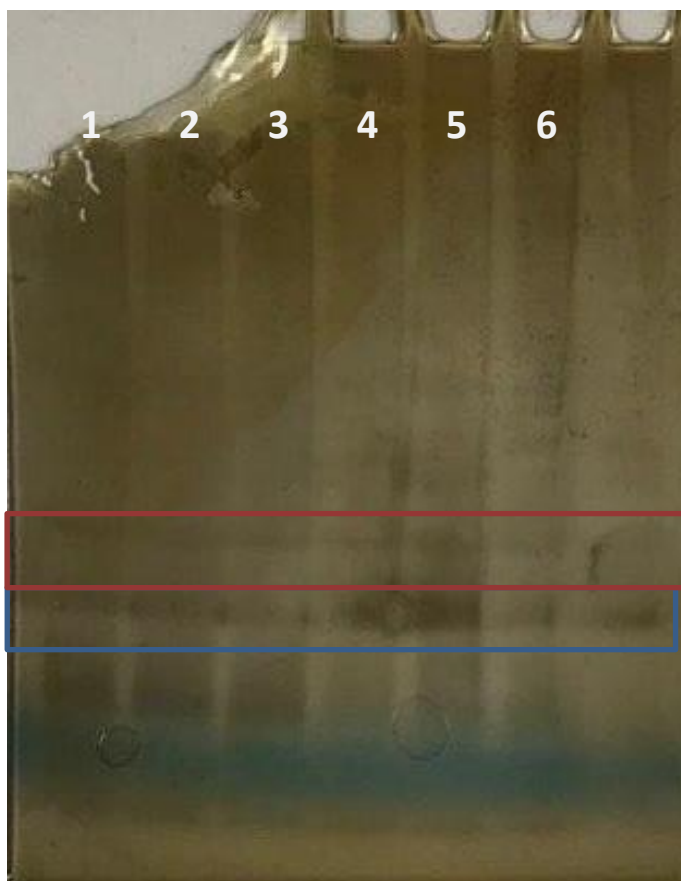
Slika 6: Na sliki sta 2. gel in 4. gel. Na podlagi rezultatov iz 2. gela sem izrezala pas na 4. gelu, kjer naj bi se nahajale pore. Rdeč okvirček označuje, kje naj bi bile pore na podlagi 2. gela (glej sliko 3).



Slika 7: Na sliki je 5. gel (glej tabelo 2), pri katerem sem želela dobiti bolj jasne lise s tem, da v pufer nisem dodala Cathode Buffer Additive. Moder okvirček označuje monomere.



Slika 8: Na sliki je 6. gel z vzorci (glej tabelo 3), v katere sem dodala dvojno količino vseh snovi. Barvilo sem dodala tako v vzorce kot tudi v pufer. Moder okvirček označuje monomere, puščica pa označuje vzorec z monomerom.



Slika 9: Na sliki je pobarvan 7. gel po postopku barvanja s srebrom. V vzorcih so izolirane pore iz 4. gela. Moder okvirček označuje monomere, rdeč pa dimere.

## RAZPRAVA

Pripravljene pore lepše potujejo po gelu, če jim dodamo barvilo comassie brilliant blue, ki ima močan negativen naboj. Detergent loči pore od veziklov, toda če je izbrani detergent premočan lahko pore razbije na manjše oligomere ali celo monomere. Ravno zato je pri vsaki elektroforezi potreben še monomer, da vzorce lažje primerjamo med seboj. Vse pore so narejene iz brioporina, zato se vzorci ne razlikujejo tako zelo po nabitosti. Pri elektroforezi so se pore v glavnem ločile glede na njihovo velikost. Po 2. gelu sem imela težave z geli, saj lise niso bile opazne ali pa so bile zelo neizrazite tudi po barvanju. Morda jih je detergent razbil na manjše oligomere, ker ko sem izrezovala 4. gel na podlagi 2. gela, nisem dobila iz njega nobene pore. Kljub različnim poskusom, kjer sem zmanjševala količino barvila ali ga sploh nisem dodala in podvojitvi količini vseh snovi v vzorcih, še vedno nisem prišla do želenih rezultatov. Preden bom lahko sploh izolirala pore, bom morala najti napako pri pripravi vzorcev oziroma način, s katerim bom prišla do vidnih lis s porami, ki jih bom lahko izolirala.

## ZAKLJUČEK

Za raziskovalno nalogo želim izolirati pore, ki mi jih do sedaj še ni uspelo. Če primerjamo vse gele med seboj, lahko opazimo, da od 2. gela dalje lise niso več opazne. Nadalje je potrebno optimizirati postopek tako priprave vzorcev za gel kot samo izolacijo por iz gela. Ni še popolnoma jasno, kaj je šlo narobe pri večini poskusov, vendar nam prvi gel nakazuje, da lahko pripravim dokaj homogene pore in na tem bom delala še v prihodnje.

## LITERATURA

- [1] V. Otja Giacomelli: In vivo učinki aktinoporinov, izoliranih iz *Actiniae equinae*. *Med. Razgl.* **1997**, *36*, 437-464
- [2] K. Tanaka, J. M. M. Caaveiro, K. Morante, J. Manuel Gonzalez-Manas, K. Tsumoto: Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nature Communications* **2015**, *6*, 6337
- [3] Q. T. Hoang, S. H. Cho, S. F. McDaniel, S. H. Ok, R. S. Quatrano, J. S. Shin: An actinoporin plays a key role in water stress in the moss *Physcomitrella patens*. *New Research Phytologist* **2009**, *184*, 502-510
- [4] Nanopore 101: How Does Nanopore Sensing Work? Youtube.  
[https://www.youtube.com/watch?v=hs0FdiTHMbc&feature=emb\\_title](https://www.youtube.com/watch?v=hs0FdiTHMbc&feature=emb_title) (pridobljeno 30. 10. 2019)
- [5] Prof. dr. Gregor Anderluh: Toksini, ki tvorijo pore. Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani