



University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

PROTEIN EXTRACTION



استخراج پروتئین گیاهی

اهداف

آشنایی با تکنیک استخراج پروتئین از سلول گیاهی
بررسی مراحل لیز سلولی، رسوب دهی و خالص سازی
تهیه پروتئین خالص برای انجام تکنیک های مولکولی مانند وسترن بلات
سنجش کیفی غلظت به روش SDS-PAGE
سنجش کمی غلظت به روش برادفورد

پروتئومیکس (Proteomics) شاخه‌ای از زیست‌شناسی مولکولی است که به مطالعه جامع پروتئین‌های موجود در یک سلول، بافت یا ارگانیسم در یک زمان مشخص می‌پردازد. به عبارت ساده‌تر، پروتئومیکس همان‌طور که ژنومیکس به بررسی ژن‌ها می‌پردازد، بر روی مجموعه پروتئین‌های تولیدشده توسط ژنوم تمرکز دارد.

اهداف اصلی پروتئومیکس

- 1. شناسایی و تعیین مقدار پروتئین‌ها
- 2. بررسی ساختار و عملکرد پروتئین‌ها
- 3. تحلیل برهم‌کنش‌های پروتئینی Protein-Protein Interactions
- 4. شناسایی تغییرات پس از ترجمه Post-translational Modifications
- 5. مقایسه الگوی پروتئینی در شرایط فیزیولوژیکی یا بیماری مختلف

اهمیت پروتئومیکس

- درک بهتر از عملکرد واقعی ژن‌ها (چون عملکرد ژن‌ها نهایتاً به پروتئین مربوط می‌شود)
- تشخیص و درمان بیماری‌ها مثل سرطان، با یافتن بیومارکرهای پروتئینی
- کمک به طراحی داروهای هدفمند و پزشکی شخصی‌سازی شده
- درک بهتر شبکه‌های زیستی و مسیرهای سیگنال‌دهی

پروتئین‌ها از اجزای اساسی سلول‌ها هستند که وظایف متنوعی از جمله نقش‌های ساختاری، آنزیمی، پیام‌رسانی سلولی و دفاعی را بر عهده دارند. برای مطالعه عملکرد یا ساختار این مولکول‌ها در شرایط مختلف یا برای تحلیل‌های تخصصی مانند SDS-PAGE، وسترن بلات، آنالیز آنزیمی یا پروتئومیکس، ابتدا باید آن‌ها را به‌طور مؤثر و پایدار از نمونه استخراج نمود. استخراج پروتئین از سلول، یکی از مراحل اساسی برای مطالعه ساختار، عملکرد، و تعاملات پروتئین‌هاست.

این تکنیک در سلول‌های گیاهی به دلیل داشتن دیواره سلولی محکم و ترکیباتی چون پلی‌ساکاریدها، پلی‌فنول‌ها و آنزیم‌های پروتئولیتیک، نسبت به سلول‌های جانوری دشوارتر می‌باشد. بنابراین، لازم است از روش‌های خاصی برای شکستن دیواره سلولی و محافظت از پروتئین‌ها در برابر تجزیه استفاده شود. انتخاب روش مناسب، کیفیت و کمیت پروتئین استخراج شده را تعیین می‌کند.

جدا سازی و خالص سازی پروتئین مجموعه ای از مراحل است که برای به دست آوردن پروتئین مورد نظر از یک مخلوط پیچیده انجام می‌شود تا بتوان آن را از ابعاد مختلف مطالعه کرد و اطلاعاتی از قبیل اندازه، ساختار، میل ترکیبی و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن بدست آورد.

این فرآیند در تحقیقات ساخت پروتئین‌های نو ترکیب در مقیاس بزرگ کاربردهای زیادی دارد.

اهمیت استخراج پروتئین

- تحلیل ساختار و عملکرد پروتئین‌ها: برای شناسایی نقش بیولوژیکی پروتئین‌ها در رشد، متابولیسم، فعالیت یا برهم‌کنش پروتئین‌ها
- مطالعات بیوشیمیایی و مولکولی: تهیه نمونه مناسب برای آنالیزها و تکنیک‌های پایین‌دستی مانند: SDS-PAGE ، وسترن بلات، طیف‌سنجی و غیره
- تحقیق و توسعه: شناسایی پروتئین‌های نو ترکیب و توسعه گیاهان تراریخته با ویژگی‌های بهبود یافته و اصلاح ژنتیکی گیاهان
- بررسی میزان بیان پروتئین‌ها: مطالعات مقایسه‌ای بیان ژن و پروتئین تحت شرایط فیزیولوژیک یا پاتولوژیک
- تشخیص بیماری‌ها : بررسی پاسخ‌های دفاعی
- تولید داروهای زیستی: در جهت درمان بیماری‌ها

وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز



مواد و وسایل لازم

- نمونه گیاهی تازه (مانند برگ اسفناج یا جوانه گندم)
- نیتروژن یا یخ برای جلوگیری از تخریب ساختار پروتئین
- هاون و دسته هاون یا هموژنایزر مکانیکی
- بافر استخراج **buffer Extraction** یا بافر لیز **buffer Lysis**
- بافر محلول سازی **Protein Solubilization Buffer**
- میکروتیوب ۱,۵ یا ۲ میلی لیتری
- میکروپیت یا سمپلر و سر سمپلر استریل
- استن سرد: پیش سرد شده در -۲۰ - درجه سانتی گراد
- سانتیفریوژ یخچال دار
- ترازوی دقیق



روش کار

روش کار

- 1 هموژناسیون با نیتروژن مایع
مقدار مشخصی بافت گیاهی را در هاون سرد بریزید. نیتروژن مایع اضافه کرده و سریعاً با دسته هاون پودر کنید تا کاملاً نرم و پودر سفیدی حاصل شود.
- 2 لیز کردن با بافر استخراج
دو برابر وزن برگ بافر لیز یا استخراج اضافه کرده و هموژن کنید. براساس دستورالعمل پروتوکل در دور و زمان مشخص سانتریفیوژ کنید. سوپرناتانت را دور ریخته و رسوب را بمدت یکساعت در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد انکوبه کنید.
- 3 رسوبدهی با استن سرد
به رسوب، استن سرد ۴ تا ۵ برابر حجم بافت اضافه کنید و ورتکس ملایم نمایید .
نمونه را به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد با 12000 دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید. رسوب پروتئین ها را نگه دارید و سوپرناتانت را دور بریزید.
- 4 شستوشو و خالص سازی با استن سرد
برای افزایش خلوص، می توان رسوب را دوباره با استن سرد شستوشو داده و در شرایط قبل سانتریفیوژ کرد.
- 5 خشک کردن رسوب
رسوب حاصل را به مدت چند دقیقه در دمای اتاق خشک کنید تا زمانی که دیگ بوی استن ندهد.

• 6 احیای رسوب در بافر محلول سازی

به رسوب خشک شده، بافر محلول سازی سرد اضافه کرده و ورتکس ملایم کنید

بافر محلول سازی باید پروتئین ها را مجدداً در حالت محلول و پایدار نگه دارد واز دناتوره شدن یا تخریب پروتئین ها جلوگیری کند تا برای آنالیزهای بعدی مناسب باشد.

• 7سانتریفیوژ نهایی

برای جدا کردن ذرات نامحلول، مجدداً سانتریفیوژ کرده رسوب را دور ریخته و سوپرناتانت حاوی پروتئین را

• برای استفاده بعدی در دمای 20- تا 80- ذخیره کنید.

نکات مهم در فرایند استخراج

استفاده از یخ یا نیتروژن مایع برای هموژناسیون و شکستن کامل دیواره سلولی و جلوگیری از دناتوره شدن پروتئین ضروری است.

کار با نیتروژن و استن باید با تهویه مناسب و رعایت ایمنی انجام شود.

- بافر استخراج ساختار طبیعی پروتئین را تا حد ممکن حفظ کند.

- استن سرد باعث رسوب پروتئین و حذف ترکیبات مزاحم مثل فنول‌ها و چربی‌ها می‌شود.

- Tris-HCl نگهدارنده pH است و محیط استخراج را در pH ثابت معمولاً ۷/۴ تا ۸ نگه می‌دارد که برای پایداری ساختار پروتئین ضروری است.

- NaCl باعث افزایش حلالیت پروتئین‌ها و جلوگیری از برهم‌کنش نامناسب بین پروتئین‌ها و سایر اجزای سلولی و جلوگیری از تجمع پروتئین‌ها می‌شود.

- EDTA کلات‌کننده یون‌های فلزی مانند Mg^{2+} و Ca^{2+} می‌باشد و از فعالیت پروتئازها جلوگیری می‌کند.

- Triton X-100 باعث شکستن و تخریب غشای سلولی می‌شود.

- SDS باعث دناتوره کردن پروتئین‌ها می‌شود.

- گلیسرول در بافر محلول سازی جهت افزایش چگالی نمونه و کمک به پایداری پروتئین در دراز مدت و جلوگیری از تجمع مجدد پروتئین استفاده می‌شود.

جدول ترکیبات و نقش بافر محلول سازی پروتئین (Protein Solubilization Buffer)

نقش	ترکیب
تنظیم pH و حفظ پایداری پروتئین ها	Tris-HCl (10–50 mM)
دناتوره کردن پروتئین و حل کردن آن ها	SDS
افزایش چگالی نمونه و کمک به پایداری در دراز مدت	Glycerol (10–20%)
شکستن پیوندهای دی سولفیدی برای دناتوراسیون کامل	Mercaptoethanol
رنگ ردیاب برای لودینگ	Bromophenol Blue اختیاری
مهار یون های فلزی و جلوگیری از فعالیت پروتئازها	EDTA

جدول ترکیبات و نقش بافر لیز یا استخراج پروتئین (Protein lysis Buffer)

نقش	ترکیب
تنظیم pH و حفظ پایداری پروتئین ها	Tris-HCl (10-50 mM)
حفظ فشار اسمزی و جلوگیری از تجمع پروتئین	NaCl (150 mM)
شکستن غشای سلولی و حل کردن پروتئین ها	SDS یا Triton X-100
مهار یون های فلزی و جلوگیری از فعالیت پروتئازها	EDTA
جلوگیری از تجزیه پروتئین ها	مهارکننده های پروتئاز

استخراج پروتیین گیاهی

مراحل:
(۱) همگن سازی برگ
(۲) رسوب دهی استون

۳۰۰ میلی گرم از برگ را وزن کنید

گیاه را داخل هاون چینی بریزید و به آن نیتروژن مایع اضافه کنید

برگ ها را به خوبی خرد کنید تا به صورت پودر درآید

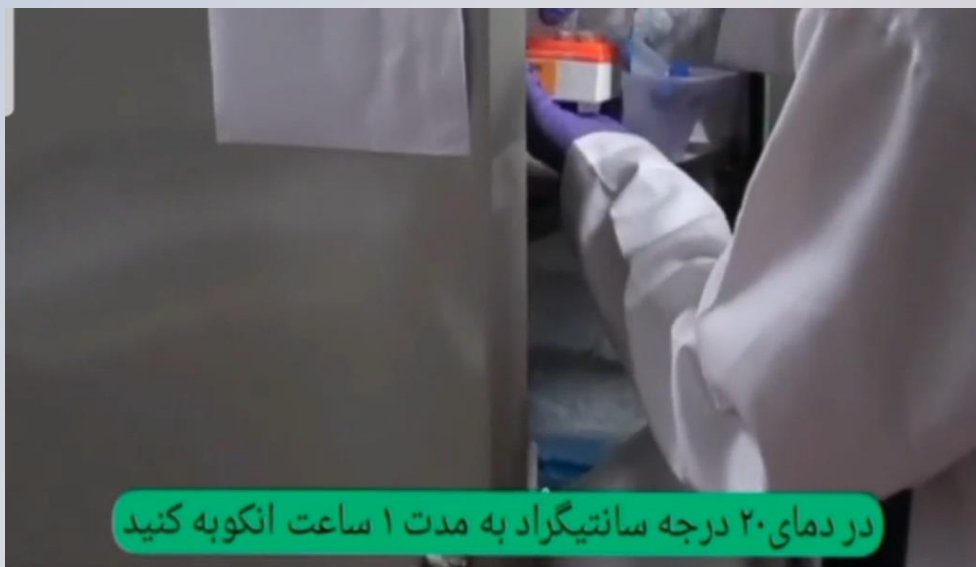


لایزیز بافر غشای سلولی و
غشای هسته ای را تخریب می کند
همچنین از DNA سلول بعد از تخریب غشای هسته
محافظت میکند





مایع رویی را با سمپلر خارج کنید و دور بریزید

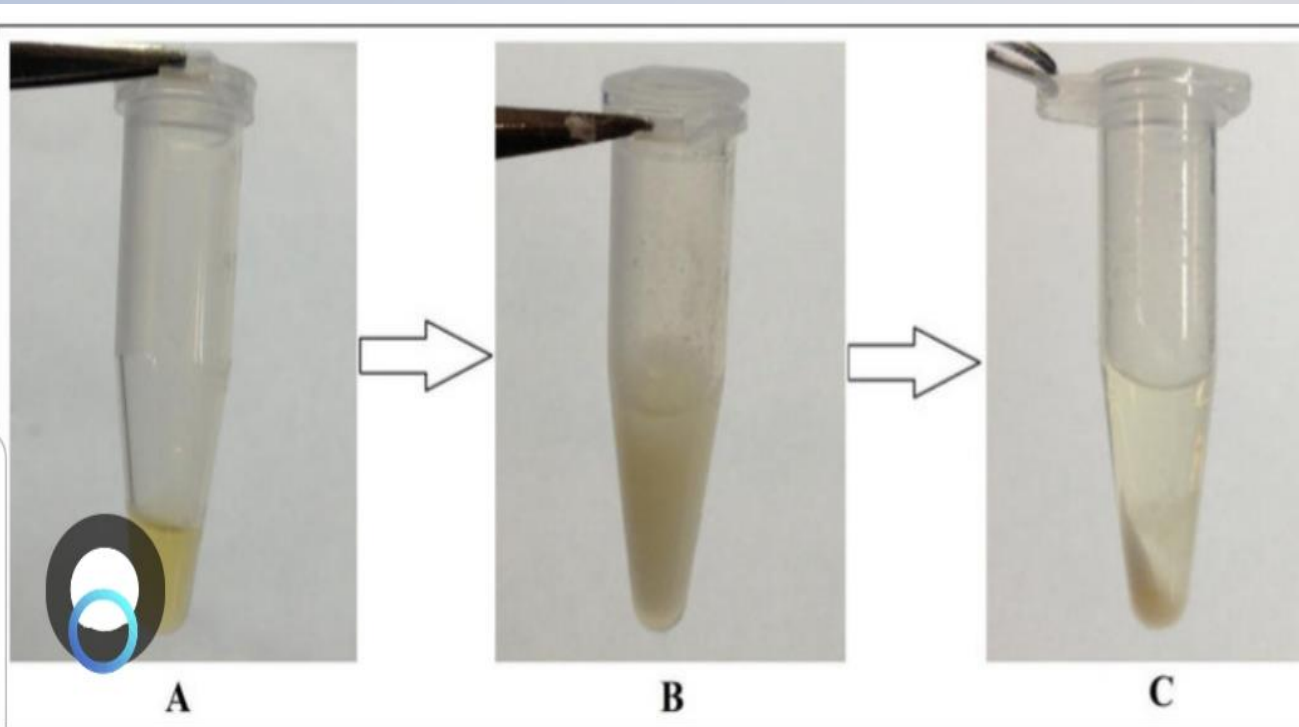


در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت انکوبه کنید



پلت را با استون بشوئید

دمای منفی 20

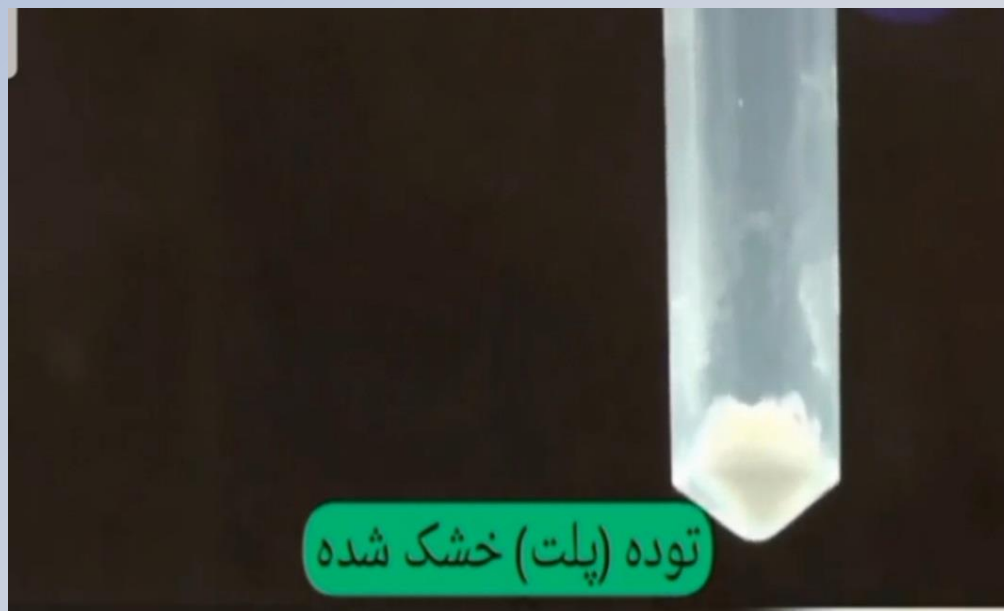


Formation of protein pellet
during protein precipitatio...



Protein precipitation during
concentration





توده (پلت) خشک شده



دمای منفی 4

یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری کنید



دوباره سانتریفیوژ کنید و محلول رویی که حاوی پروتیین است را نگهدارید



محلول رویی را در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری کنید

دمای منفی 20

تحلیل و تفسیر نتایج

- ارزیابی کمیت پروتئین: با استفاده از روش‌های تعیین غلظت پروتئین مانند روش برادفورد میزان کمی پروتئین استخراج شده اندازه‌گیری می‌شود.
- ارزیابی و بررسی کیفیت پروتئین: انجام SDS-PAGE برای بررسی تخریب یا تغییر ساختار پروتئین‌ها و وجود باندهای واضح و مشخص در SDS-PAGE نشان دهنده موفقیت‌آمیز بودن استخراج است. درحالی که باندهای پخش‌شده یا مقادیر کم می‌تواند نشان‌دهنده تجزیه یا استخراج ناقص پروتئین باشد.
- استخراج موفق پروتئین، نقطه آغاز بسیاری از مطالعات بیولوژی مولکولی و بیوشیمیایی است. کیفیت و پایداری پروتئین استخراج‌شده نقش مهمی در صحت و تکرارپذیری نتایج نهایی ایفا می‌کند.
- میزان پروتئین استخراج شده بسته به نوع گیاه، شرایط رشد، و بافت متغیر است.
- وجود کف یا رنگ غیرعادی ممکن است نشانه دناتوره شدن یا وجود ترکیبات مزاحم (مثل فنل‌ها) باشد.