

ОПТИМИЗАЦИЈА ПРОТОКОЛА ЗА ЕКСТРАКЦИЈУ ПРОТЕИНА ИЗ ПЛОДОНОСНИХ ТИЈЕЛА ГЉИВА (ВРСТЕ РОДОВА: *Boletus*, *Russula*, *Lactarius* И *Agaricus*) ЗА SDS-ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Матерић Душан *, Кукавица Биљана **, Бороја Мирела **, Вукојевић Јелена ***

*Педагошки Факултет Бијељина, Семберских Ратара бб, Бијељина; **ПМФ Бања Лука, Младена Стојановића 2, Бања Лука; ***Биолошки Факултет Универзитета у Београду, Институт за ботанику и Ботаничка башта Јевремовац. Таковска 43, Београд.

Abstract

MATERIĆ, D., Biljana KUKAVICA, Mirela BOROJA, Jelena VUKOJEVIĆ: PROTOCOLS OPTIMIZATION FOR THE EXTRACTION OF PROTEIN FROM FRUITING BODIES OF FUNGI (GENERA: *Boletus*, *Russula*, *Lactarius* AND *Agaricus*) FOR SDS-ELECTROPHORESIS. [Teachers' training Faculty, University of East Sarajevo, Semberskih Ratara bb, 76300 Bijeljina; Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka, Mladena Stojanovića 2, 78000 Banja Luka; Institute of Botany, Faculty of Biology, University of Belgrade, Takovska 43, 11000 Belgrade, Serbia]

Protein extraction of fungal fruiting bodies for SDS-Electrophoresis is challenging task, primary because hard chitinous nature of hyphal cell walls and quite high proteolytic activity. During extraction of proteins from mentioned taxa, homogenization in liquid nitrogen and usage of buffers which contain high concentration of urea (8M) and protease inhibitor has shown good results. Presence of β -mercaptoethanol in the sample buffer instead DTT has not shown significant improvement on protein separation. Lowry's method for protein quantification gave very good results for *Boletus* genus, however genus *Agaricus* has shown the highest quantity shift, and we suppose that this is because of presence of significant amount of phenols in those samples.

Key words: Protein extraction, SDS-Electrophoresis, urea, fruiting body, fungi.

Сажетак

Екстракција протеина из плодноносних тијела гљива за SDS-електрофорезу је својеврсан изазов првенствено због чврсте хитинске грађе ћелијског зида хифа и релативно велике протеолитичке активности. Приликом екстракције протеина из врста родова *Boletus*, *Russula*, *Lactarius* и *Agaricus* одговарајућом се показала хомогенизација плодноносних тијела у течном азоту, те употреба пуфера који садрже високу концентрацију уреје (8M) и протеазни инхибитор. Употреба β -меркаптоетанола у пуферу за узорак умјесто DTT-а није показала значајна побољшања. Квантификација протеина Lowry-ом методом показала се примјенљивом за већину представника рода *Boletus*, док врсте рода *Agaricus* показује највећа одступања, вјероватно због присуства великог садржаја фенола у узорцима.

Кључне ријечи: екстракција протеина, SDS-електрофореза, уреа, плодносна тијела, гљиве

Скраћенице: SDS – Натријум додецил сулфат (Sodium Dodecyl Sulfate), DTT – Дитиотритол (Dithiothreitol), PVP – Поливинил пиролонин (polyvinyl pyrrolidone), PMSF – Фенилметил-сулфонил флуорид (phenylmethylsulfonyl fluoride), EDTA – Етилен-диамидтетрасирћетна киселина (Ethylenediaminetetraacetic acid), СBB – Комаси-брилијант плаво (Coomassie Brilliant Blue).

УВОД

Гљиве представљају засебну групу еукариотских организама, које су на бази специфичности карактеристика издвојене у посебно царство живог свијета (Whittaker, 1969).

Постоји велики број класификација гљива које се заснивају на различитим критеријумима (Guarro и сар., 1999). Електрофореза се показала као одговарајућа метода у биљној таксономији, а њене предности су релативно брзо и јефтино добијање резултата (Marin, 2003; Milankov и Jakšić, 2006). Да би се електрофореза могла успјешно користити за потребе систематике, јако је важна припрема узорака која подразумева добру екстракцију и квантификацију протеина. Присуство хитина у ћелијском зиду гљива, као и сама природа хифа, екстракцији протеина дају посебан изазов. Екстракција захтијева хомогенизацију узорка која је отежана због чврстоће ћелијског зида гљива (Oshero и Gregory, 1998; Bridge, 2004), и са друге стране зависи од састава пуфера за екстракцију. Пуфер за екстракцију је коктел хемикалија за издвајање, солубилизацију, денатурацију и јонизацију протеина, уз спрјечавање протеолитичке активности. Стога, добијање добрих резултата SDS-електрофорезе зависи од сваког корака у протоколу експеримента.

Циљ овога рада је био проналажење оптималних услова (начин хомогенизације, састав пуфера) за ефикасну екстракцију протеина из плодноних тијела различитих врста гљива из родова *Boletus*, *Russula*, *Lactarius* и *Agaricus*.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Материјал

За анализу је сакупљено 11 плодноних тијела различитих врста гљива са локалитета Раданка, Шиповљани, Клековача Увала и Заглавица у околини Дрвара, осим *Agaricus bisporus* који је узет из гајилишта. Извршена је идентификација коришћењем одговарајућих кључева (Božac, 1989; Phillips, 2006) и узорци плодноних тела су замрзнути и чувани до екстракције на температури од -20°C .

Хомогенизација

Око 5g радијалног исјечка шешира плодноних тијела, који је обухватао и месо и хименофор, је хомогенизовано у авану са тучком уз помоћ течног азота. Од укупне количне праха одвагано је 0,5g и у узорак је додато 2ml пуфера за екстракцију. Пуфер за екстракцију је садржавао: 1% SDS, 8M Уреу, 0,1M Натријум-фосфатни пуфер pH 6,4, 2mM PMSF, 0,01M DTT и 1mM EDTA (Oshero и Gregory, 1998).

Електрофореза

Узорак са пуфером је чуван на леду у пластичним епруветама до момента центрифугирања (*Hettich, Univerzal 32*) које је трајало 10 минута на 3500 rpm. Након центрифугирања одвојен је супернатант од талоба и у њему је одређен садржај протеина Lowгу-ом методом (Lowgu и сар., 1951). За читавање апсорпције је кориштен спектрофотометар *UV-2500 Labomed-USA*.

Непосредно прије електрофорезе узорак је третиран пуфером за узорак који садржи: 50mM Трис пуфер pH 6,8, 2% SDS, 10mM DTT, 10% глицерол и мало бромовенола ради обојења. Алтернативно је кориштен слједећи пуфер за узорак: 62,5mM Трис пуфер pH 6,8, 2% SDS, 5% β -меркаптоетанол, 10% глицерол и мало бромовенола. У 100 μl узорка додато је 50 μl пуфера (2:1), а након енергичног мијешања узорак је са пуфером куван 10 минута.

За раздвајање протеина кориштена је дисконтинуална гел електрофореза са 5% гелом за концентровање и 12% гелом за раздвајање (*Bio-Rad Mini Gel* систем). Константна волтажа од 100V примјењена је док су узорци пролазили кроз гел за концентровање, а повећана је на 150V за пролазак узорака кроз гел за раздвајање. Маркери познатих молекулских маса (миозин 212kDa, β -галактозидаза 118kDa, серумалбумин 66kDa, овалбумин 43kDa, карбоанхидраза 29kDa, трипсин инхибитор 20kDa и лизозим 14kDa; *MP-Roti-Mark STANDARD*) кориштени су за одређивање молекулских маса протеина узорка.

По завршетку електрофорезе гел је потопљен у раствор за бојење (1% СВВ 250, 50% метанол и 10% сирћетна киселина). Бојење је трајало око 24h, након чега је у више наврата вршено обезбојавање у 50% метанолу и 10% сирћетној киселини. Након обезбојавања гелови су скенирани и паковани у фолију.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

На основу морфо-физиолошких карактеристика плодноносних тијела, типа биљне заједнице и карактеристика локалитета извршена је идентификација сакупљених узорака. Идентификовано је 11 врста гљива припадника четири рода (Табела 1).

Табела 1. Списак сакупљених и идентификованих врста гљива.

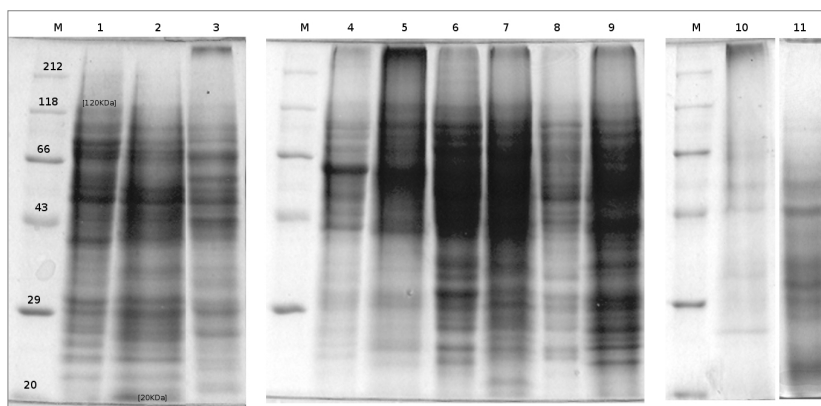
РБ	Врста гљиве	Локалитет	Станиште	Тип плодноносних тијела	Тип хименофора
1	<i>Agaricus bisporus</i>	Бијељина	гајилиште	печурка	листаст
2	<i>Agaricus silvatica</i>	Клековача увала	Шума јеле, смрче и букве	печурка	листаст
3	<i>Boletus edulis</i>	Раданка	Шума храста китњака	печурка	цјеваст
4	<i>Boletus luridus</i>	Шиповљани	Шума китњака и цера	печурка	цјеваст
5	<i>Boletus subtomentosus</i>	Заглавица	Шума китњака и цера	печурка	цјеваст
6	<i>Lactarius piperatus</i>	Раданка	Шума храста китњака	печурка	листаст
7	<i>Lactarius volemus</i>	Раданка	Шума храста китњака	печурка	листаст
8	<i>Russula cyanoxantha</i>	Раданка	Шума храста китњака	печурка	листаст
9	<i>Russula emetica</i>	Раданка	Шума храста китњака	печурка	листаст
10	<i>Russula foetens</i>	Раданка	Шума храста китњака	печурка	листаст
11	<i>Russula vesca</i>	Раданка	Шума храста китњака	печурка	листаст

Хомогенизација плодноносних тијела гљива је вршена течним азотом. Овакав начин хомогенизације се често користи за екстракцију протеина из биљног ткива (Natarajan и сар., 2005; Lakshman и сар., 2008; Liu и сар., 2010). Међутим, треба истаћи да је запажено различито понашање појединих узорака током хомогенизације. Представници рода *Russula* са дељим листићима, су на почетку пуцали у неправилне крупније комаде док су остали узорци углавном одмах прелазили у прах. Најлакша хомогенизација је постигнута код врста рода *Boletus*, вјероватно због цјевасте грађе хименофора.

Проблем приликом хомогенизације течним азотом може бити присуство воде у ткиву што се рјешава лиофилизацијом узорака прије саме хомогенизације (Lakshman и сар., 2008; Liu и сар., 2010). Састав пуфера за екстракцију веома је важан и од његовог састава у многама зависи ефикасност екстракције протеина. За екстракцију протеина из плодноносних тијела гљива коришћен је 0,1М натријум-фосфатни пуфер рН 6,4, 8М Уреа, 1% SDS, 2mM PMSF, 0,01M DTT и 1mM EDTA. Примјеном наведеног пуфера принос протеина је био различит у зависности од врсте гљива (Табела 2). Највећи принос је добијен за врсту *B. subtomentosus* (21,96 mg/g FW), док је знатно мањи принос добијен за врсте из рода *Russula* и *Agaricus* (Табела 2, Слика 2). Принос за врсту *B. subtomentosus* је три пута већи и у односу на врсту *B. luridus* из истог рода, што указује на потребу за модификацијом пуфера за екстракцију у зависности од саме врсте гљива. Lakshman и сарадници (2008) су за екстракцију протеина код *Rhizoctonia solani* користили трихлор сирћетну киселину и ацетон за таложњење протеина, а у пуферу за солубилизацију детергент (CHAPS) и DTT. Међутим, за ефикаснију екстракцију протеина из врста рода *Mucor* детергент (Triton X-100) је био саставни дио пуфера као и DTT (Struszyk и сар., 2008). У нашем раду употреба β-меркаптоетанола умјесто DTT-а није показала значајнија побољшања, а додавање NaCl у пуфер због солубилизације протеина јонски везаних за хелијски зид је

резултирала бољом екстракцијом неких протеина који су се појавили у већој концентрацији, иако није било нових линија на гелу (необјављени подаци).

Концентрација уреје у пуферу од 9М, коју су користили Osherov и Gregory (1998), није била одговарајућа због тежње пуфера да кристалише на собној температури. Однос пуфера за екстракцију и узорка 4:1 показао се одговарајућим за врсте рода *Boletus* (Табела 2). Због већ познате веома велике протеолитичке активности екстракта гљива (Bridge и сар., 2004; Osherov и Gregory, 1998) коришћен је PMSF (инхибитор серин протеаза) у пуферу за екстракцију.



Слика 1. SDS-електрофореза протеина изолованих из плодноносних тијела гљива. М-маркер молекулске масе (212kDa миозин, 118kDa β -галактозидаза, 66kDa серумалбумин, 43kDa овалбумин, 29kDa карбоник анхидраза, kDa трипсин инхибитор), 1-*Boletus luridus*, 2-*Boletus edulis*, 3-*Boletus subtomentosus*, 4-*Lactarius volemus*, 5-*Russula foetens*, 6-*Lactarius piperatus*, 7-*Russula cyanoxantha*, 8-*Russula vesca*, 9-*Russula emetica*, 10-*Agaricus silvatica*, 11-*Agaricus bisporus*.

За квантификацију протеина у узорцима коришћен је Lowry-ев метод. Након nanoшења истих количина протеина на гел за електрофорезу установљено је да долази до одступања. Очитавана је већа апсорбанца, односно већа концентрација протеина него што је реално била, што се могло видјети на основу интензитета протеинских трака добијених на гелу за електрофорезу (Табела 2, Слика 1). Претпоставка је да је до одступања дошло због присуства фенола у узорцима који интерферирају са Фолин-Чикалтеовим реагенсом који се користи за квантификацију протеина Lowry-ом методом (Vujčić, 2002; Lowry и сар., 1951). Различити родови су показали различита одступања у очитивању концентрације протеина, тако род *Boletus* има најмања одступања, за разлику од рода *Agaricus*. Стога се може закључити да је ова метода квантификације употребљива за родове *Boletus*, *Lactarius* и *Russula*, док за род *Agaricus*, и сродне родове као што су *Amanita* и *Macrolepiota* (необјављени подаци) је практично неодговарајућа без претходног одстрањивања фенола, што би било могуће употребом PVP-а приликом екстракције протеина (Veljović-Jovanović и сар., 2008).

Употреба 12% гела за раздвајање се показала повољном за јасно раздвајање протеина између 20 и 120 kDa. Раздвајање протеина мањих молекулских маса од 20 kDa би било могуће коришћењем веће концентрације полиакриламида, нпр. 14%. За протеине већих молекулских маса требало би продужити период инкубације у пуферу за екстракцију и повећати рН вриједност пуфера до рН 7,4 по протоколу Lakshmana и сарадника (2008). Визуализација протеинских трака са CBW 250 је била оптимална за

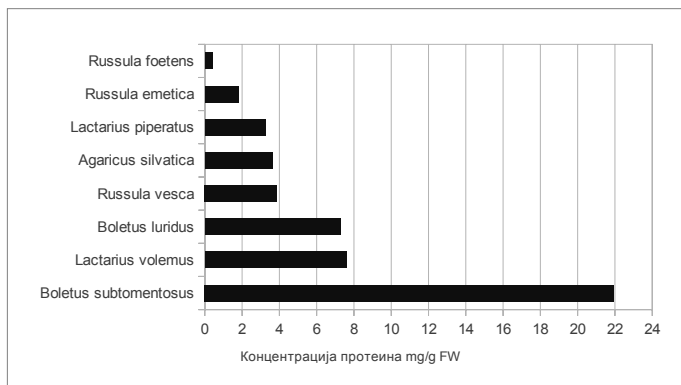
већину узорака, али не и у случају недовољне концентрације протеина у узорку какав је био случај код врста рода *Agaricus*.

Проблем недовољне концентрације протеина у узорку би се могао превазићи смањењем количине пуфера, нпр. 1ml на 0,5g узорка уз уклањање фенола са PVP-ом, или визуализацијом трака једном од осјетљивијих метода као што је бојење сребрним нитратом.

Табела 2. Концентрације протеина у узорцима плодноносних тијела гљива добијене након екстракције и одређене Lowry-методом.

РБ	Врста гљиве	Маса узорка	Запремина пуфера за екстракцију	Концентрација протеина mg/ml	Запремина узорка нанесеног на гел за електрофорезу (око 1,5µg [µl])	Концентрација протеина mg/g FW
1	<i>Boletus luridus</i>	0,54g	3ml	1,96	11	7,26
2	<i>Boletus edulis</i>	0,51g	3ml	-	40	-
3	<i>Boletus subtomentosus</i>	0,51g	3ml	5,6	10	21,96
4	<i>Lactarius volemus</i>	0,52g	2ml	2,96	10	7,59
5	<i>Russula foetens</i>	0,51g	2ml	0,15	40	0,39
6	<i>Lactarius piperatus</i>	0,55g	2ml	1,35	17	3,27
7	<i>Russula cyanoxantha</i>	0,52g	2ml	-	40	-
8	<i>Russula vesca</i>	0,51g	2ml	1,48	15	3,87
9	<i>Russula emetica</i>	0,51g	2ml	0,69	33	1,80
10	<i>Agaricus silvatica</i>	0,51g	2ml	1,39	16	3,63
11	<i>Agaricus bisporus</i>	0,51g	2ml	-	30	-

На гелу за SDS-електрофорезу узорак 10, *A. silvatica*, има слабо видљиве линије због мале концентрације протеина. Супротно је са узорцима 6 и 7, *L. piperatus* и *R. cyanoxantha*, гдје је концентрација протеина знатна и видљивост је на горњој граници. У случају превеликог наносења протеина на гел, углавном је довољно да се обезбојавање продужи неколико дана тако да траке буду јасно читљиве.



Слика 2. Концентрације екстахованих протеина по маси свијежег узорка (принос).

Ефикасност екстракције протеина за различите узорке гљива је доста различита што се може видјети на основу података датих у табели 2. Из табеле се види да узорци 6, 8 и 10, *L. piperatus*, *R. vesca* и *A. silvatica*, имају сличне концентрације добијене Lowry-ом методом, сличне су им запремине нанесене на гел, али видљивост им је у многоме различита (Слика 1). Видљивост траке врсте *L. piperatus* је пренаглашена, код *A. silvatica* траке су једва видљиве, док је видљивост *R. vesca* између ове двије вриједности. Оваква видљивост трака на гелу може да се тумачи присуством различите

количине фенола код наведених врста што доводи до разлика у читавању апсорбанце приликом одређивања протеина Lowry-ом методом.

ЗАКЉУЧАК

Екстракција протеина из плодноних тијела гљива је захтјевна процедура с обзиром на чврстину хитинозног ћелијског зида, тежње хифа да се згрудају и повишене активности протеолитичких ензима (Oshero и Gregory, 1998). Хомогенизација узорака гљива у течном азоту и употреба 0,1М Натријум-фосфатни пуфер за екстракцију (pH 6,4) који садржи 8М Уреу, 1% SDS, 2mM PMSF, 0,01М DTT и 1mM EDTA показала се најповољнија за врсте рода *Boletus*. Потребна је даља оптимизација протокола екстракције протеина из плодноних тијела представника фамилије *Agaricaceae* како би електрофореза ове и сродних фамилија била успјешнија. Могуће је да лиофилизација узорка прије хомогенизације, као и употреба детерџента и PVP-а у пуфери за екстракцију доведу до бољег приноса приликом екстракције протеина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Božac, R. (1989): Gljive naših krajeva. Grafički zavod Hrvatske. Zagreb.
2. Bridge, P.D., T. Kokubun, M.S.J Simmonds (2004): Protein extraction from fungi. ***Protein Purification Protocols, Methods in Molecular Biology***, 244: 37-46.
3. Guarro, J., J. Gené, A.M. Stchigel (1999): Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 12:454-500.
4. Lakshman, D.K. и сар. (2008): Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of *Rhizotonia solani*. *Mycologia*, 100 (6): 867-875.
5. Liu, H. и сар. (2010): Single-Step Affinity Purification for Fungal Proteomics. *Eucariotic Cell* 9 (5): 831-833.
6. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr, R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
7. Marin, D.P (2003): Biohemijska i molekularna sistematika biljaka. NNK Internacional, Beograd.
8. Milankov, V., P. Jakšić (2006): Metodologija naučno-istraživačkog rada u biološkim disciplinama. SIMBOL, Petrovaradin.
9. Natarajan, S. и сар. (2005): Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Analytical Biochemistry*, 342: 214–220.
10. Oshero, N., S.M. Gregory (1998): Optimization of protein extraction from *Aspergillus nidulans* for gel electrophoresis. *Fungal Generics Newsletter* 45:38-40.
11. Phillips, R. (2006): Mushrooms and other fungi of Great Britain and Europe. Pan Books LTD., London
12. Struszczyk, K. и сар. (2008): Isolation and purification of intracellular chitosanolytic enzymes of *Mucor circinelloides*. *Carbohydrate Polymers*, 78 (1):16-24.
13. Veljović-Jovanović, S., B. Kukavica, F. Navari-Izzo (2008): Characterization of polyphenol oxidase changes induced by desiccation of *Ramonda serbica* leaves. *Physiol Plant.* 132: 407-416.
14. Vujčić, Z. (2002): Eksperimentalna biohemija, praktikum. Rantec, Beograd.
15. Vukojević, J. (2000): Praktikum iz mikologije i Lihenologije. NNK Internacional, Beograd.
16. Whittaker, R. H. (1969): New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science.* 163:150-160.

Примљено: 31. 12. 2010.

Одобрено: 29. 11. 2011.