

Φροντιστήριο Βιοχημείας Ι



Ε.Φραγκοπούλου
Επίκουρη καθηγήτρια

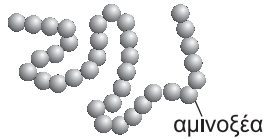
Πρωτεΐνες

Δράση στις εξής περιπτώσεις :

- Μεταφορά (αιμοσφαιρίνη)
- Αποθήκευση (φερριτίνη-Fe)
- Δομική στήριξη (κολλαγόνο)
- Συσταλτά συστήματα - κίνηση (μυοσίνη)
- Κατάλυση βιολογικών αντιδράσεων (ένζυμα)
- Άμυνα (ανοσοπρωτεΐνες)
- Ρύθμιση (ελέγχουν τη δράση ενζύμων, την έκφραση γονιδίων, κ.τα.λ)

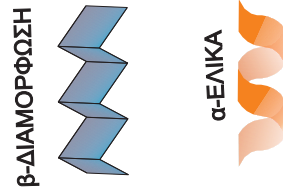
Πρωτεΐνες - Δομή

ΠΡΩΤΟΤΑΓΗΣ



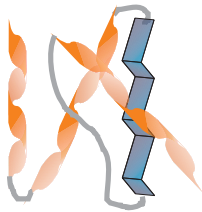
Αριθμός, είδος και αλληλουχία αμινοξέων

ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗΣ



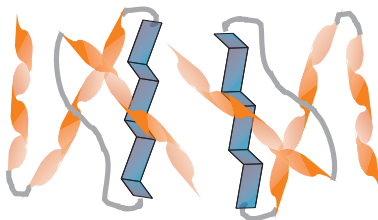
Σχετική διάταξη γειτονικών αμινοξέων στο χώρο

ΤΡΙΤΟΤΑΓΗΣ



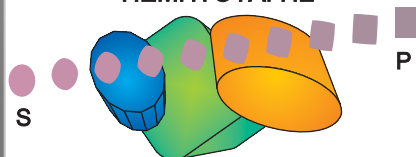
Διάταξη της πρωτεΐνης στο χώρο

ΤΕΤΑΡΤΟΤΑΓΗΣ



Αριθμός, είδος και διάταξη πολυπεπτιδικών αλυσίδων στο χώρο

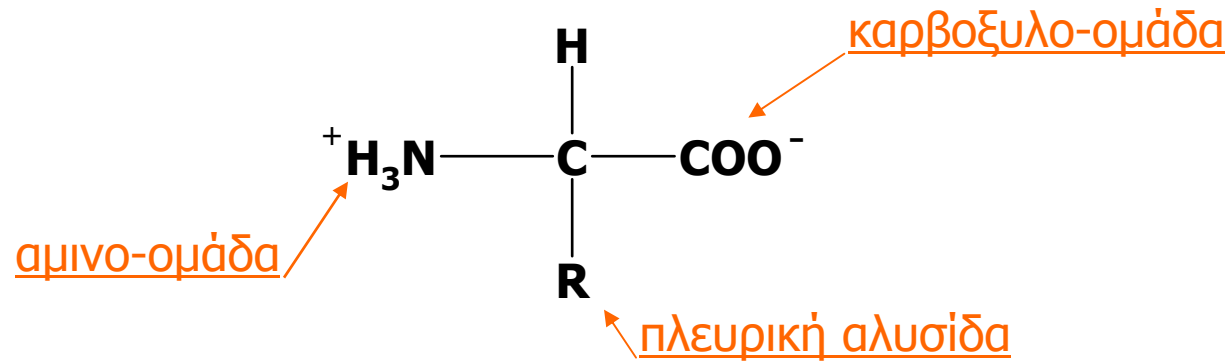
ΠΕΜΠΤΟΤΑΓΗΣ



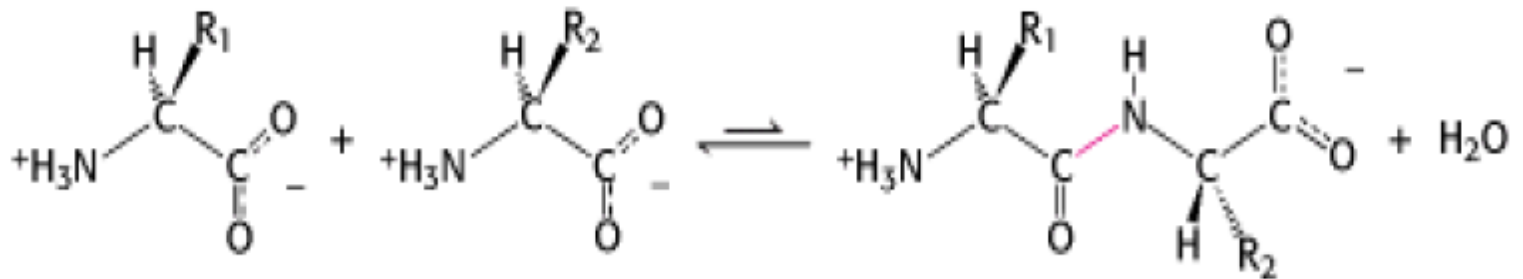
Αριθμός, είδος και διάταξη πρωτεϊνών στο σύμπλεγμα

Πρωτεΐνες - Δομή

Αμινοξύ :



Πεπτιδικός δεσμός :



Μελέτη πρωτεϊνών

➤ Μελέτη δομής

- Μοριακό βάρος
- 1γης είδος-αλληλουχία αμινοξέων
- 2γης, 3γης δομή στο χώρο
- 4γης πόσες και ποιές υπομονάδες
- 5γης ανήκει σε πολυπρωτεϊνικό σύστημα

➤ Μελέτη λειτουργίας

- Καθορισμός βιολογικής δράσης (εμπλοκή στο μεταβολισμό κ.τ.λ)
- Σχέση δομής - βιολογικής δράσης
- Κατανομή σε ιστούς, κύτταρα και υποκυτταρικά σωματίδια
- Ρύθμιση βιολογικής δράσης

Μελέτη πρωτεϊνών

**Επιλογή
δείγματος**

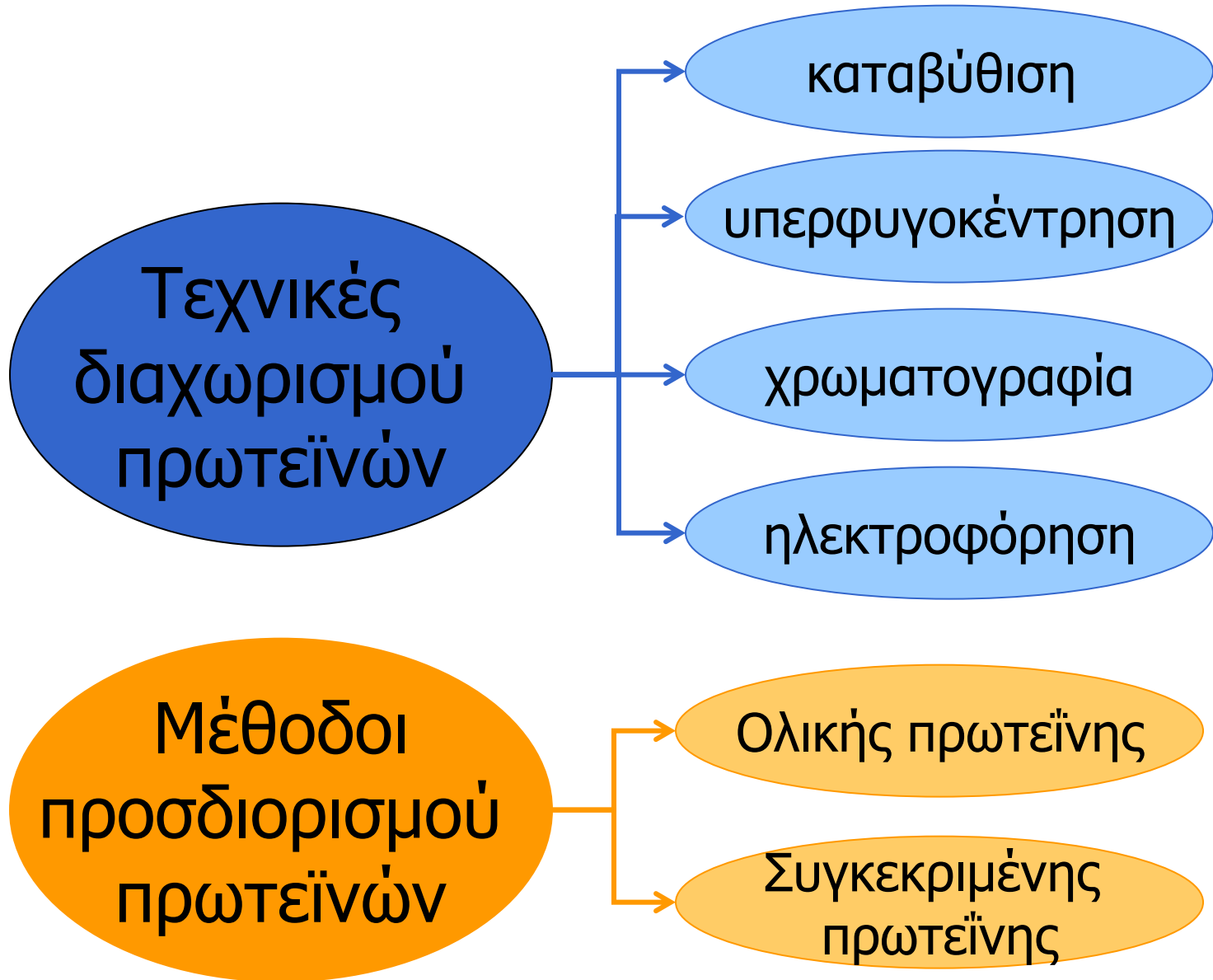
Κύτταρα
Ιστός
Βιολογικά υγρά

**Εκχύλιση
ομογενοποίηση**

Ρυθμιστικό δ/μα
Διάλυμα άλατος
Μίξερ, πότερ



Μελέτη πρωτεϊνών



Μελέτη πρωτεϊνών

- Μέθοδο για τον προσδιορισμό της προς μελέτη πρωτεΐνης
- Μέθοδο προσδιορισμού ολικής πρωτεΐνης

Table 7. A Summary of treatments used for the purification of inulinase I From *Thielavia terrestris* grown on Chicory roots with yeast extract.

Treatment	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg ⁻¹ protein)	Recovery %	Purification (folds)
*C.F.F. (Volume = 200 ml)	112.6	435	3.86	100	1.0
**C.F.D.	112.0	411	3.67	94.5	0.95
***C.F.P. [1:1 isopropanol]	34.3	376	10.96	86.4	2.8
Gel filtration (Sephadex G-100)	5.1	301	59.02	69.2	15.1
Ion-exchange chromatography DEAE-Cellulose	1.02	260	254.9	59.8	66.0

* C.F.F. - Cell-Free Filtrate.

** C.F.D. - Cell-Free Dialysate.

*** C.F.P. - Cell-Free Precipitate

Τεχνικές Διαχωρισμού των πρωτεϊνών

Καταβύθιση

- Διαφορετική διαλυτότητα των πρωτεϊνών στον επιλεγμένο διαλύτη (συνήθως H_2O)
- Η αναλογία υδρόφοβων και υδρόφιλων περιοχών καθορίζει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης

πολικές αλληλεπιδράσεις με το H_2O

ιοντικές αλληλεπιδράσεις με τα ιόντα

απωθητικές δυνάμεις μεταξύ όμοιων φορτίων

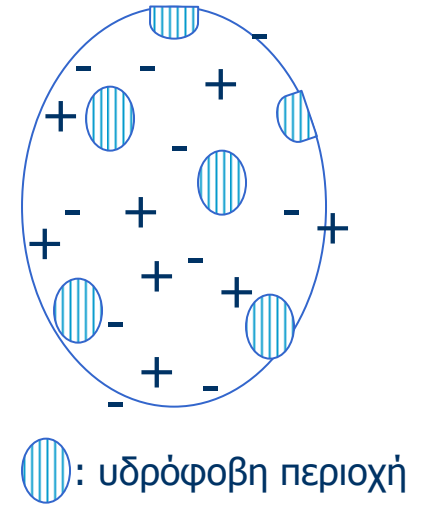
ελκτικές δυνάμεις μεταξύ ανόμοιων φορτίων

- Αλλαγή στο pH ή στην ιοντική ισχύ του διαλύματος οδηγεί στην καταβύθιση κάποιων πρωτεϊνών ενώ κάποιες άλλες παραμένουν διαλυμένες

Ισοηλεκτρική καταβύθιση: ουδέτερα μόρια => όχι απωθητικές δυνάμεις => καταβύθιση

Salting in: ↓ [άλατος] (0-0,5 M) => αύξηση της διαλυτότητας

Salting out : ↑ [άλατος] (>1M) => μείωση της διαλυτότητας



ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΑΓΗ ΣΤΟ PH

Η ← ΜΙΓΜΑ
ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

↓ ΡΥΘΜΙΣΗ PH: 5

ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ
ΜΕ $pI = 5$

↓ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

ΙΣΗΜΑ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ
ΜΕ $pI = 5$ → ΙΣΗΜΑ

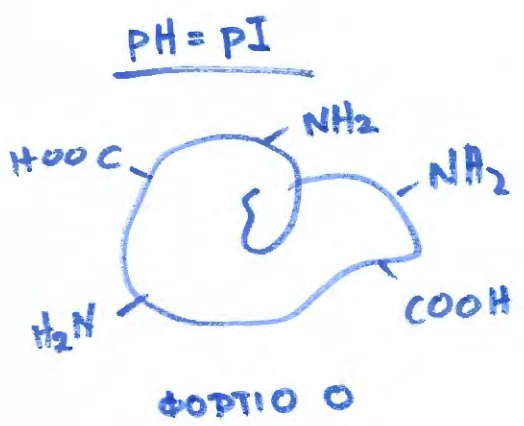
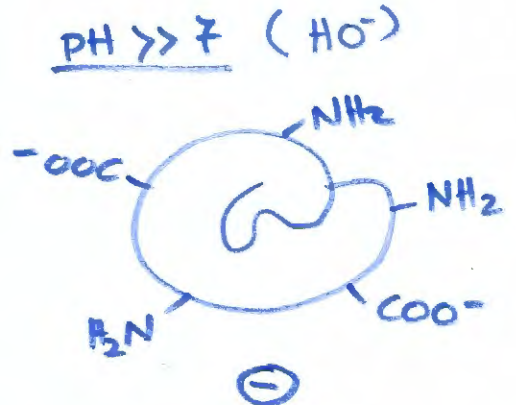
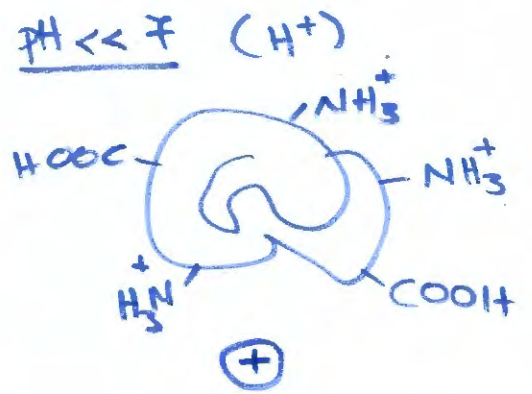
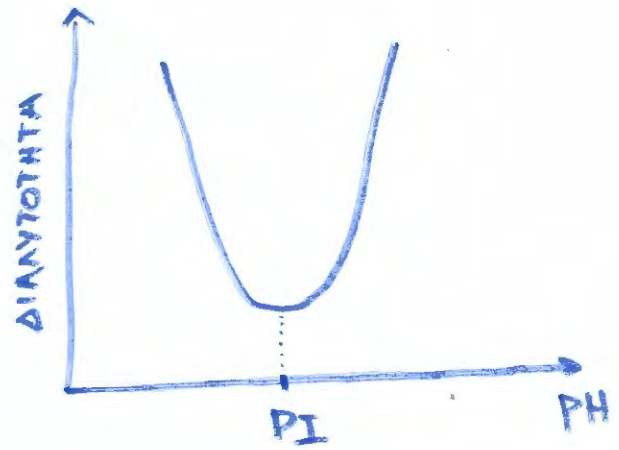
↓ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ
ΡΥΘΜΙΣΗ PH: 6

↓ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ
ΜΕ $pI = 6$

↓ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

ΙΣΗΜΑ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ
ΜΕ $pI = 6$

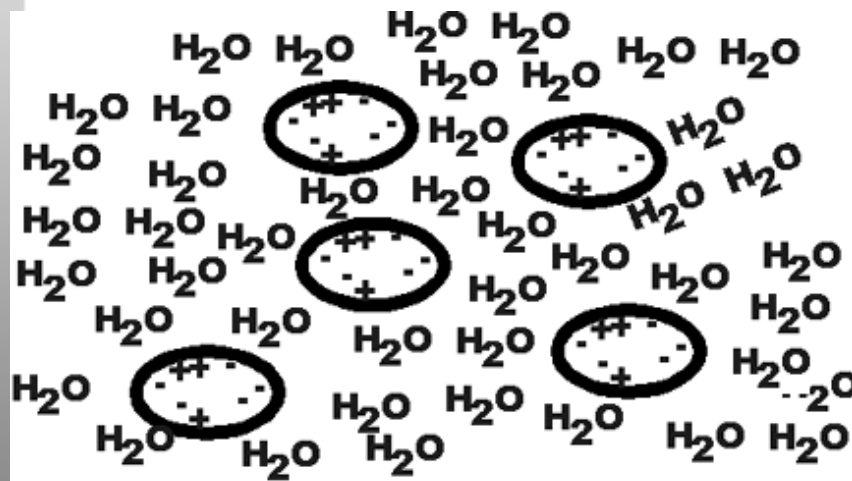
↓ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ
ΡΥΘΜΙΣΗ PH: 7



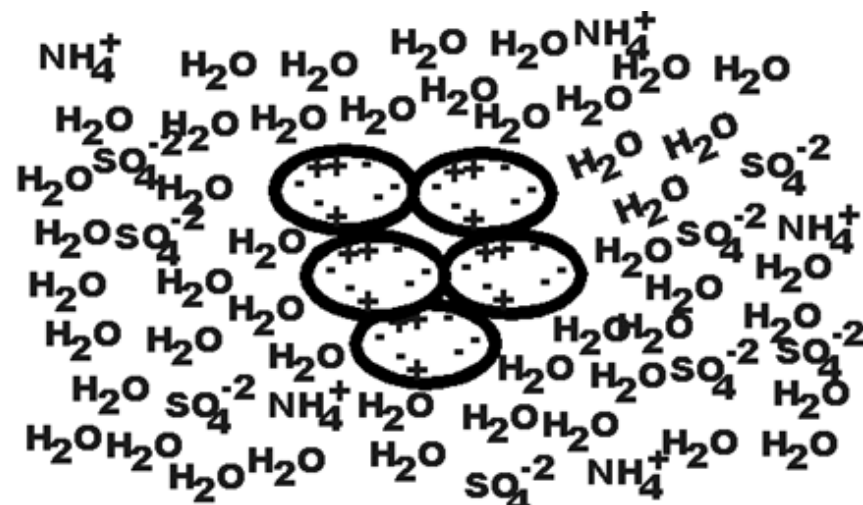
Τεχνικές Διαχωρισμού των πρωτεϊνών

Καταβύθιση

Salting out : $\uparrow$ [άλατος] ($>1M$) $\Rightarrow$ μείωση της διαλυτότητας



Protein Dissolved in Water

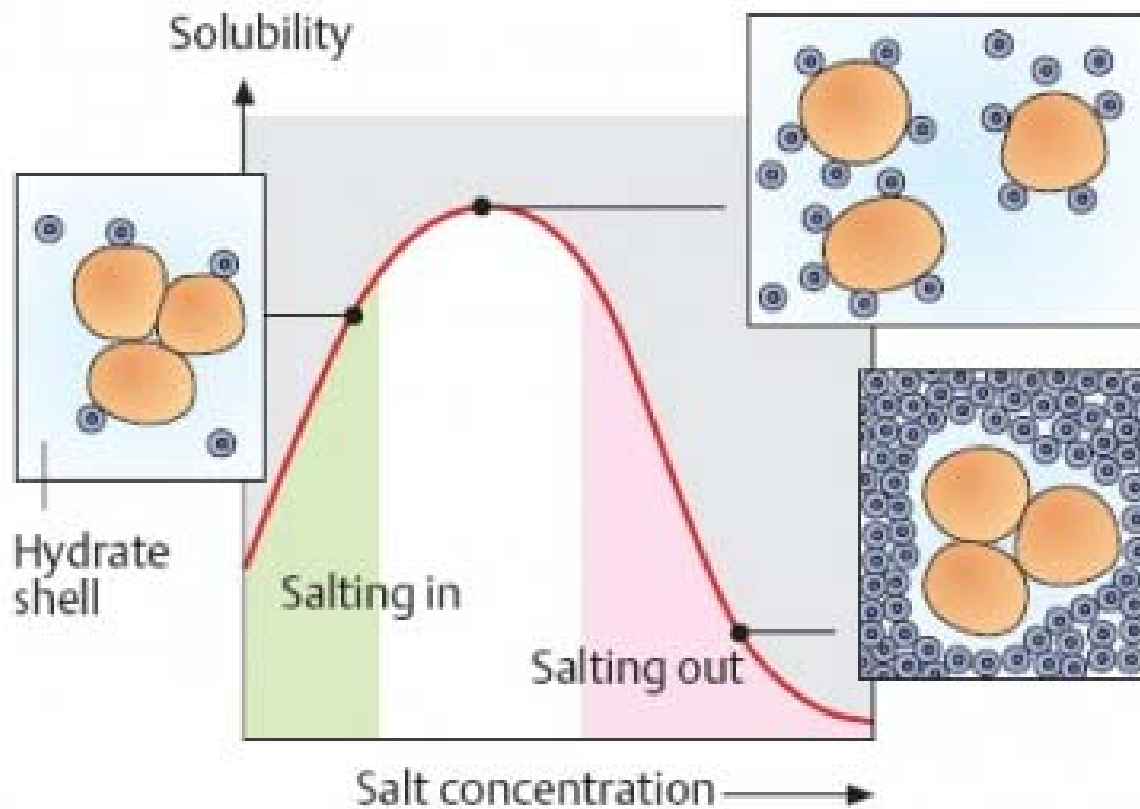


Protein in Ammonium Sulfate

Τεχνικές Διαχωρισμού των πρωτεϊνών

Καταβύθιση

Salting in: ↓ [άλατος] (0-0,5 M) => αύξηση της διαλυτότητας



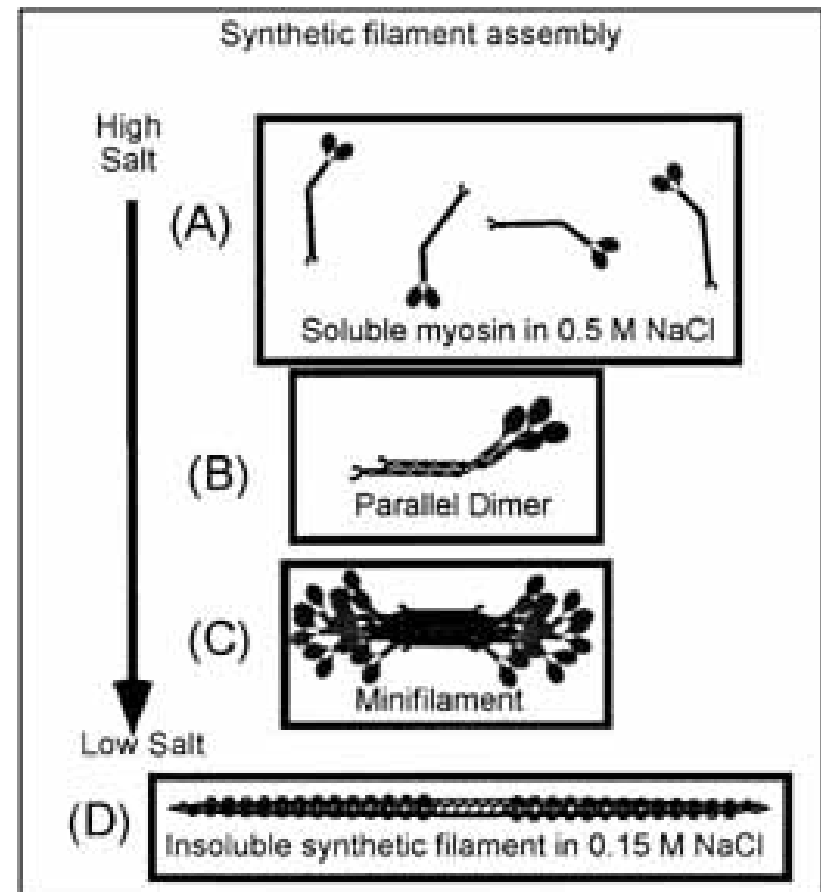
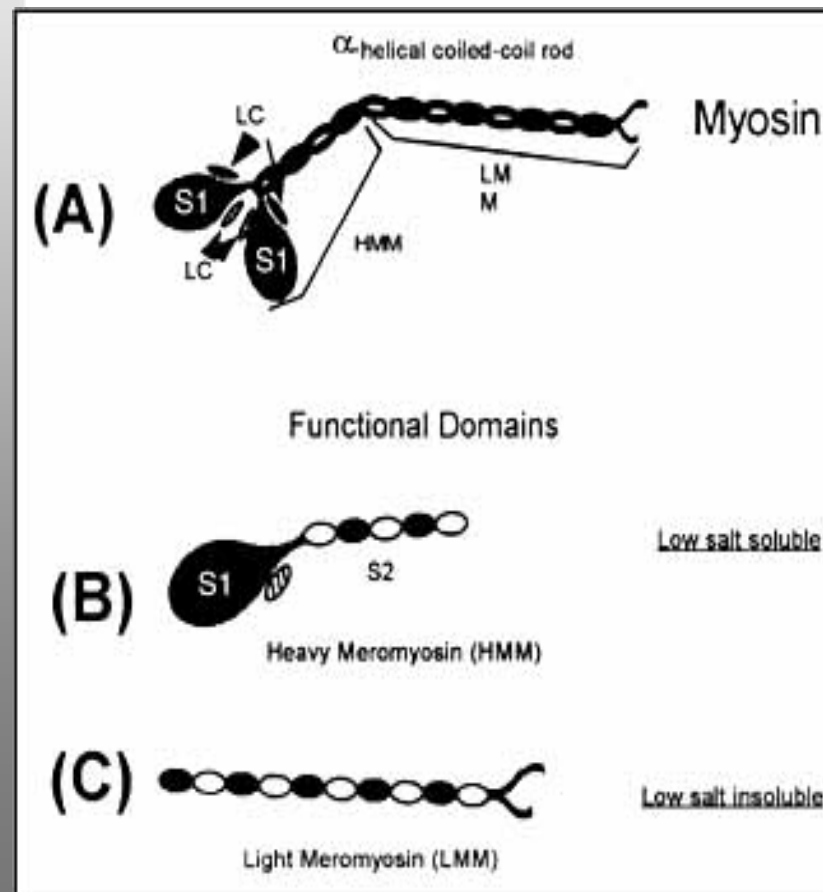
Τεχνικές Διαχωρισμού των πρωτεϊνών

Καταβύθιση

Μυς μοσχαριού (κιμά μοσχαρίσιο)

=> εκχύλιση μυοσίνης σε 0,5 M KCl (αύξηση της διαλυτότητας)

=> καταβύθιση μυοσίνης σε 0,05 M KCl (μείωση της διαλυτότητας)



ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΟΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΙΜΑ

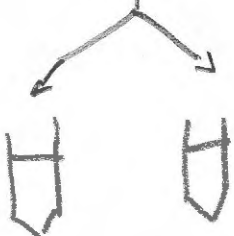
~ 3 gr κίμα
↓ ⊕ 10 ml κελ 0,5M

ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ
ΜΙΞΕΡ

↓
ΔΙΗΘΗΣΗ



↓ + 80 ml παγωμένο H₂O



ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ
3000 rpm, 10 min

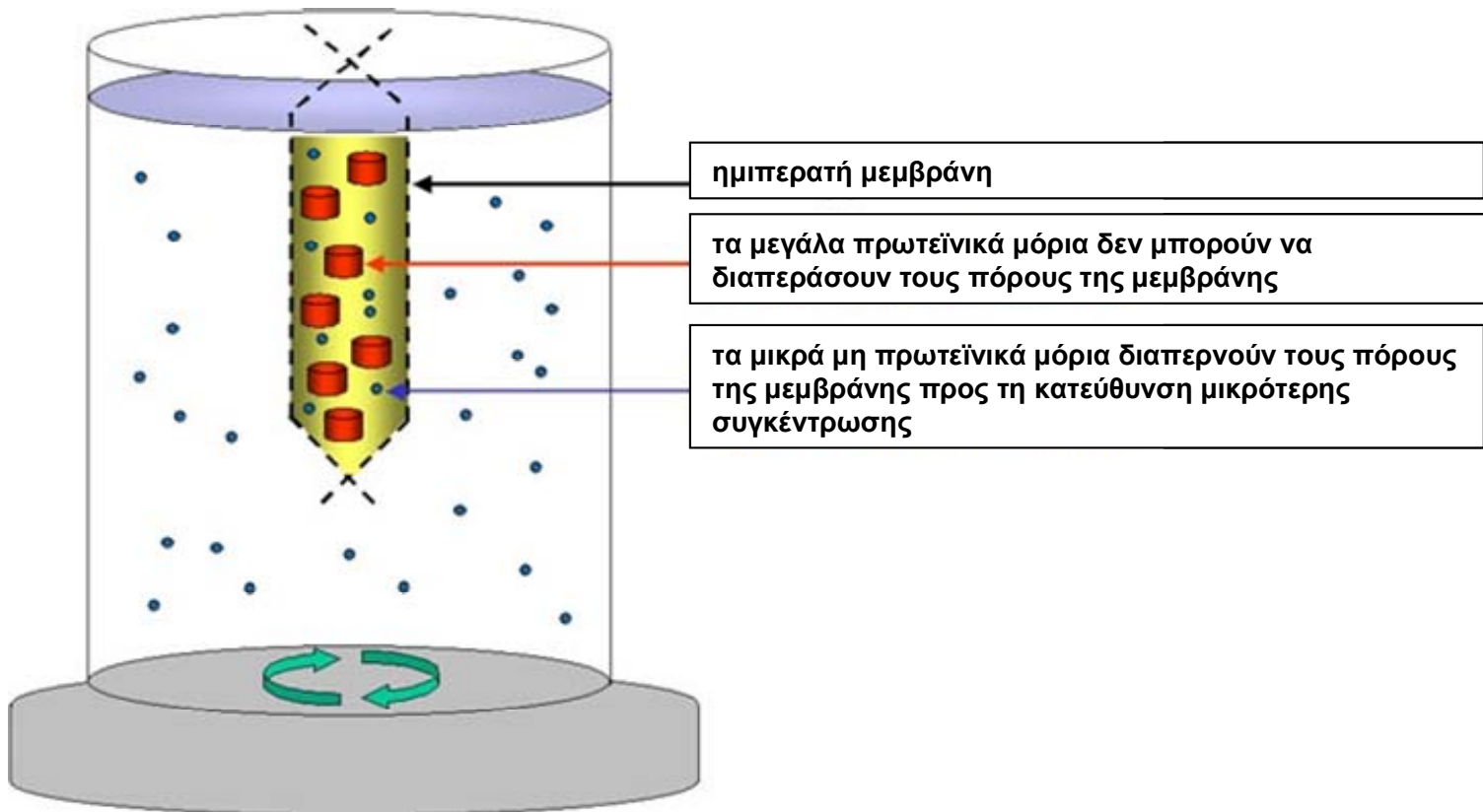


ΑΠΟΧΥΣΗ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ
ΔΙΑΛΥΣΗ ΙΖΗΜΑΤΟΣ
ΣΕ 0,5M ΚΕΛ

Τεχνικές Διαχωρισμού των πρωτεϊνών

Διαπύδιση

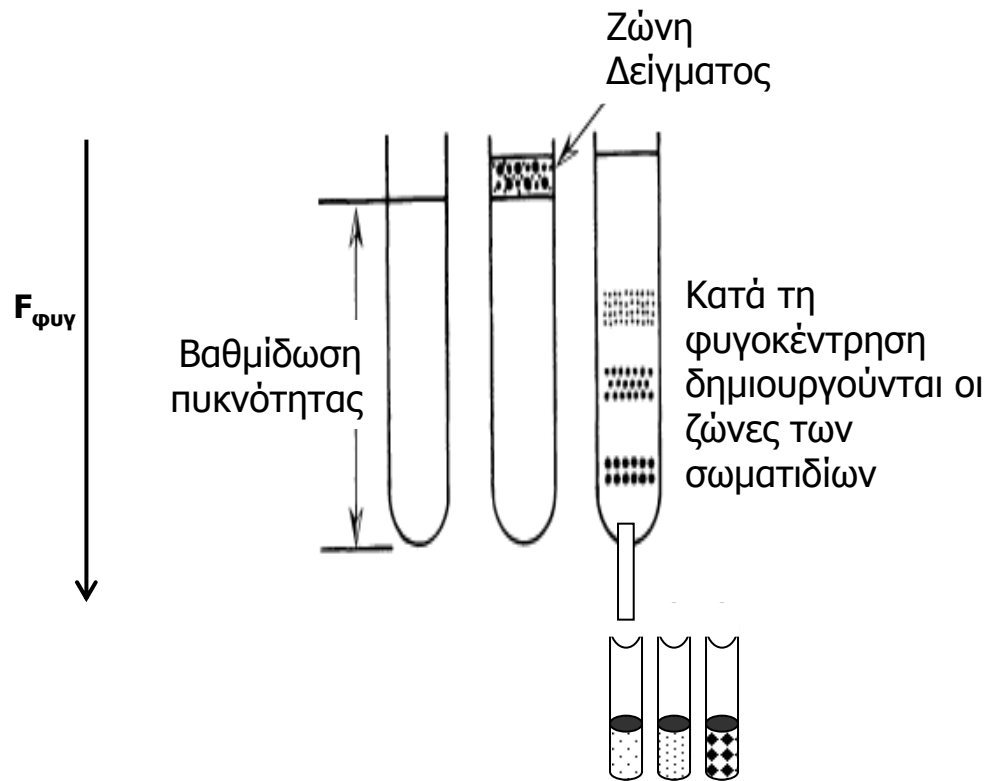
Διαχωρισμός πρωτεϊνών από μικρά μόρια με διαπίδυση διαμέσου ημιπερατής μεμβράνης



Τεχνικές Διαχωρισμού των πρωτεϊνών

Φυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας

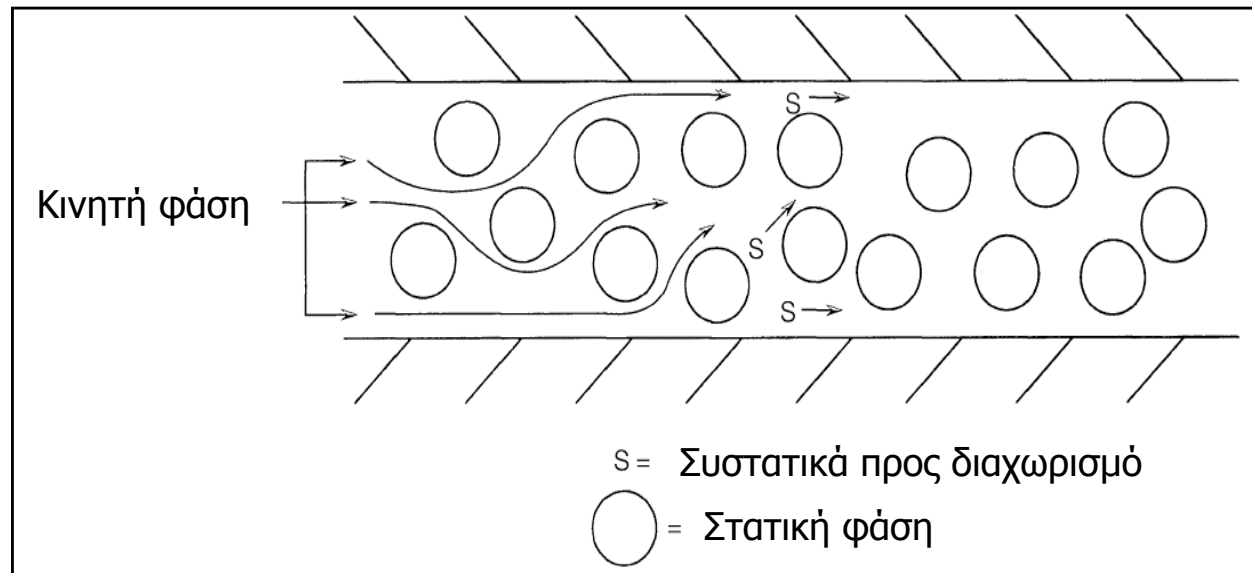
Διαχωρισμός πρωτεϊνών βάση της διαφορετικής τους πυκνότητας



Τεχνικές Διαχωρισμού των πρωτεϊνών

Χρωματογραφία

Περιλαμβάνει μια πληθώρα τεχνικών που στόχο έχουν να διαχωρίσουν τα μίγματα στα επιμέρους συστατικά τους



Τεχνικές Διαχωρισμού των πρωτεϊνών

Χρωματογραφία

Στη μελέτη των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται κυρίως χρωματογραφία στήλης

«**πακετάρισμα**»: η τοποθέτηση του προσροφητικού υλικού στη στήλη

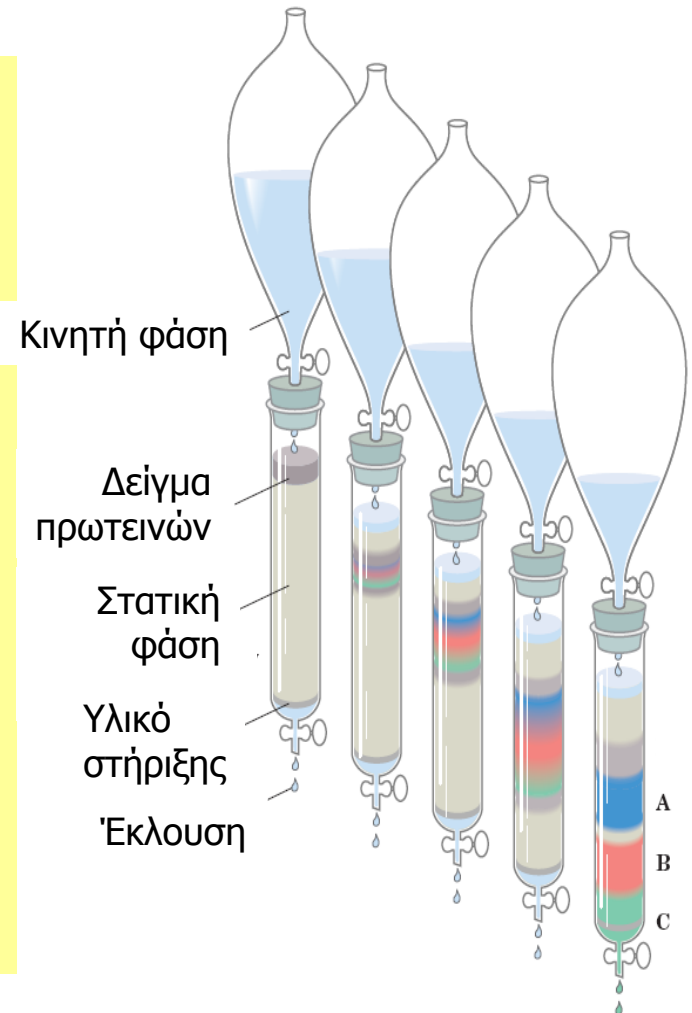
«**φόρτωμα**»: η τοποθέτηση του δείγματος στη στήλη

«**έκλουση**»: η μετακίνηση της κινητής φάσης και των συστατικών κατά μήκος της στήλης

«**όγκος στήλης**»: ο συνολικός όγκος της κινητής φάσης και της στατικής ονομάζεται

«**νεκρός όγκος**»: ο όγκος μόνο της κινητής φάσης (του υγρού)

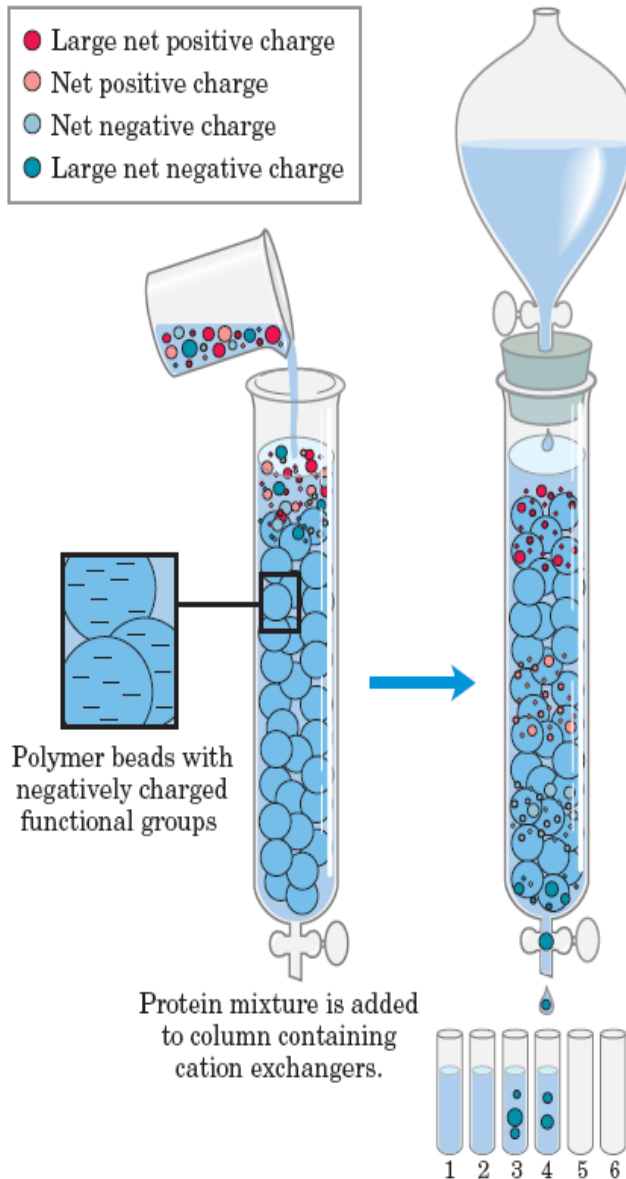
«**όγκος έκλουσης**»: ο όγκος της κινητής φάσης που χρειάζεται για να εξέλθει ένα συστατικό από τη στήλη ονομάζεται



Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

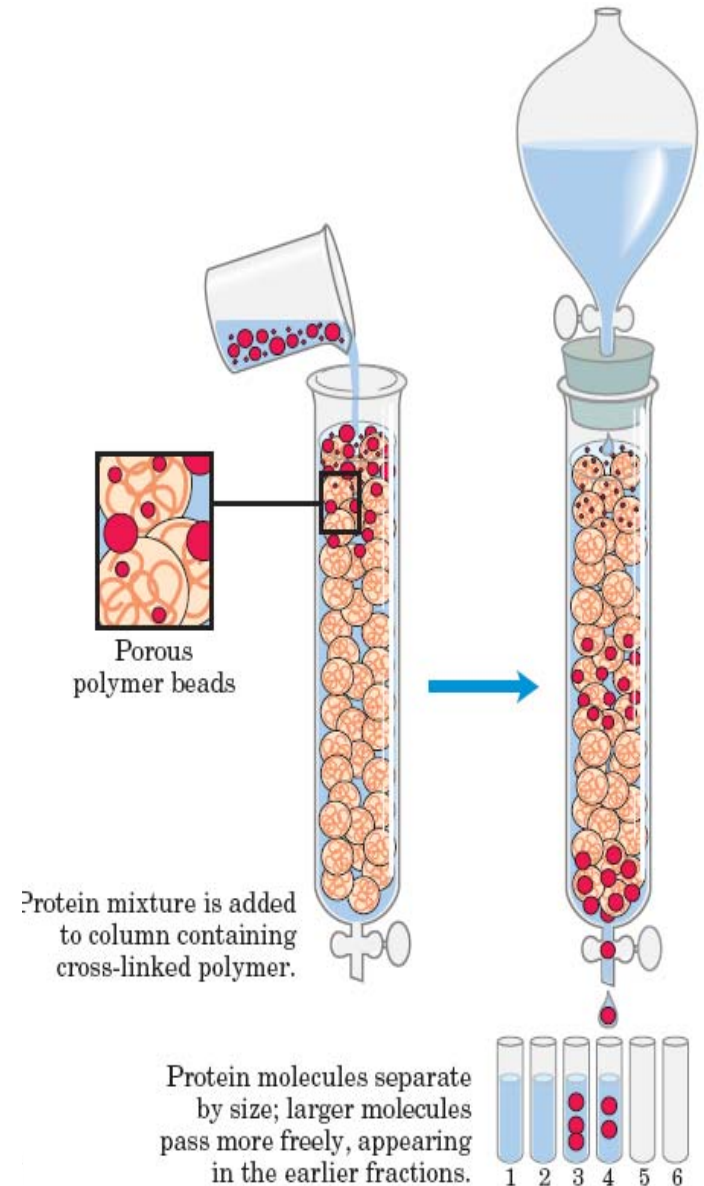
Διαχωρισμός με βάση το φορτίο

- Large net positive charge
- Net positive charge
- Net negative charge
- Large net negative charge



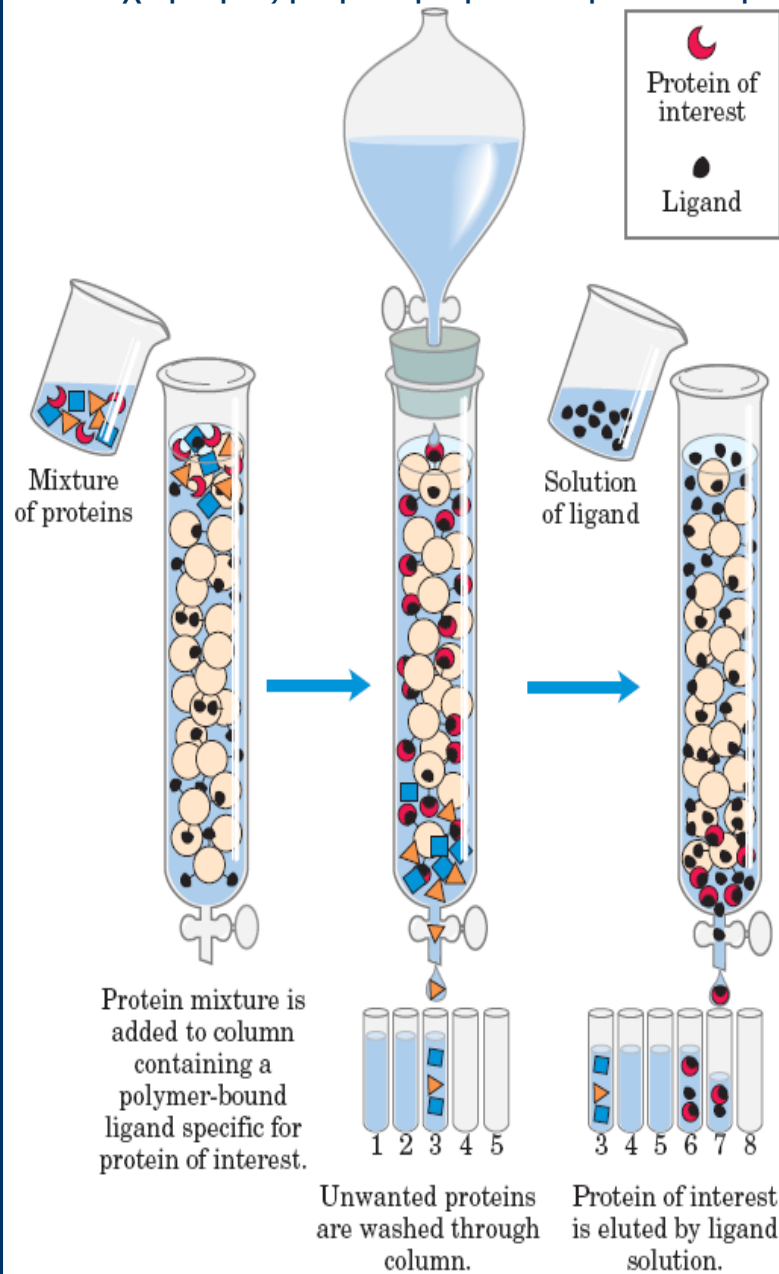
Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Διαχωρισμός με βάση το μέγεθος



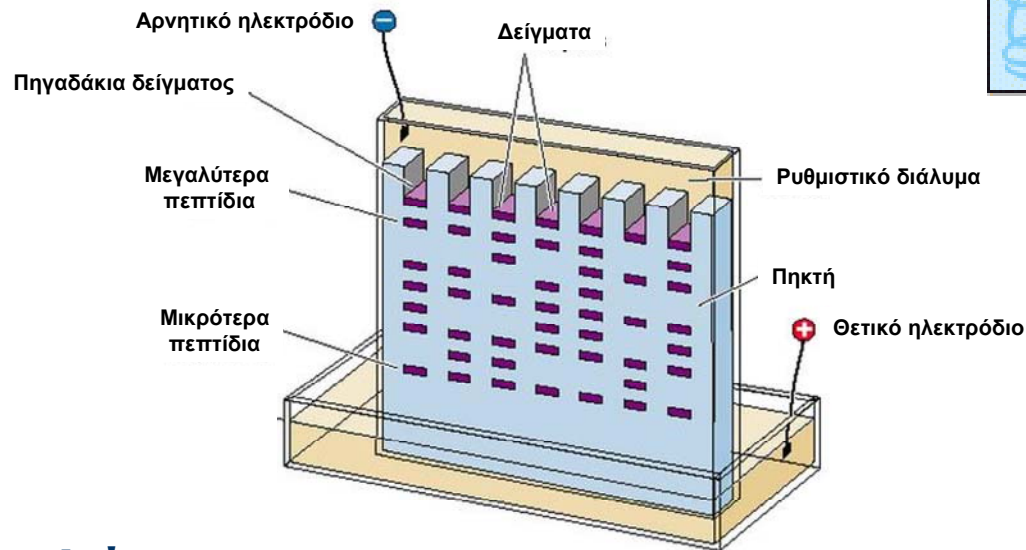
Χρωματογραφία συγγένειας

Διαχωρισμός με βάση την ειδική σύνδεση



Τεχνικές Διαχωρισμού των πρωτεϊνών

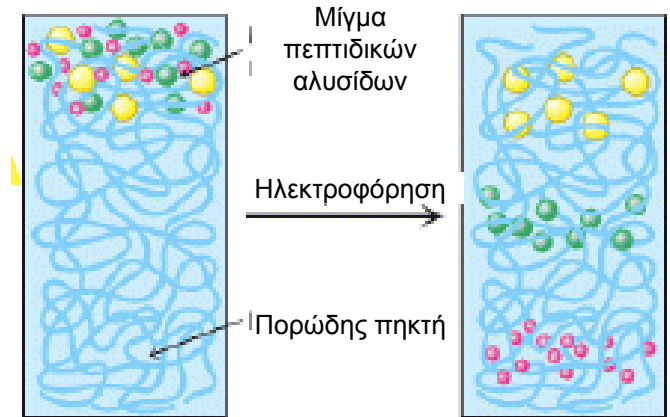
Ηλεκτροφόρηση



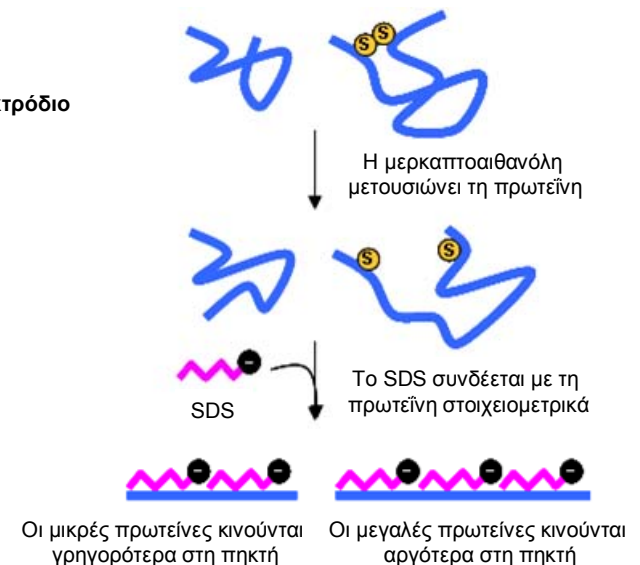
Ανίχνευση:

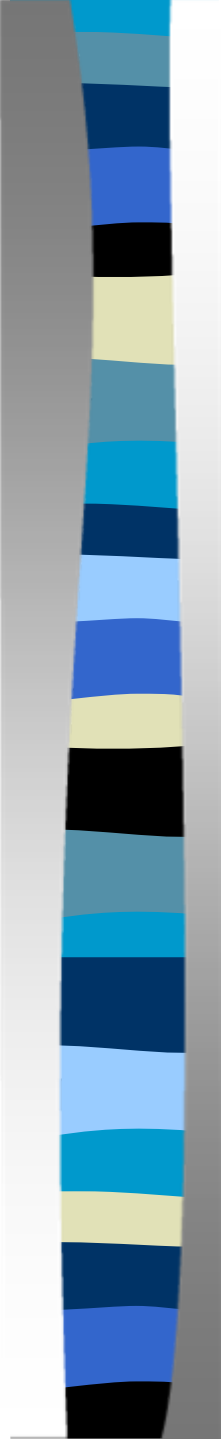
- χρωστική coomassie blue
- άργυρο
- ανοσοαποτύπωση

Μη αποδιατακτική



Αποδιατακτική





Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών

Α. Ολικής πρωτεΐνης

Για να εφαρμόσουμε τις μεθόδους προσδιορισμού πρέπει να κάνουμε τις εξής παραδοχές :

- Όλα τα πρωτεϊνικά μόρια είναι καθαρές πεπτιδικές αλυσίδες περιέχουν 16% w.w. Άζωτο
- Όλες οι πρωτεΐνες αντιδρούν με τον ίδιο χημικό τρόπο

Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών

Άμεσα => μέτρηση της A

στα 280 nm, αρωματικά αμινοξέα (*θρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη*)

- διαλύματα 1mg/ml => $A = 0,4-1,5$ ανάλογα με την περιεκτικότητα στα αρωματικά αμινοξέα
- πλεονέκτημα => απλή, δεν καταστρέφεται το δείγμα
- μειονέκτημα => παρεμπόδιση από νουκλεϊνικά οξέα (260 nm), κάθε πρωτεΐνη έχει διαφορετικό ϵ

στα 190 (205) nm, πεπτιδικός δεσμός

- πλεονεκτήματα => απλή, δεν καταστρέφεται το δείγμα, μικρές διαφορές ανάμεσα στις διαφορετικές πρωτεΐνες
- μειονεκτήματα => είναι δύσκολο να δουλεύεις σε αυτή περιοχή του UV, διάφορες άλλες ενώσεις (π.χ. αίμη) απορροφούν στα 190-210 nm

Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών

Έμμεσα => με χρήση χημικών αντιδραστηρίων

- μέτρηση του αζώτου

Μέθοδος Kjeldahl

Μετατροπή του πρωτεϊνικού αζώτου σε ιόν αμμωνίου παρουσία ισχυρών οξέων, μέτρηση του αζώτου με τιτλοδότηση

$$C_{\text{πρωτεΐνης}} = C_{\text{αζώτου}} \times 6,25 \quad (100/16=6,250)$$

- σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος => μέτρηση της A

Μέθοδο διουρίας

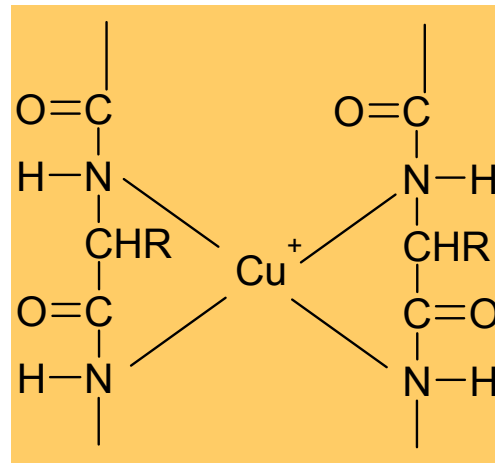
Μέθοδο Lowry

Μέθοδο Bradford

Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών

Μέθοδο διουρίας

Ο Cu^{2+} σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζει σύμπλοκο (*ελαφρά ιώδες χρώμα*) με τους πεπτιδικούς δεσμούς και ανάγεται σε Cu^+



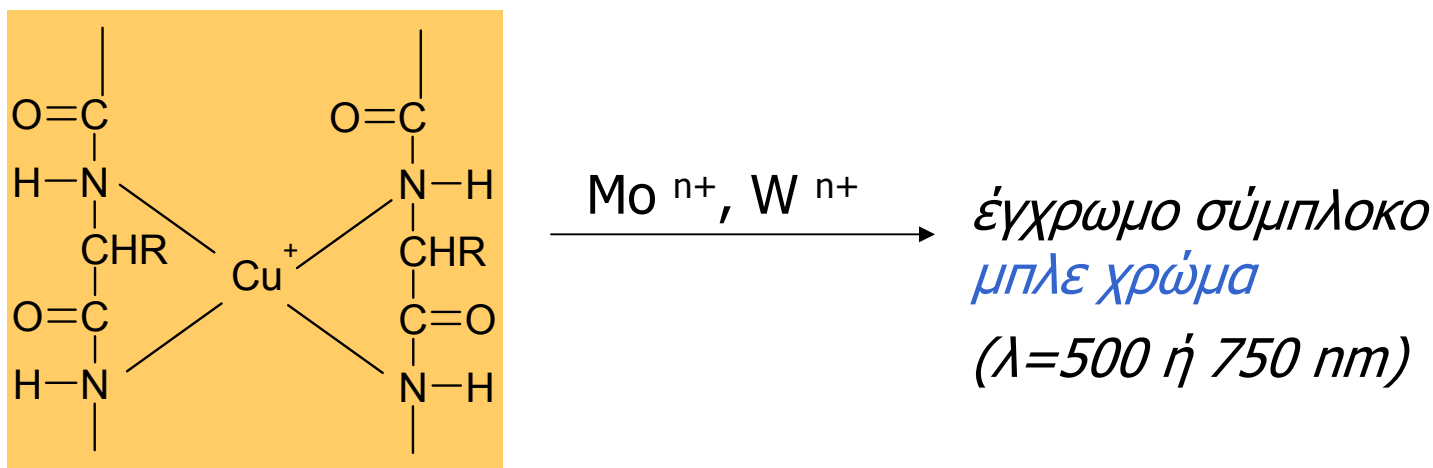
- πλεονεκτήματα => γρήγορη, όλες οι πρωτεΐνες παρόμοια συμπεριφορά
- μειονεκτήματα => καταστρέφεται το δείγμα, ανιχνεύει 0,1-1mg πρωτεΐνης

Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών

Μέθοδο Lowry (βελτίωση της μεθόδου της διουρίας)

προστίθεται το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu το οποίο περιέχει φωσφομολυβδαινικό-βολφραμικό οξύ

το σύμπλοκο Cu^+ -τυροσίνη ή θρυπτοφάνη των πρωτεϊνών ανάγουν τα μολυβδαινικά και τα βολφραμικά και οξειδώνονται τα αρωματικά αμινοξέα



- πλεονεκτήματα => γρήγορη, ανιχνεύει 20 – 100 μg πρωτεΐνης, επιλογή λ ανάλογα με το πόσο πυκνό είναι το δ/μα
- μειονεκτήματα => καταστρέφεται το δείγμα, εξαρτάται από τον αριθμό των αρωματικών αμινοξέων

Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών

Μέθοδο Bradford

Η χρωστικής Coomassie blue G250 σε όξινο περιβάλλον δεσμεύεται στις πρωτεΐνες.

Η χρωστική έχει διαφορετικές μορφές ιονισμού σε όξινο περιβάλλον: θετικά φορτισμένες: **κόκκινη μορφή** ($\lambda_{\max}=470 \text{ nm}$), **πράσινη μορφή** ($\lambda_{\max}=650 \text{ nm}$)

αρνητικά φορτισμένα: **μπλε μορφή** ($\lambda_{\max}=590 \text{ nm}$)

Η μπλε μορφή δεσμεύεται στις πρωτεΐνες (κυρίως λυσίνη αργινίνη)
=> μέτρηση στα 595 nm

- πλεονεκτήματα => γρήγορη, ανιχνεύει 1 – 10 μg πρωτεΐνης
- μειονεκτήματα => καταστρέφεται το δείγμα, εξαρτάται από τον αριθμό των κατιονικών αμινοξέων

Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών

Β. Συγκεκριμένης πρωτεΐνης

Μέτρηση του προϊόντος της αντίδρασης

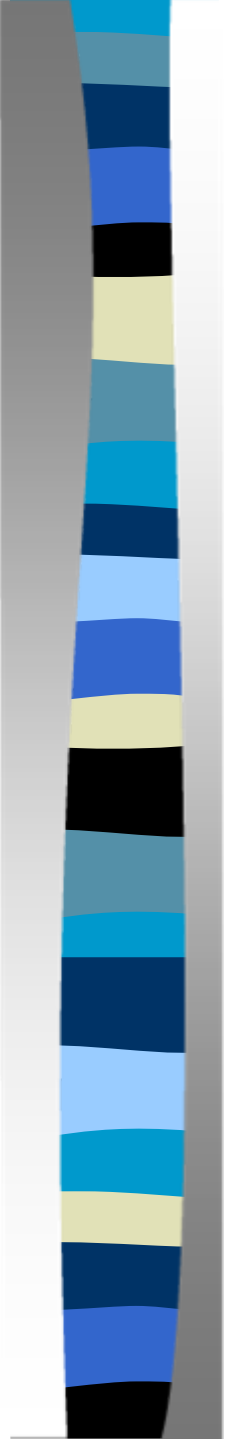
Εάν η προσδιοριζόμενη πρωτεΐνη είναι ένζυμο τότε προσδιορισμός μπορεί να γίνει έμμεσα με προσδιορισμό του προϊόντος της αντίδρασης



Η μέτρηση του P μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους π.χ. με φασματοφωτομετρία

Η ποσότητα του P που παράγεται είναι ανάλογη της ποσότητας του ενζύμου

■ πλεονεκτήματα => μεγάλη εξειδίκευση



Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών

Β. Συγκεκριμένης πρωτεΐνης

Ανοσοχημικές μέθοδοι

Χρήση αντισωμάτων (ανοσοσφαιρίνες), εξειδικευμένες πρωτεΐνες που συνθέτει ο οργανισμός για να δεσμεύσει ένα αντιγόνο

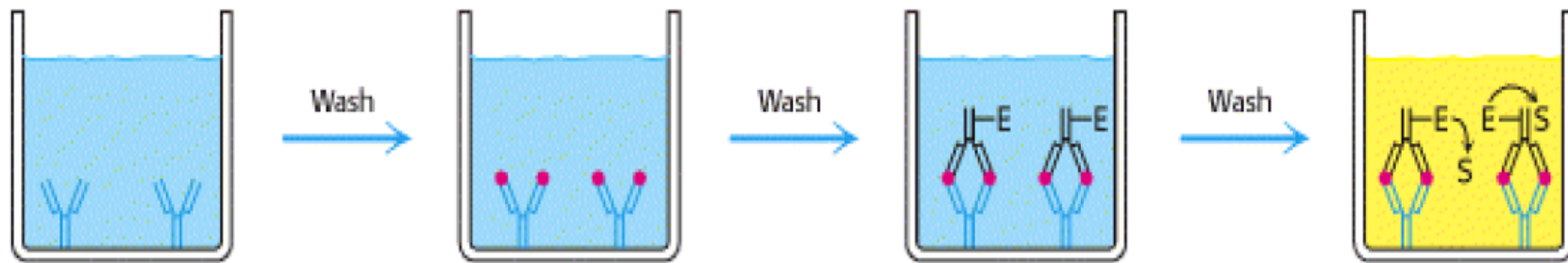
- ραδιοανοσολογικοί προσδιορισμοί
(χρήση επισημασμένων με ραδιενέργεια αντισωμάτων)
 - ανοσοφθορισμομετρικοί
(χρήση αντισωμάτων που περιέχουν ομάδα φθορισμού)
 - ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί
(χρήση αντισωμάτων που περιέχουν ένζυμο)
- πλεονέκτημα => μεγάλη εξειδίκευση, ανιχνεύει ng πρωτεΐνης
 - μειονέκτημα => μεγάλο κόστος

ELISA

(enzyme-linked immunosorbent assay)

τύπου sandwich:

E: ένζυμο
S: υπόστρωμα



Αντίσωμα
ακίνητοποιημένο
σε στερεή
επιφάνεια

Το αντιγόνο
(προσδιοριζόμενη
πρωτεΐνη)
δεσμεύεται στο
αντίσωμα

Το δεύτερο
αντίσωμα
(περιέχει το E)
δεσμεύεται στο
αντιγόνο

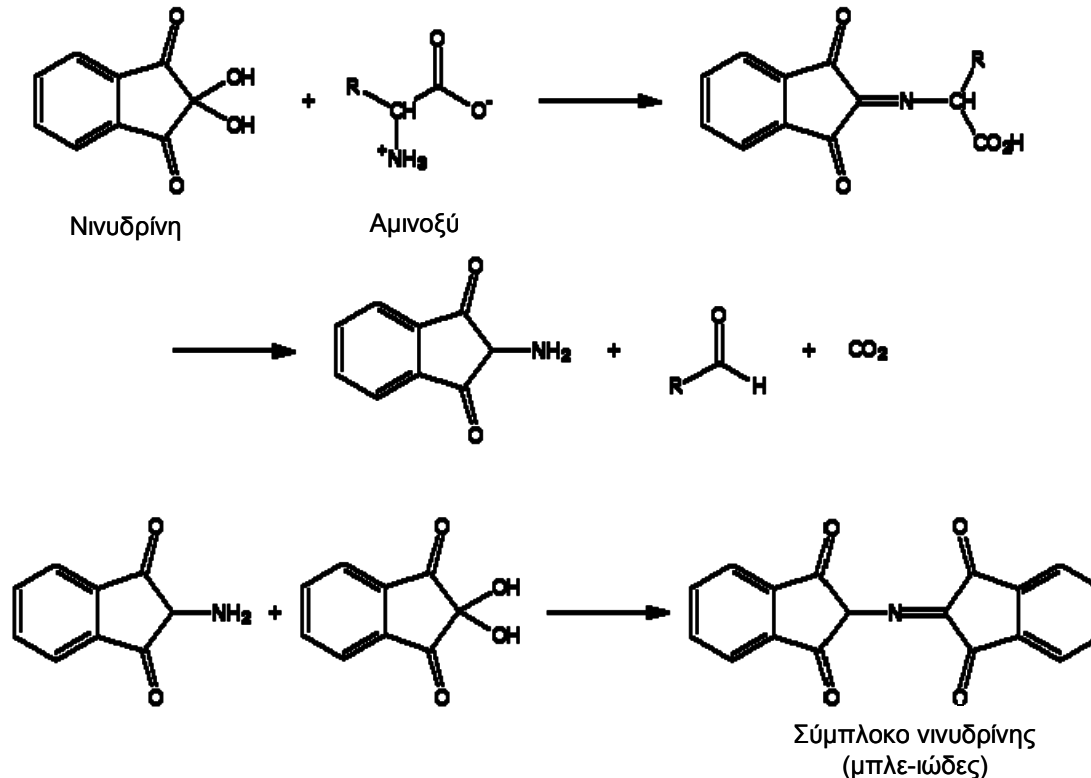
Προστίθεται το
S το οποίο
μετατρέπεται
στο έγχρωμο
προϊόν με τη
δράση του
ενζύμου

Φωτομέτρηση του έγχρωμου προϊόντος => το χρώμα είναι ανάλογο της προσδιοριζόμενης πρωτεΐνης

Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών

Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με χαρακτηριστικές χημικές αντιδράσεις

Αντίδραση νινυδρίνης

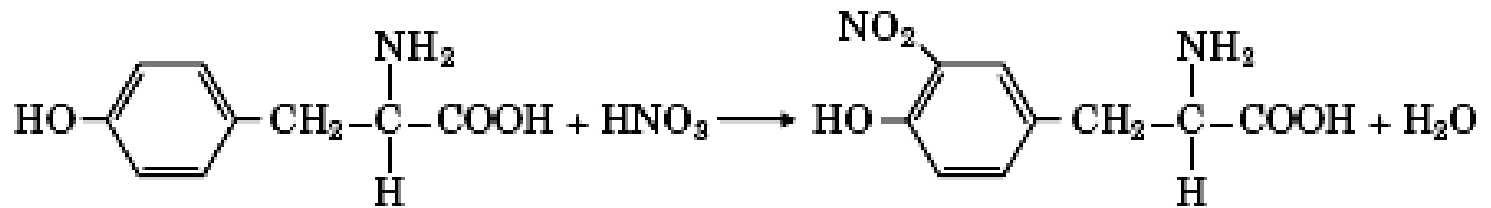


Η νινυδρίνη μπορεί να αντιδράσει με τις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων και των πρωτεϊνών και να προκύψει ένα σύμπλοκο με έντονο μπλε-ιώδες χρώμα.

Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών

Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με χαρακτηριστικές χημικές αντιδράσεις

Αντίδραση Ξανθοπρωτεΐνης



Τυροσίνη

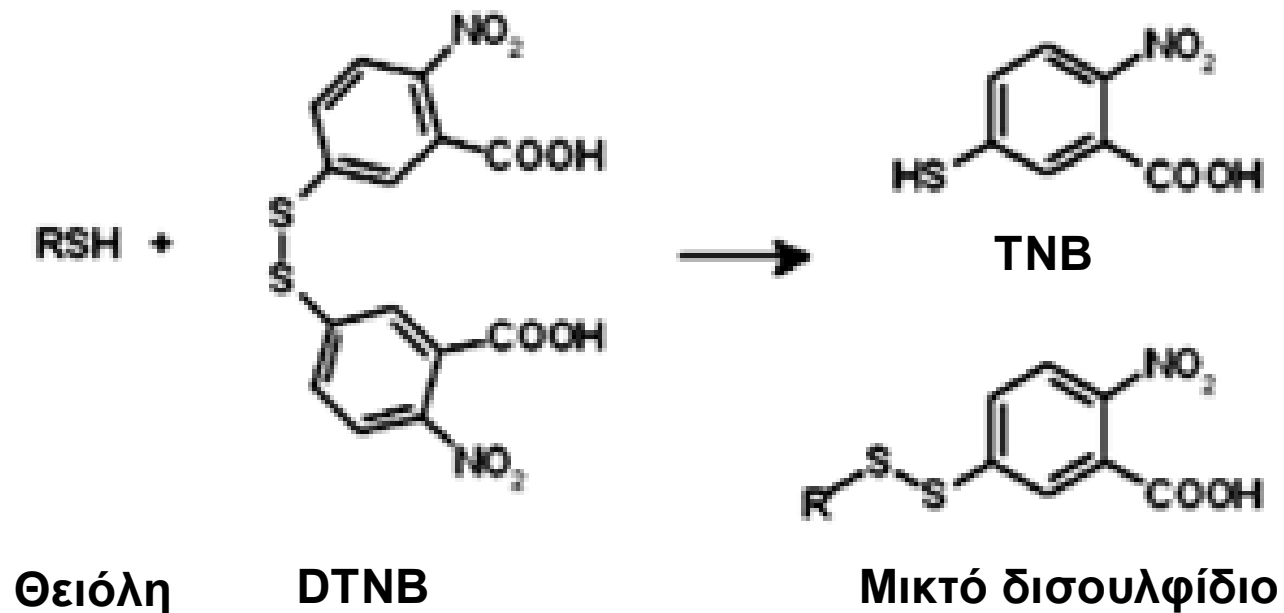
Έγχρωμο προϊόν

Το πυκνό νιτρικό οξύ αντιδρά με τους φαινυλικούς δακτυλίους δίνοντας μία αρωματική νιτροένωση με χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Αύξηση του pH σε αυτό το σημείο θα αυξήσει την ένταση του χρώματος προς το πορτοκαλί

Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών

Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με χαρακτηριστικές χημικές αντιδράσεις

Αντίδραση ελεύθερων θειοαλκοολικών ομάδων (-SH) με το αντιδραστήριο Ellman



Το DTNB απορροφά ελάχιστα σε σχέση με το ανιόν του TNB που απορροφά ισχυρά στα 412 nm δίνοντας έντονο κίτρινο χρώμα σε ελαφρά αλκαλικό pH.

Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών

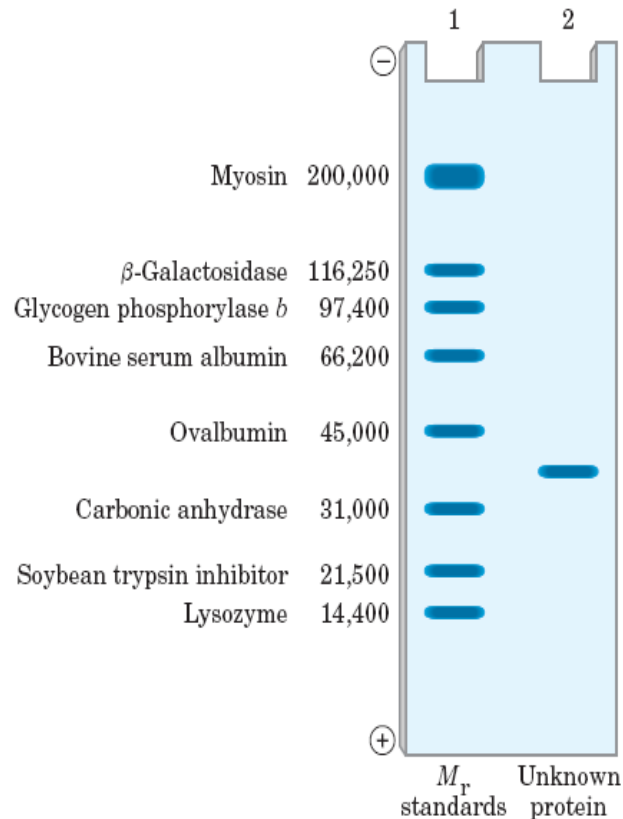
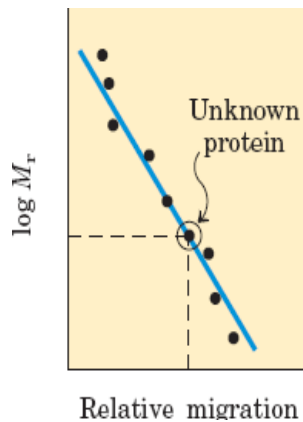
Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με χαρακτηριστικές χημικές αντιδράσεις

	<u>Αντίδραση</u> <u>νινυδρίνης</u>	<u>Αντίδραση</u> <u>ξανθοπρωτεΐνης</u>	<u>Αντίδραση</u> <u>Ellman</u>
Γλυκίνη 2%	+	-	-
Τυροσίνη 1%	+	+	-
Δεξτράνη 3%	-	-	-
BSA 2%	+	+	+
Λυσοζύμη 2%	+	+	+
Μερκαπτοαιθανόλη 0,04%	-	-	+
Διάλυμα μυοσίνης	+	+	+

Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών

Εύρεση MB πρωτεΐνης

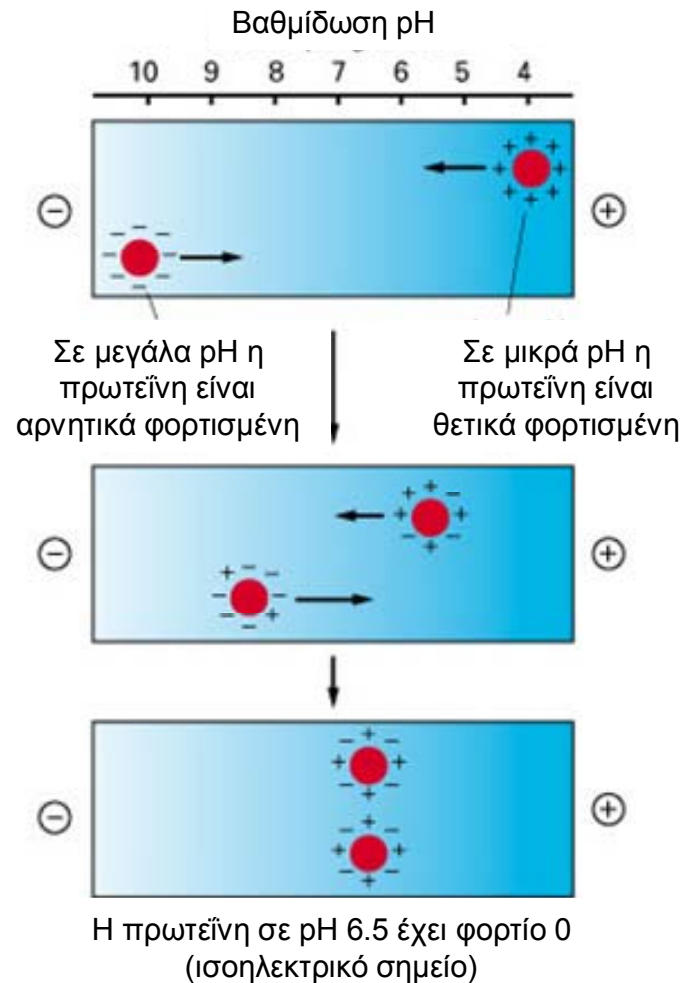
- Ηλεκτροφόρηση αποδιατακτική
- Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (από τον όγκο έκλουσης)
- Υπερφυγοκέντρωση (από τον συντελεστή καταβύθισης)
- Φασματοσκοπίας μάζας (MS)



Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών

Εύρεση ισοηλεκτρικού σημείου πρωτεΐνης

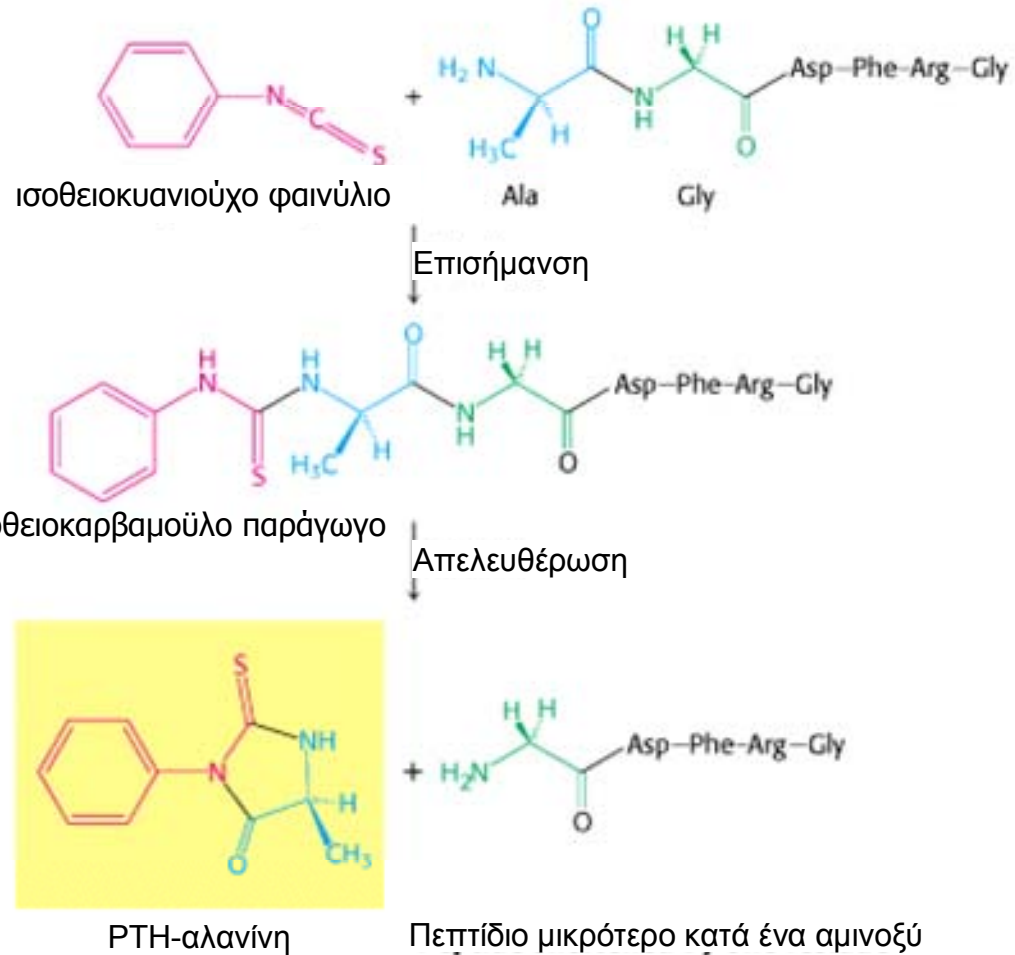
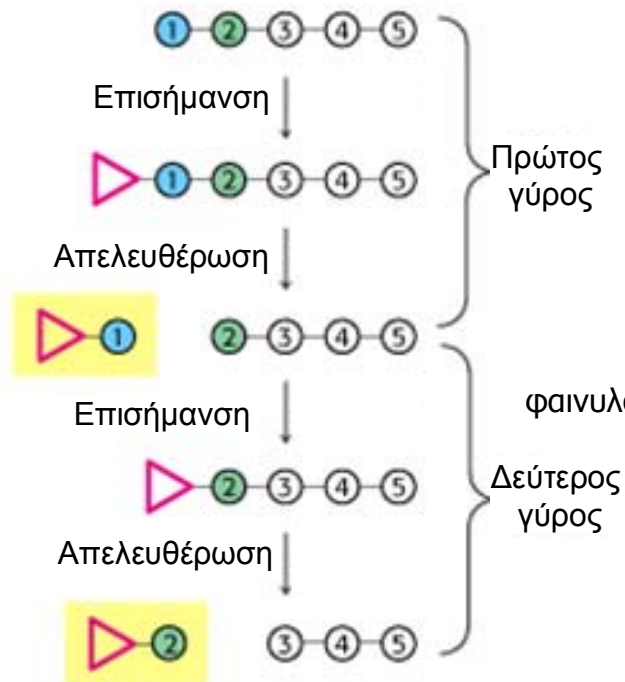
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση pH



Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών

Εύρεση 1^{ταγους} δομής

ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΚΑΤΑ EDMAN

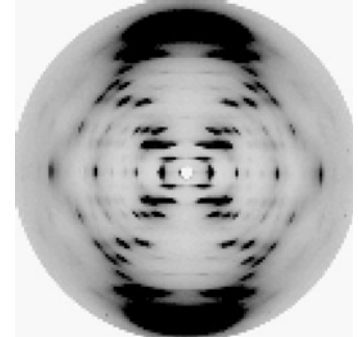
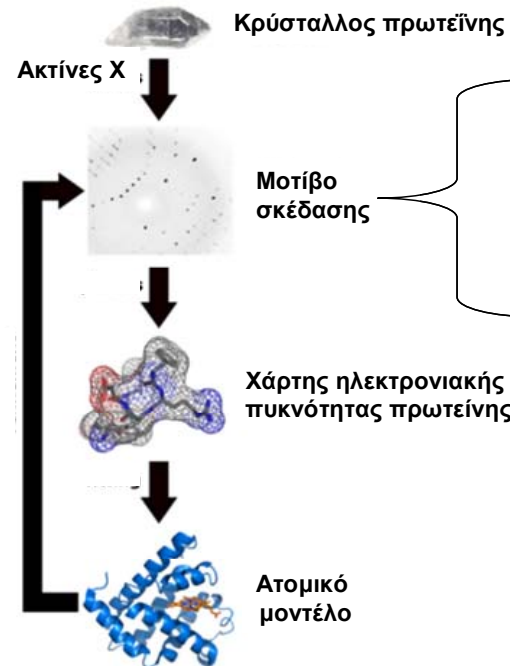


Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών

Εύρεση 2^{ταγους}, 3^{ταγους} δομής

Φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR)

Κρυσταλλογραφία ακτίνων X



Εύρεση 4^{ταγους} δομής

Ηλεκτροφόρηση καθαρής πρωτεΐνης:

μη αποδιατακτικές συνθήκες => να προσδιοριστεί το MB της πρωτεΐνης (μία ζώνη)

σε αποδιατακτικές συνθήκες => ο αριθμός των ζωνών => ο αριθμός υπομονάδων πρωτεΐνης, υπολογίζεται το MB της κάθε αλυσίδας