

Τεχνικές Ανάλυσης Πρωτεϊνών

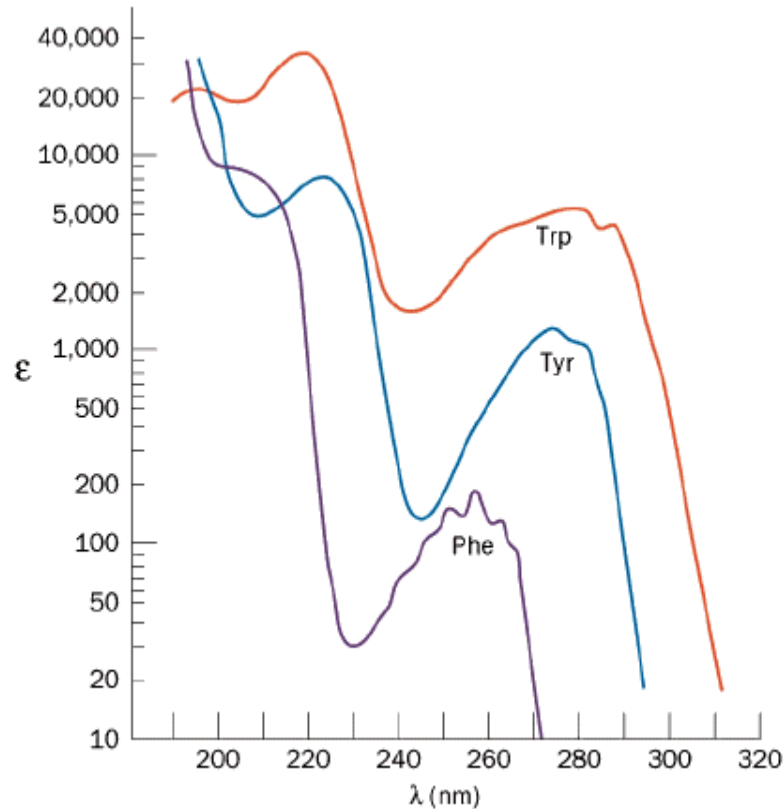
- 1. Μέτρηση συγκέντρωσης**
- 2. Καθαρισμός**
- 3. Αλληλούχηση**
- 4. Πρωτεομική ανάλυση**

Αλληλεπίδραση Πρωτεΐνης με προσδέτη (Ligand)

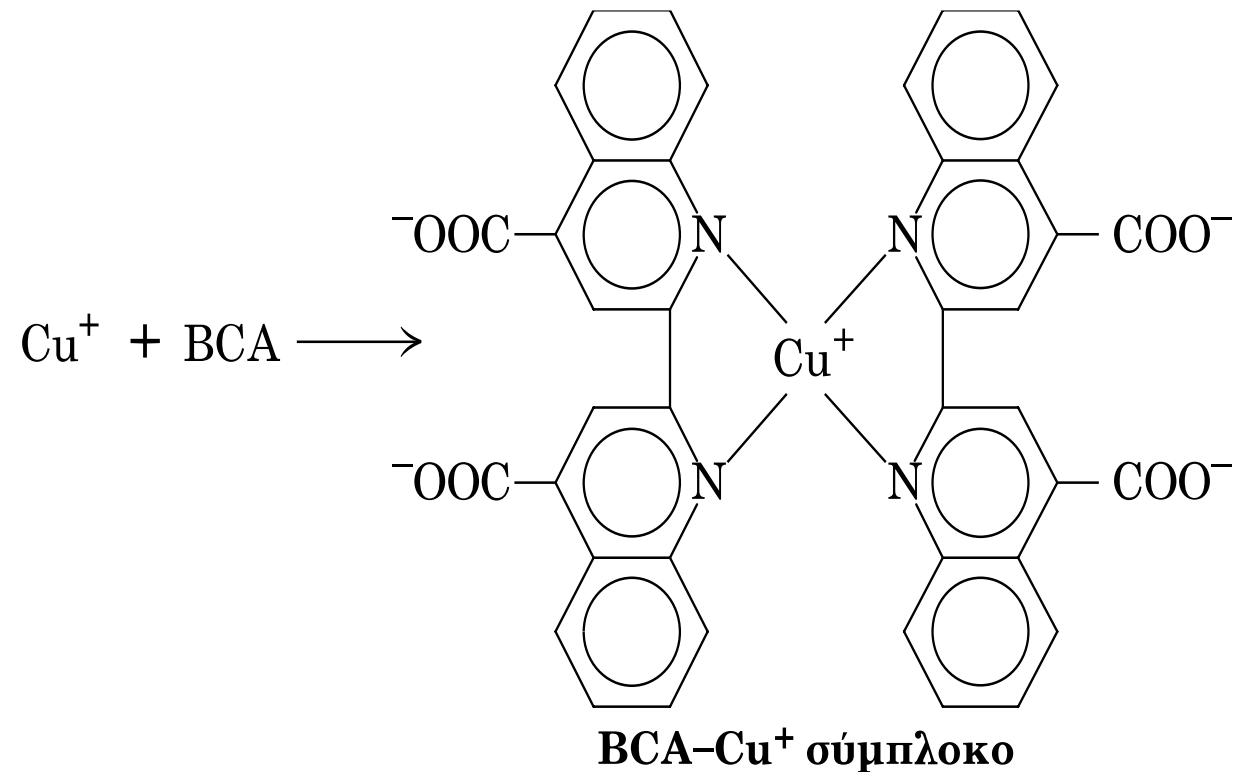
Μέτρηση συγκέντρωσης

Φωτομετρικές μέθοδοι
Εξίσωση Beer Lambert $A = \epsilon Cl$

Απορρόφηση στο υπεριώδες από
αρωματικά αμινοξέα



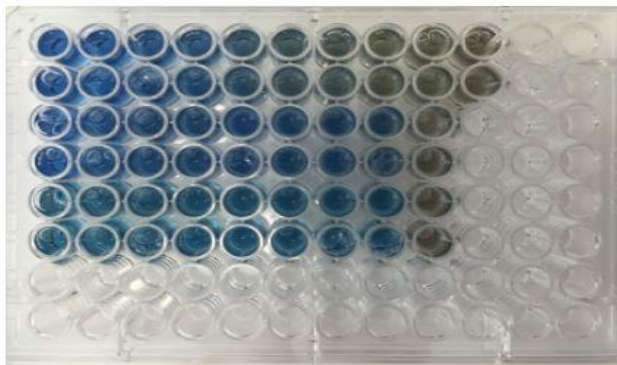
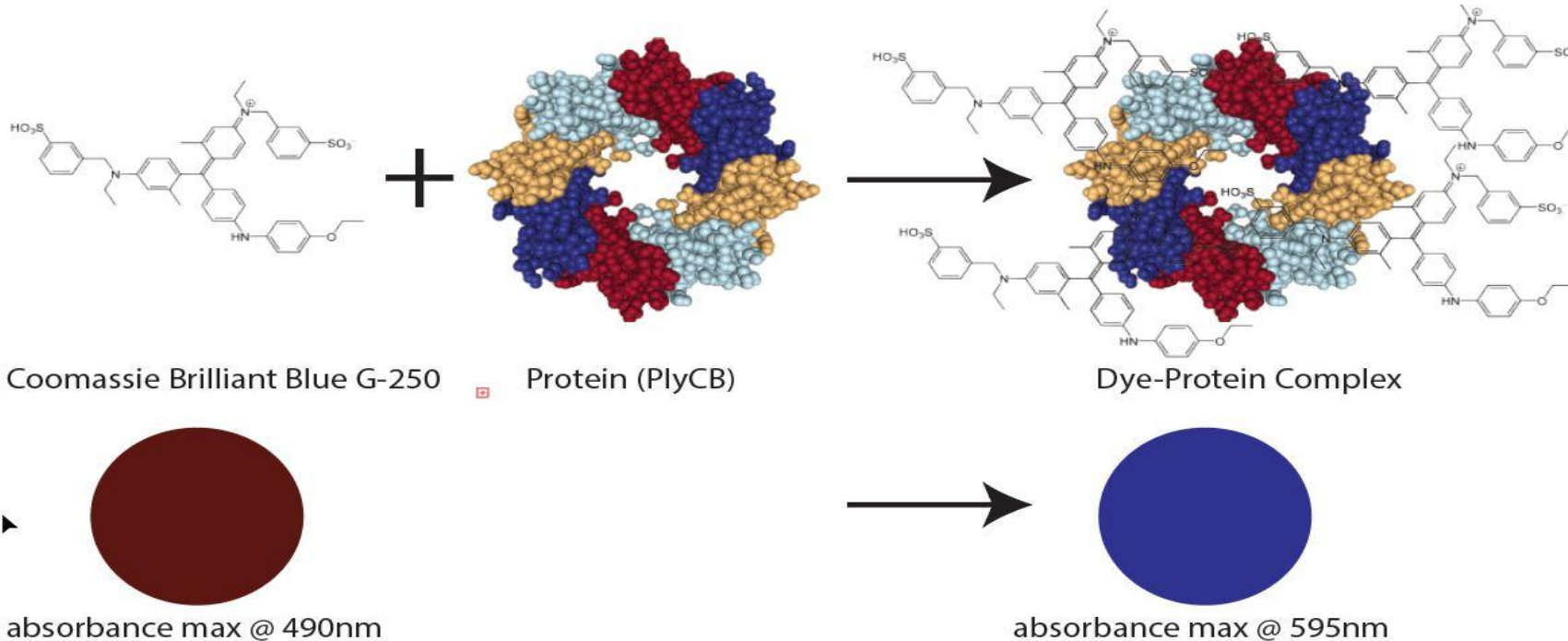
Απορρόφηση στο ορατό φως συμπλόκων ιόντων χαλκού (Cu^+) με BCA
Τα ιόντα Cu^+ προκύπτουν από ανάγωγή Cu^{2+} που αντιδρούν με
πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων



Μέτρηση συγκέντρωσης

Φωτομετρικές μέθοδοι
Εξίσωση Beer Lambert $A=\epsilon CI$

Απορρόφηση στο ορατό φως συμπλόκων
πρωτεϊνών με οργανικά μόρια
(Μέθοδος Bradford)



Bradford assay in 96-well plate
containing wells with and without
protein.

Καθαρισμός Πρωτεϊνών

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1 Παράδειγμα σχήματος καθαρισμού πρωτεϊνών: Καθαρισμός ενός ενζύμου από ένα εκχύλισμα κυττάρων

Κλάσμα	Όγκος (mL)	Συνολική πρωτεΐνη (mg)	Συνολική ενεργότητα*	Ειδική ενεργότητα†	Ανάκτηση‡
Ακατέργαστο εκχύλισμα	3.800	22.800	2.460	0,108	100
Ίζημα αλάτων	165	2.800	1.190	0,425	48
Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία	65	100	720	7,2	29
Χρωματογραφία μοριακού nθμού	40	14,5	555	38,3	23
Χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας	5	1,8	275	152	40

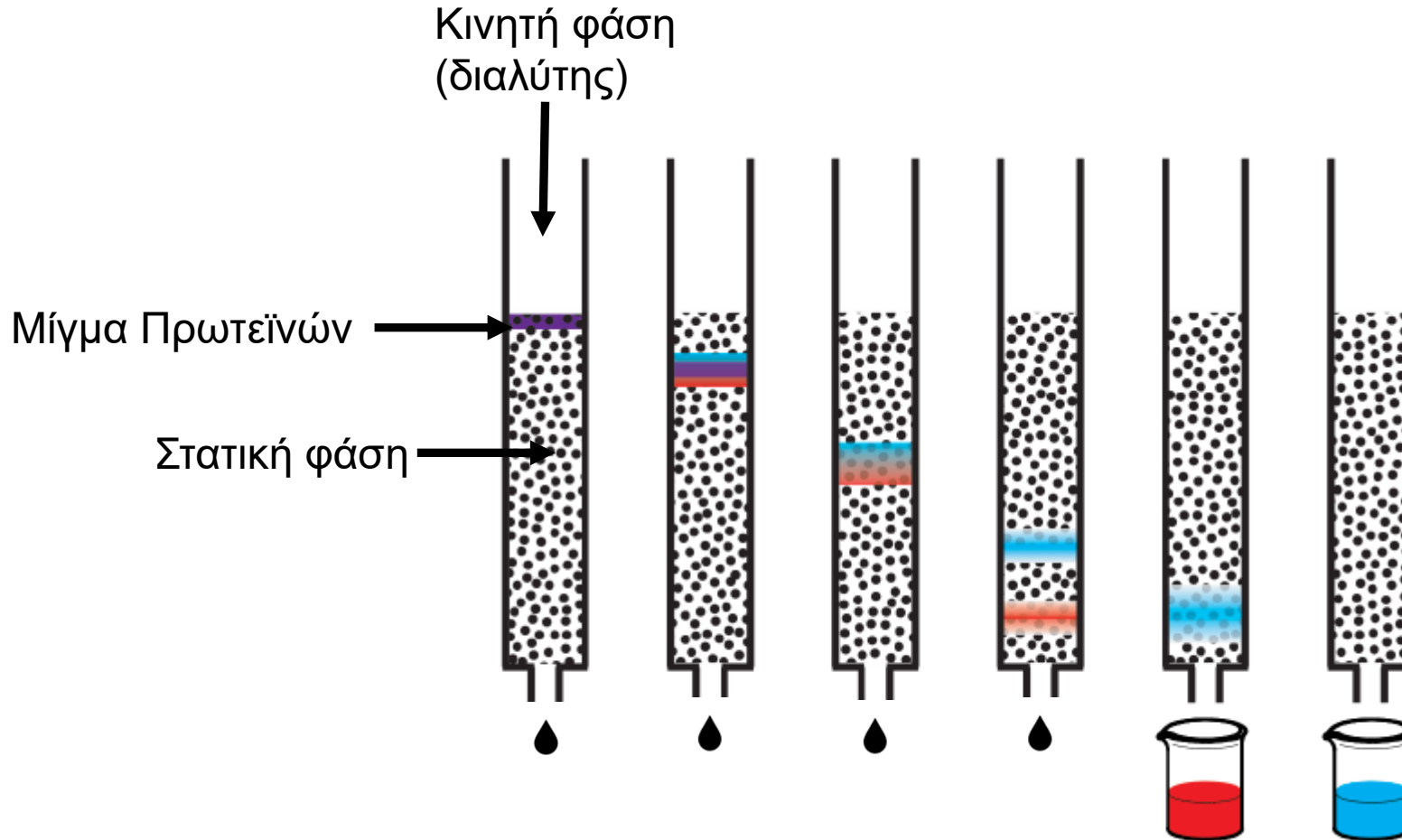
* Η σχετική ενζυμική ενεργότητα κάθε κλάσματος αναφέρεται σε αυθαίρετα καθορισμένες μονάδες. Μία μονάδα εδώ είναι 1 nanomole / mL υποστρώματος που μετατρέπεται ανά λεπτό. Το ένζυμο είναι η αφυδρογονάση της ξανθίνης από τον μύκητα της μούχλας του ψωμιού *Neurospora crassa*.

† Η ειδική ενεργότητα είναι η ολική ενεργότητα του κλάσματος διαιρούμενη με τη συνολική πρωτεΐνη στο κλάσμα. Η τιμή αυτή δίνει μια ένδειξη της αύξησης της καθαρότητας που επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια του καθαρισμού καθώς τα δείγματα εμπλουτίζονται με το ένζυμο.

‡ Η ποσοστιαία ανάκτηση της συνολικής ενεργότητας είναι ένα μέτρο της απόδοσης του επιθυμητού ενζύμου.

§Το τελευταίο βήμα της διαδικασίας είναι μια μέθοδος συγγένειας στην οποία αντισώματα ειδικά για το ένζυμο είναι ομοιοπολικά συζευγμένα σε μια χρωματογραφική ρητίνη και τοποθετημένα σε έναν γυάλινο σωλήνα για την κατασκευή μιας χρωματογραφικής στήλης μέσω της οποίας διέρχεται το κλάσμα 4. Το ένζυμο δεσμεύεται από τη ρητίνη ανοσοσυγγένειας ενώ οι άλλες πρωτεΐνες διέρχονται ελεύθερα. Εν συνεχεία το ένζυμο ανακτάται διοχετεύοντας μέσω της στήλης ένα ισχυρό διάλυμα άλατος, το οποίο διαχωρίζει το σύμπλοκο ενζύμου-αντισώματος.

Καθαρισμός/Διαχωρισμός Πρωτεϊνών με Χρωματογραφία Στήλης



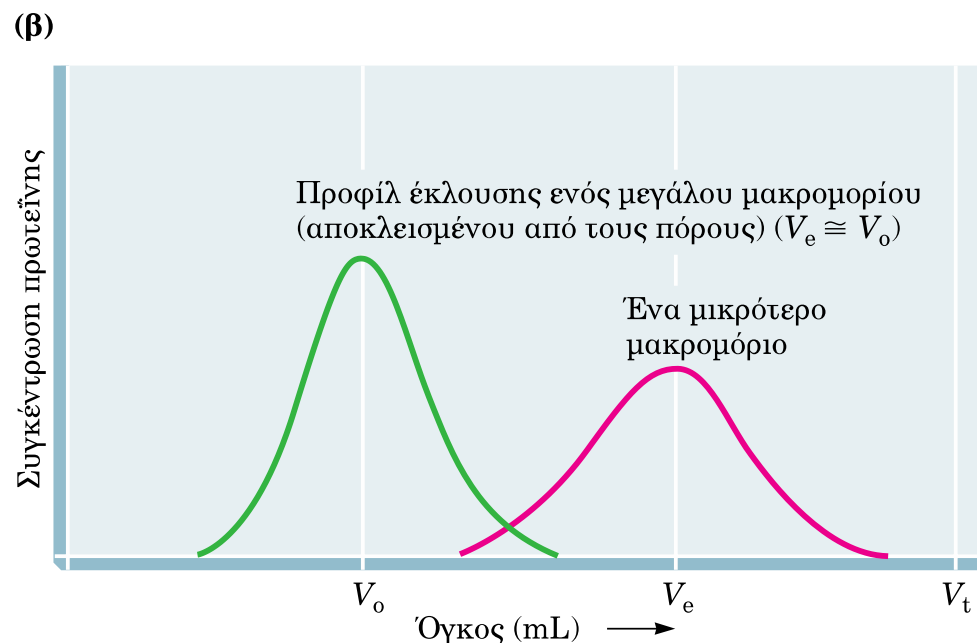
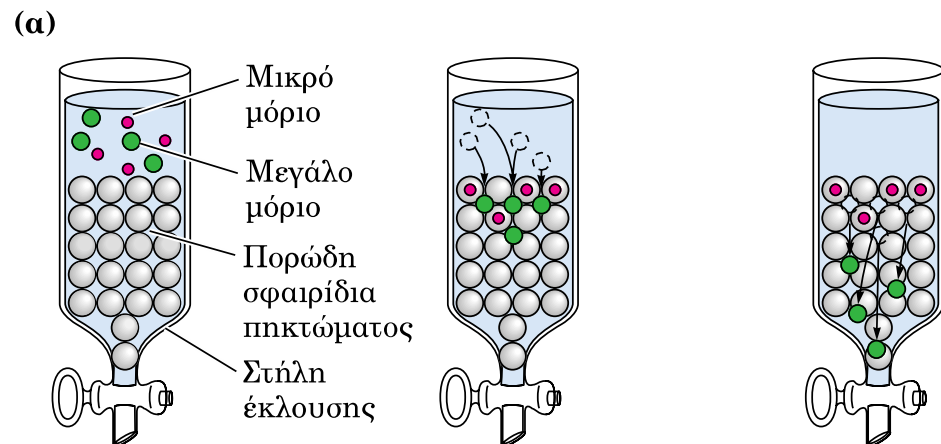
Mikhail Tsvet (1872-1919)

Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών βάσει του φορτίου

Η χρωματογραφία διήθησης πηκτώματος (αποκλεισμού μεγέθους) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών βάσει του μοριακού βάρους

(α) Τα μεγαλύτερα μόρια αποκλείονται από τα σφαιρίδια του πηκτώματος και εξέρχονται από τη στήλη νωρίτερα από τα μικρότερα μόρια, η μετακίνηση των οποίων καθυστερεί λόγω του ότι μπορούν να εισέλθουν στα σφαιρίδια.

(β) Ένα προφίλ έκλουσης.

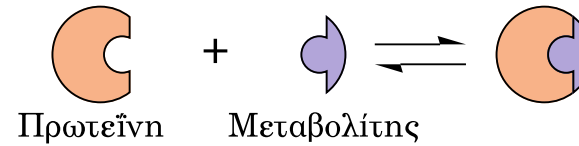


Χρωματογραφία συγγένειας

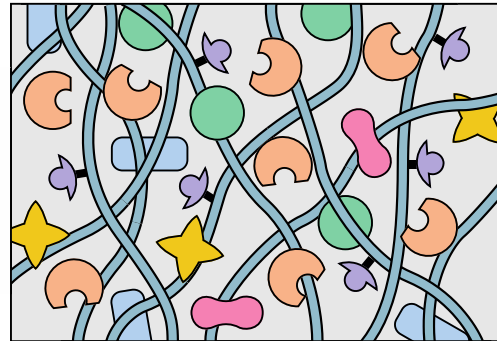
Διάγραμμα που απεικονίζει τη χρωματογραφία συγγένειας. Τα μικρά μόρια-στόχοι (προσδέτες) ακινητοποιούνται μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης σε μια αδιάλυτη μήτρα, όπως η κυτταρίνη ή η πολυακρυλαμίδα, σε μία στήλη.

Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος στη συνέχεια διέρχεται μέσω της στήλης, όπου δεσμεύεται στους προσδέτες στόχους, ενώ άλλες πρωτεΐνες διέρχονται χωρίς δέσμευση. Η πρωτεΐνη μπορεί να εκλουστεί με προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων του ελεύθερου προσδέτη.

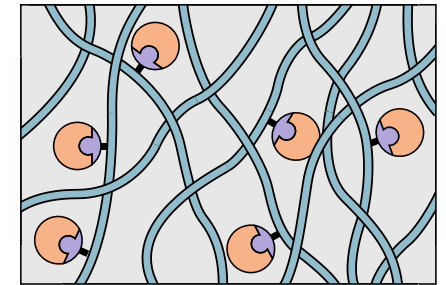
Μια πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με έναν μεταβολίτη. Ο μεταβολίτης είναι έτσι ένας προσδέτης που δεσμεύεται ειδικά σε αυτή την πρωτεΐνη



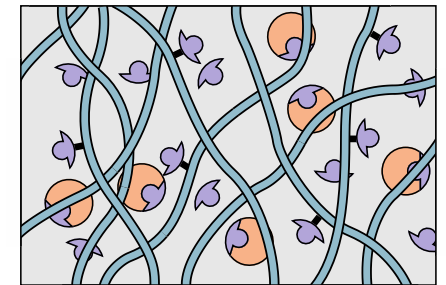
Ο μεταβολίτης μπορεί να ακινητοποιηθεί με ομοιοπολική του σύνδεση σε μια αδιάλυτη μήτρα όπως ένα πολυμερές αгарόζης. Εκχυλίσματα κυττάρων που περιέχουν πολλές ξεχωριστές πρωτεΐνες μπορούν να περάσουν μέσω της μήτρας.



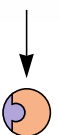
Μια ειδική πρωτεΐνη συνδέεται με τον προσδέτη. Όλο το άλλο μη συνδεδεμένο υλικό ξεπλένεται από τη μήτρα.



Προσθήκη περίσσειας ελεύθερου μεταβολίτη που θα ανταγωνισθεί για τη δεσμευμένη πρωτεΐνη αποσπά την πρωτεΐνη από τη χρωματογραφική μήτρα. Η πρωτεΐνη που έχει συμπλοκοποιηθεί με τον ελεύθερο μεταβολίτη διέρχεται εξω από τη στήλη.



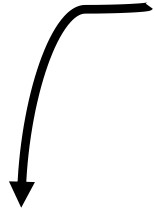
Καθαρισμός των πρωτεϊνών ως περίπου 1.000 φορές ή περισσότερο επιτυγχάνεται συνήθως σε ένα μόνο βήμα σαν αυτό χρωματογραφίας συγγένειας.



Καθορισμός αλληλουχίας αμινοξέων

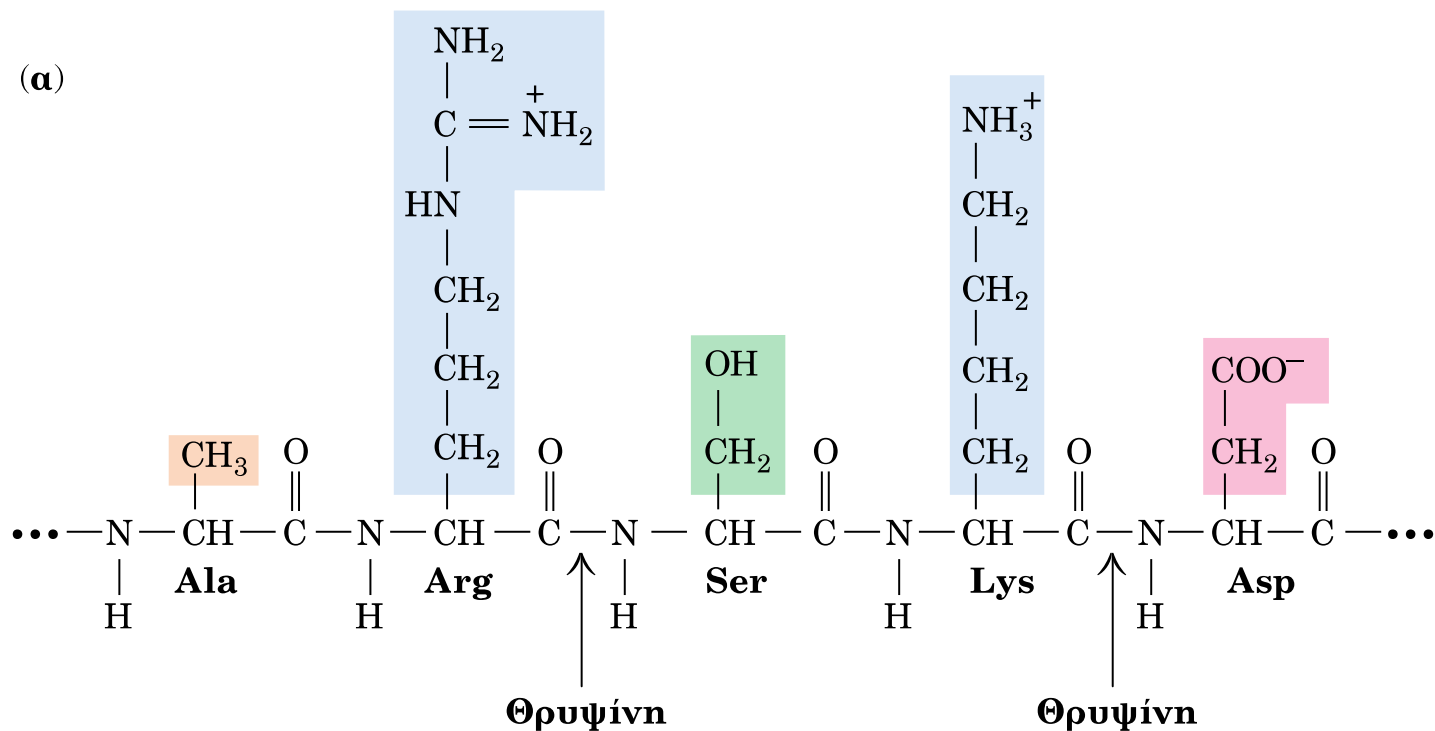
Οι πρωτεΐνες μπορούν να αλληλουχηθούν με δύο τρόπους:

- άμεση αλληλούχηση αμινοξέων
- αλληλούχηση του αντίστοιχου DNA στο γονίδιο (πολύ πιο εύκολη)



1. Εάν η πρωτεΐνη περιέχει περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι αλυσίδες διαχωρίζονται και καθαρίζονται.
2. Διασπώνται οι δισουλφιδικές γέφυρες (S-S) μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης της ίδιας αλυσίδας.
3. Προσδιορίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα του N-τελικού και του C-τελικού άκρου.
4. Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα διασπάται σε μικρότερα θραύσματα και προσδιορίζεται η σύσταση και η αλληλουχία αμινοξέων του κάθε θραύσματος (στο παρελθόν με αποικοδόμηση Edman, τώρα με φασματομετρία μάζας)

Ενζυμική θραυσματοποίηση



(α) Η θρυψίνη είναι μια πρωτεάση η οποία υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς στους οποίους η Arg ή η Lys συνεισφέρει την καρβονυλική ομάδα.

Η έννοια του «παραδείγματος» (paradigm)

Το παράδειγμα είναι το σύνολο των δεδομένων, θεωριών και τεχνικών που αποτελούν τα εργαλεία ενός επιστημονικού πεδίου

Περιοδικά τα παραδείγματα αλλάζουν ριζικά, συνήθως όταν εφευρίσκεται μια νέα πειραματική μέθοδος (π.χ. μικροσκόπιο) ή όταν προκύπτουν νέα δεδομένα (δομή και αλληλουχία DNA, RNA , πρωτεϊνών)

Η βιολογία συστημάτων είναι ένα νέο παράδειγμα και βασίζεται στις πειραματικές τεχνικές που επιτρέπουν την ανάλυση χιλιάδων μορίων ταυτόχρονα. Καίριο ρόλο στην ανάλυση των δεδομένων έχει η βιοπληροφορική.

Πρωτεομική

Μελέτη ενός συνόλου πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα

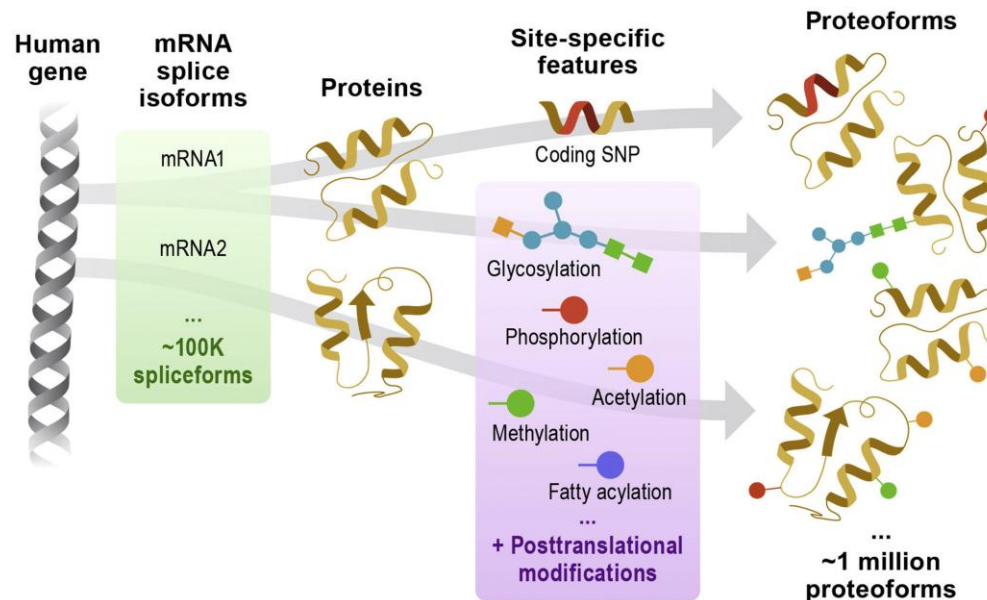
1994 Marc Wilkins

<https://www.babs.unsw.edu.au/marc-wilkins>



Γενομική και Πρωτεομική είναι αλληλένδετες
2001 Αλληλούχιση του γονιδιώματος μας, ~21000 γονίδια

Το πρωτόμα αποτελείται από εκατοντάδες χιλιάδες πρωτεΐνες.
Λόγω των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση, κλπ.) και του εναλλακτικού ματίσματος mRNA προκύπτουν από ένα γονίδιο πολυάριθμες **πρωτεομορφές**.



Στάδια της πρωτεομικής ανάλυσης:
Διαχωρισμός πρωτεϊνών
Ταυτοποίηση
Ποσοτικοποίηση

Διαχωρισμός Πρωτεϊνών

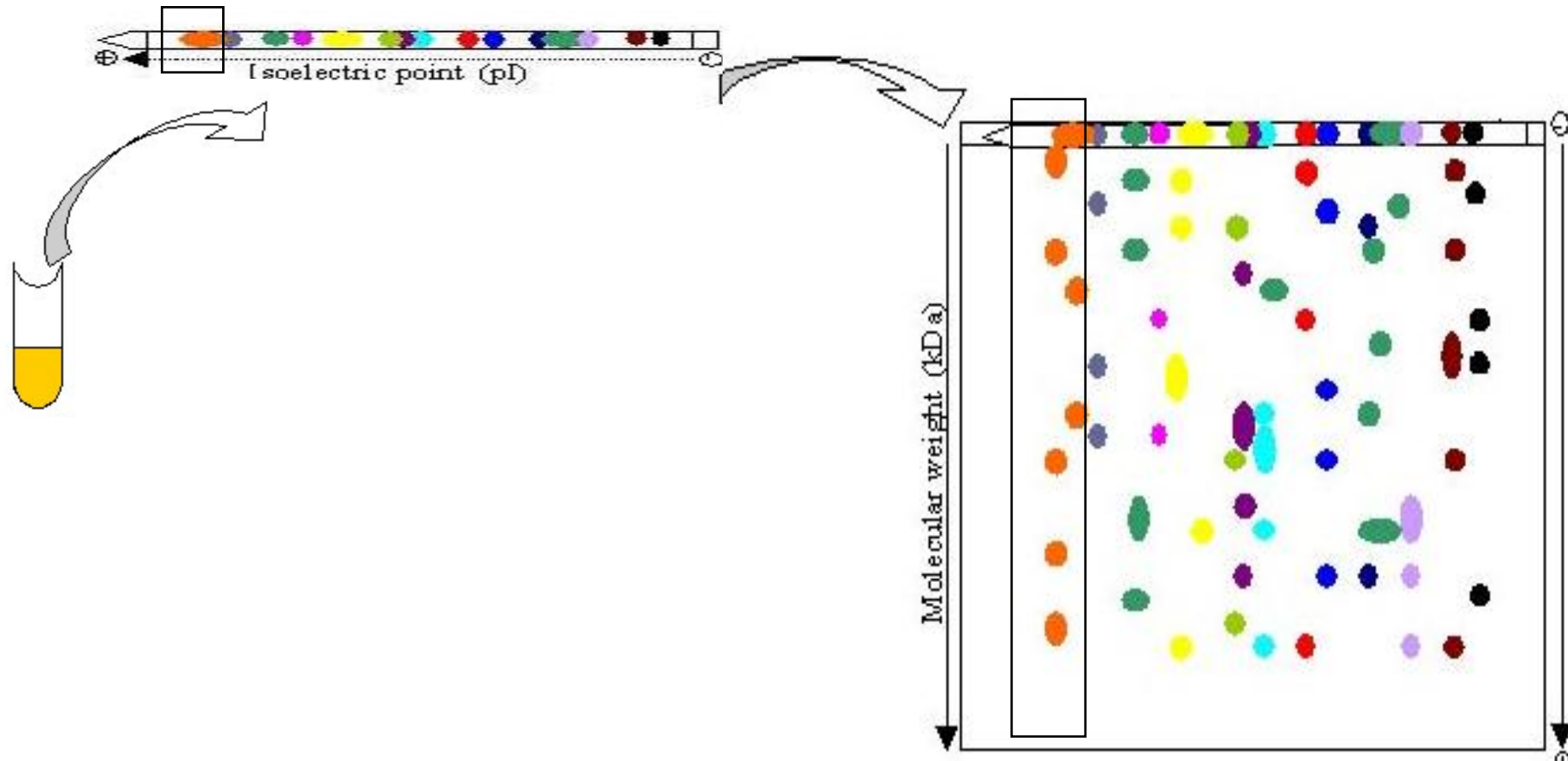
Δισδιάστατη Ηλεκτροφόρηση

Πρώτη διάσταση: Ισοηλεκτρική εστίαση

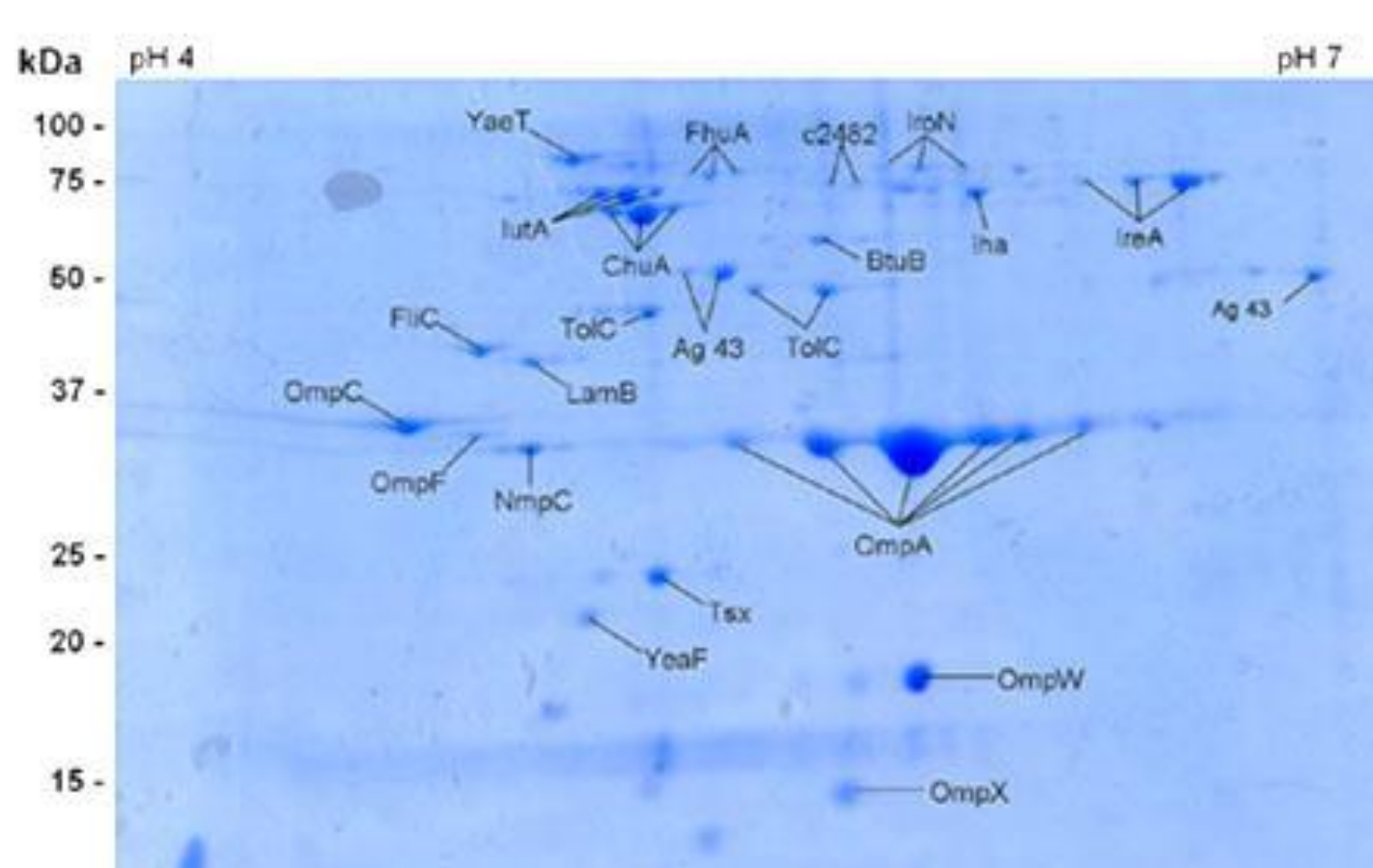
διαχωρισμός σύμφωνα με το φορτίο (ισοηλεκτρικό σημείο-pI)

Δεύτερη διάσταση: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

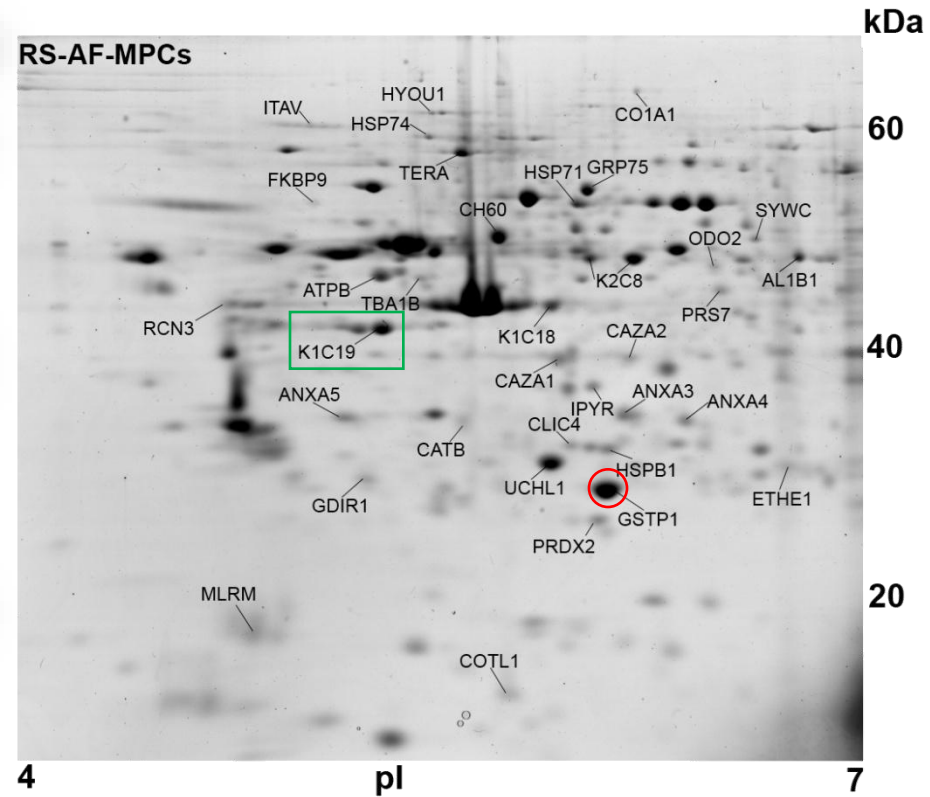
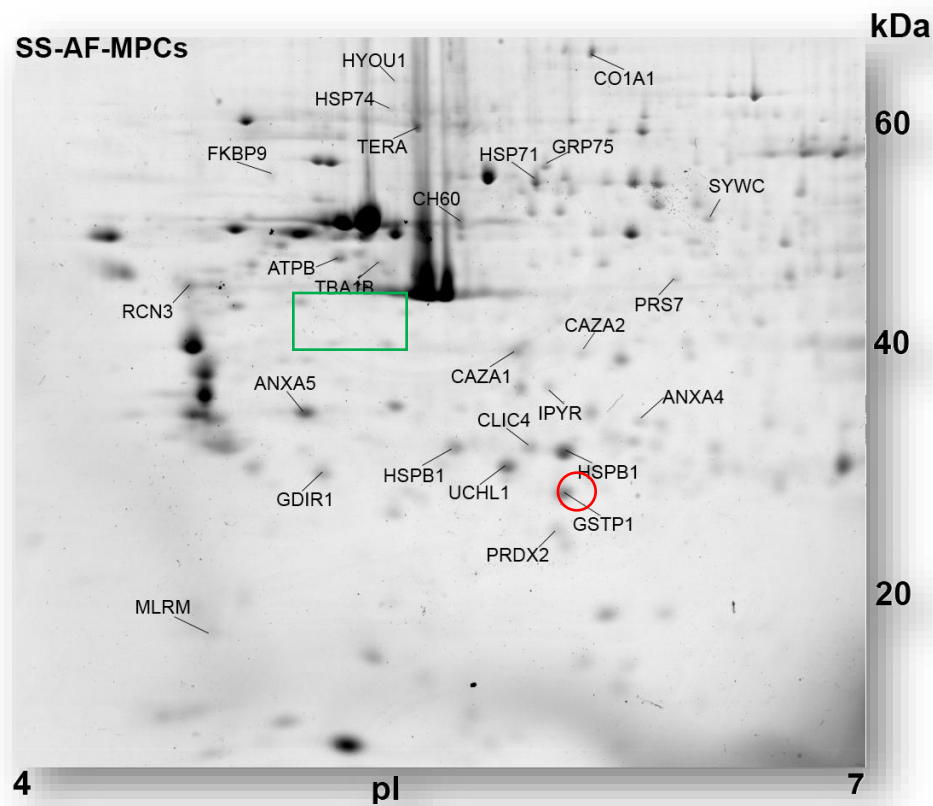
διαχωρισμός σύμφωνα με το μέγεθος (μοριακό βάρος)



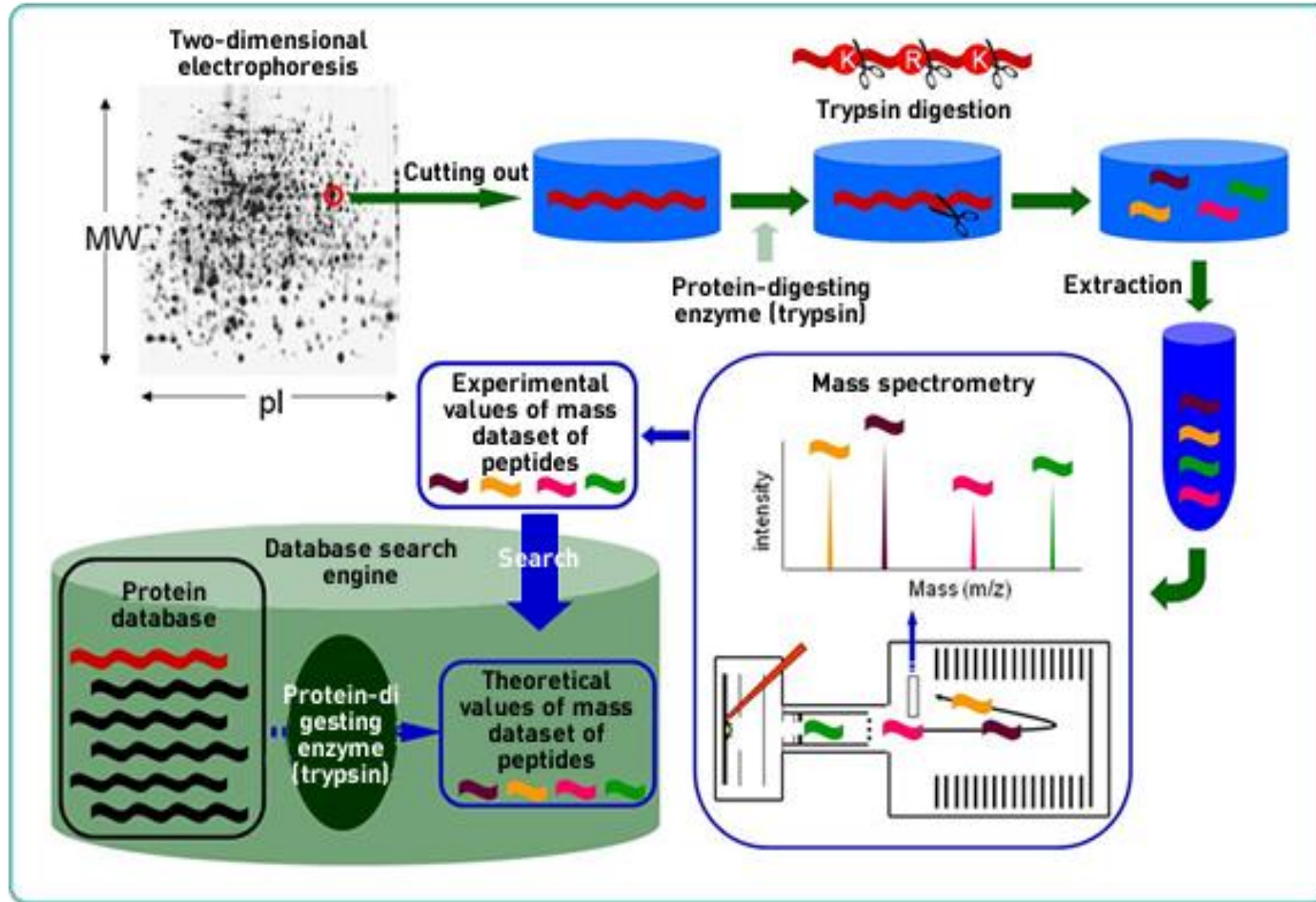
Αποτελέσματα δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης Πρωτεϊνικός χάρτης



Σύγκριση πρωτεϊνικών κηλίδων (Ποσοτική-Ποιοτική)

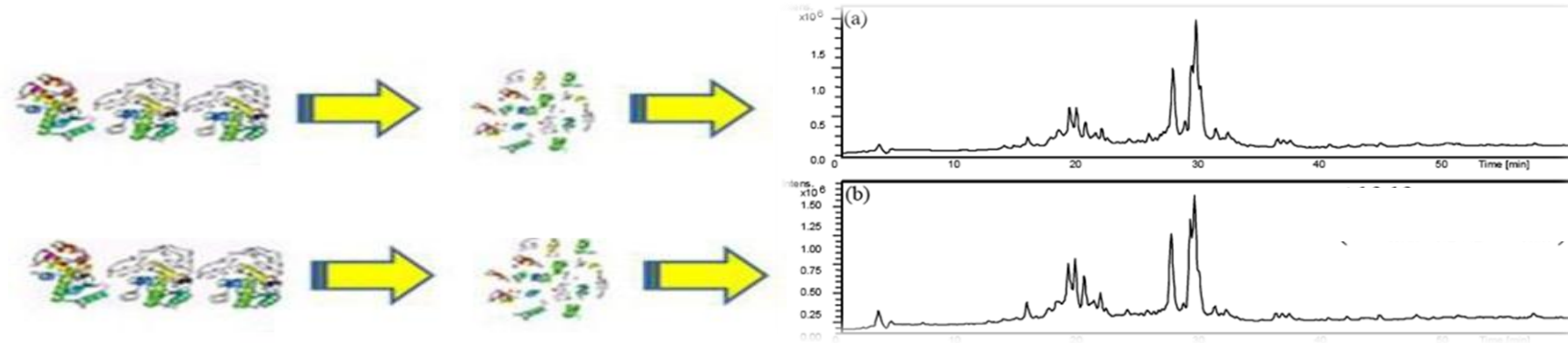


Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με το αποτύπωμα των πεπτιδίων



Διαχωρισμός Πρωτεϊνών και πεπτιδίων

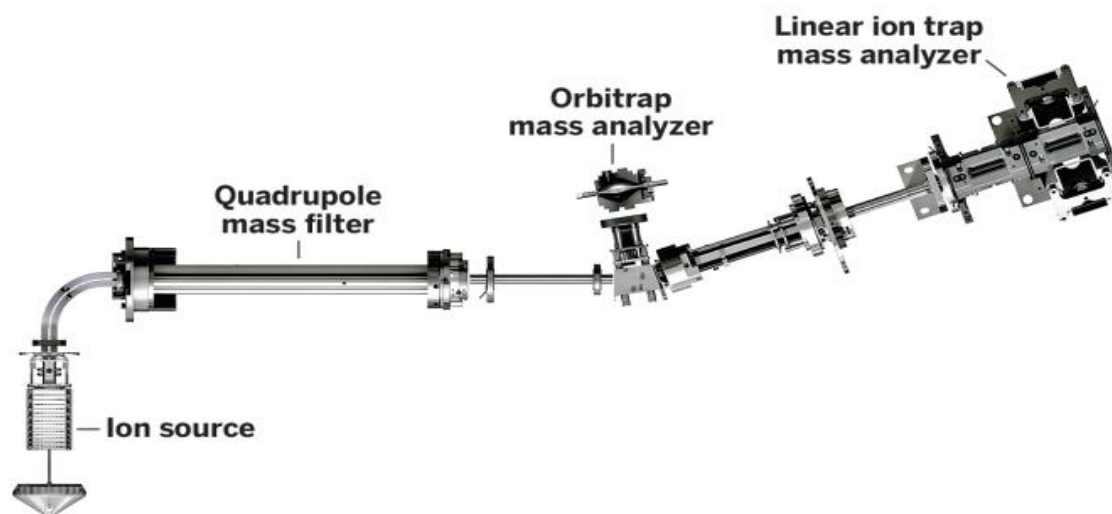
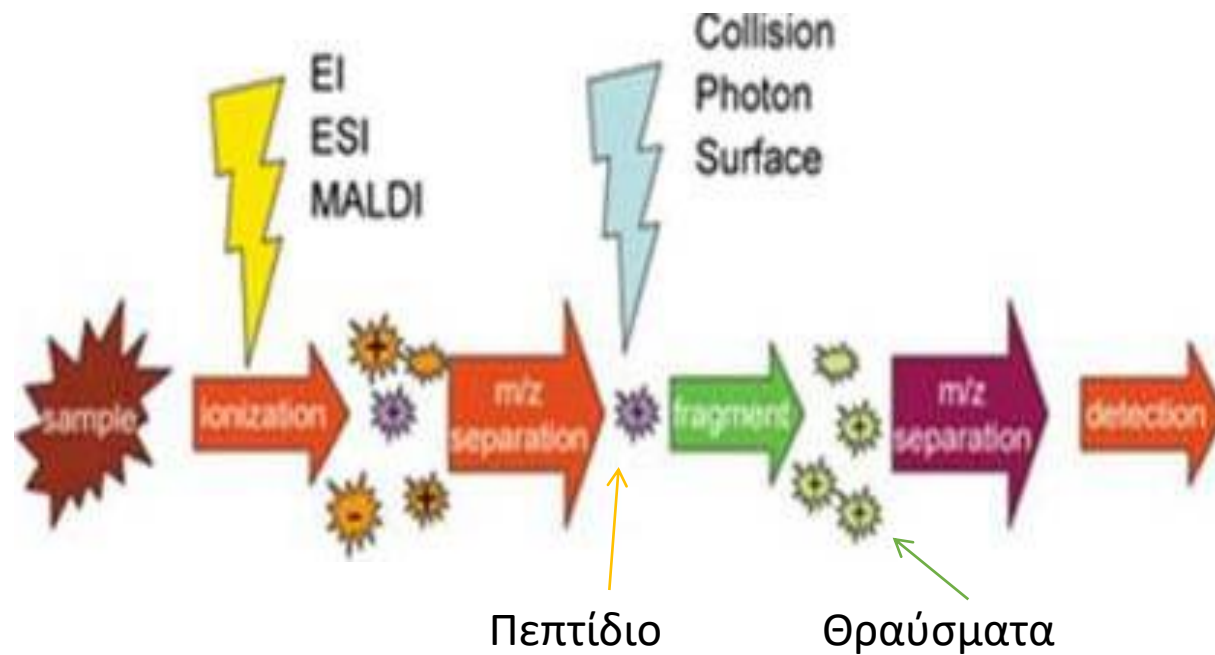
Πέψη με θρυψίνη- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)



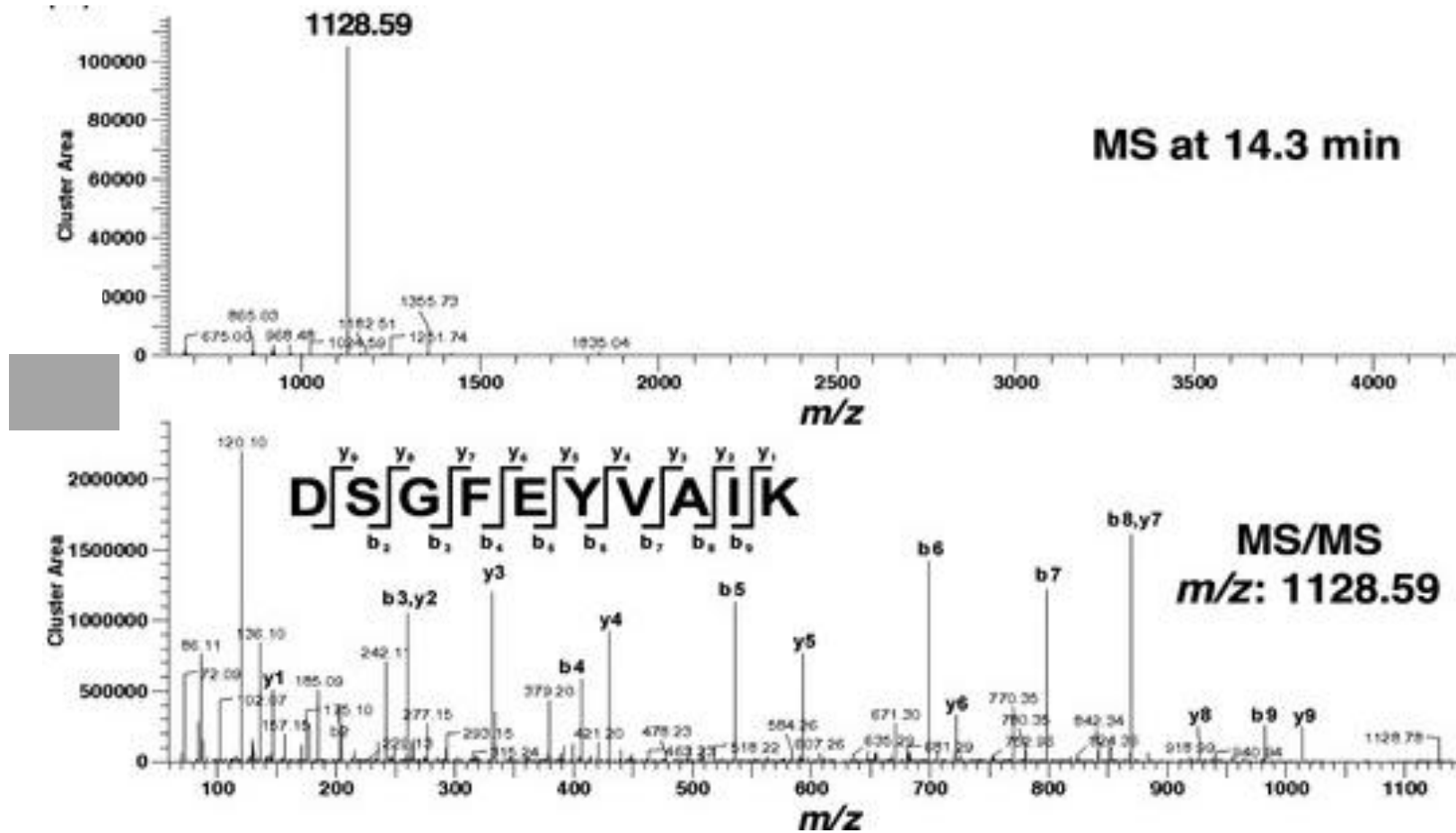
Δυνατότητα διαχωρισμού χιλιάδων πεπτιδίων



Αναγνώριση πεπτιδίων με θραυσματοποίηση



Δεδομένα αναγνώρισης πεπτιδίων με θραυσματοποίηση



Σύνοψη πρωτεομικής ανάλυσης

1) Σύνολο πρωτεϊνών

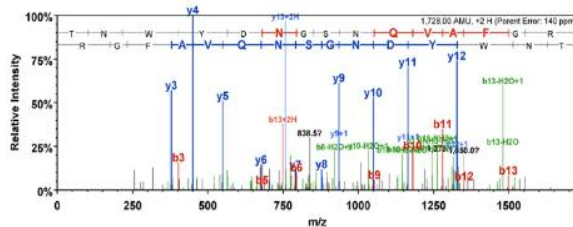
Ομογενοποίηση ιστών
τομών FFPE
Συλλογή βιολογικών υγρών

Απομόνωση πρωτεϊνών
Διαχωρισμός και πέψη με θρυψίνη

Προετοιμασία πεπτιδίων για
διαχωρισμό με υγρή
χρωματογραφία

LC-MS/MS
Orbitrap

Ανάλυση δεδομένων
Σχετική ποσοτικοποίηση



Thermo Proteome Discoverer 1.0									
Administration X: ESI08155-62-62-61.mz X									
Protein	Accession	# Peptides	Coverage	# Proteins	Score	Exp Value	Identity High	Z Score	Rank
1	P12111	75	7.65 %	75	3276	1.24E-06	44	0.00	1
2	P02751	40	5.97 %	40	2386	6.62E-05	44	0.00	2
3	P08123	40	8.95 %	40	1366	571.04	44	0.00	3
4	P12333	28	5.75 %	28	2047	444.53	44	0.00	4
5	P12085	12	16.20 %	12	445	429.86	44	0.00	5

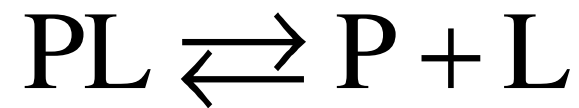
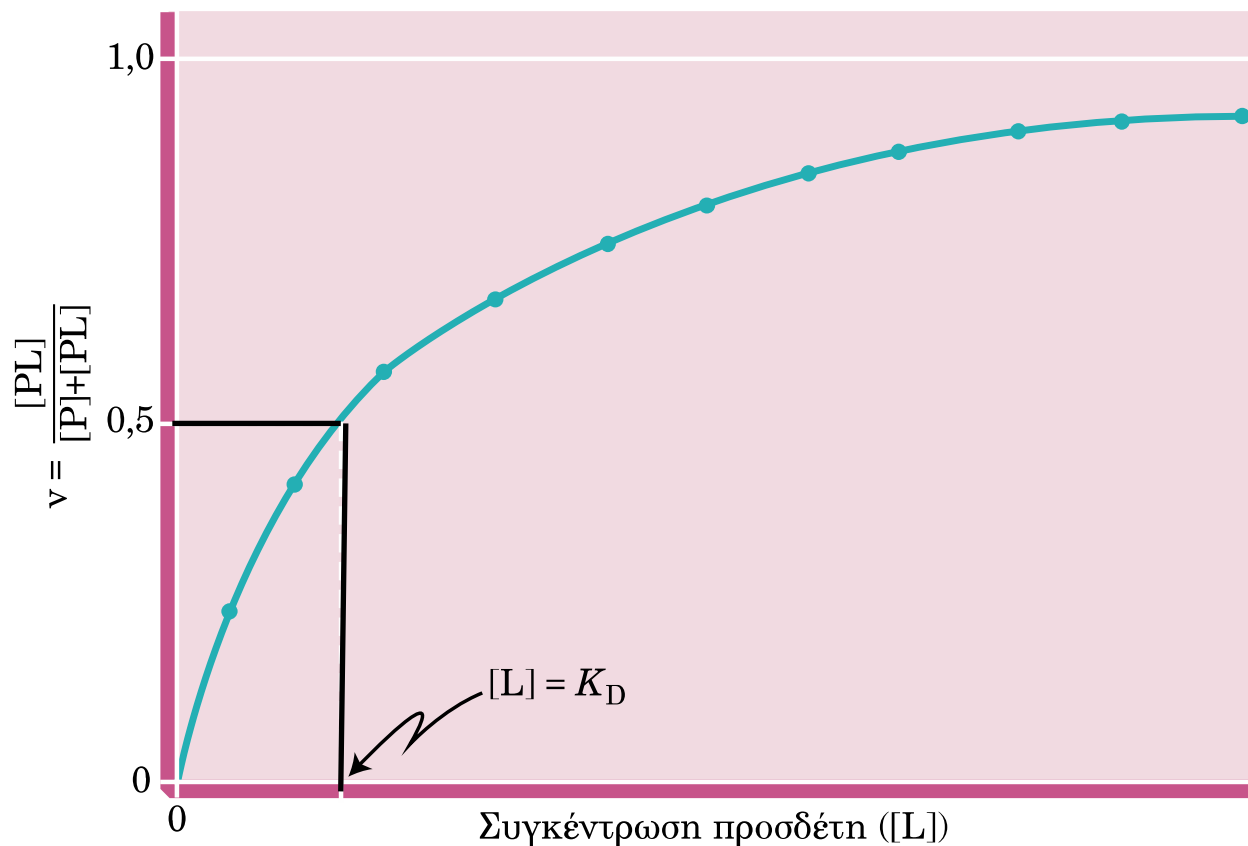
2) Στοχευμένη ανάλυση

Επιβεβαίωση αποτελεσμάτων
Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών
με την τεχνική MRM
(Multiple Reaction Monitoring)



Αναλυτής μάζας
τριπλού τετραπόλου

Σύνδεση μιας πρωτεΐνης με ένα μόριο (προσδέτη)



Σταθερά Διάστασης

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]}$$