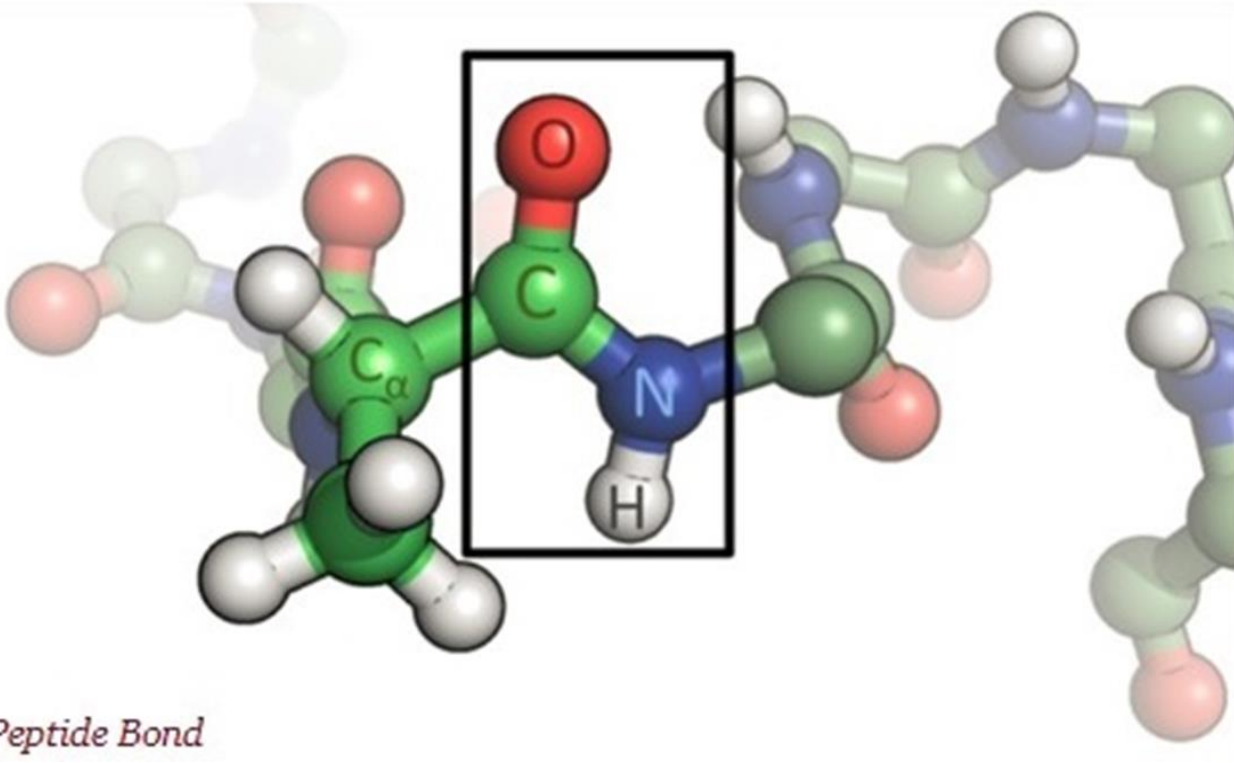


ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

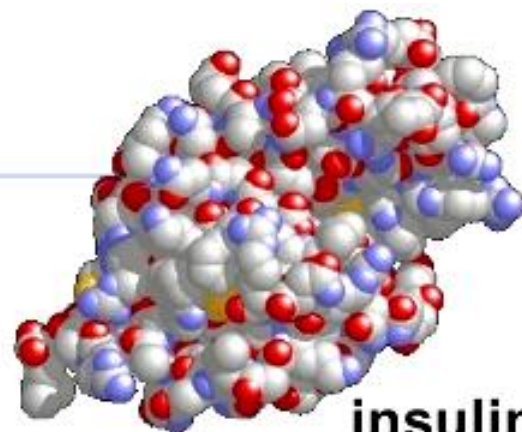


Peptide Bond

ΠΑΥΛΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ, ΕΔΙΠ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ
ΑΘΗΝΑ 2023

Proteins

Examples

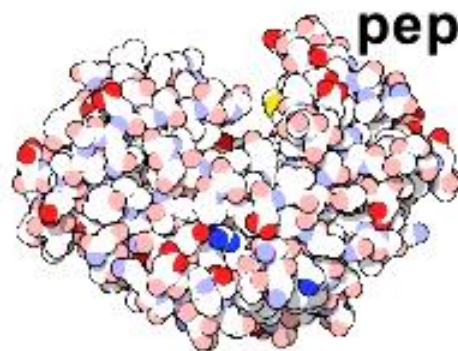


insulin

- ◆ muscle
- ◆ skin, hair, fingernails, claws

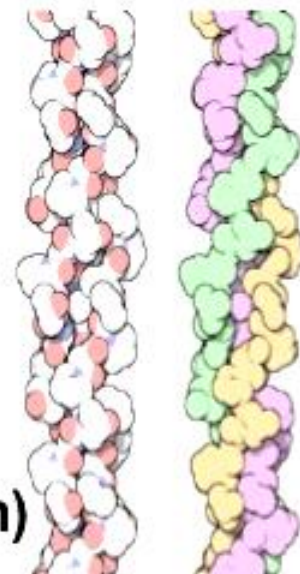
- collagen, keratin

- ◆ pepsin
 - digestive enzyme in stomach



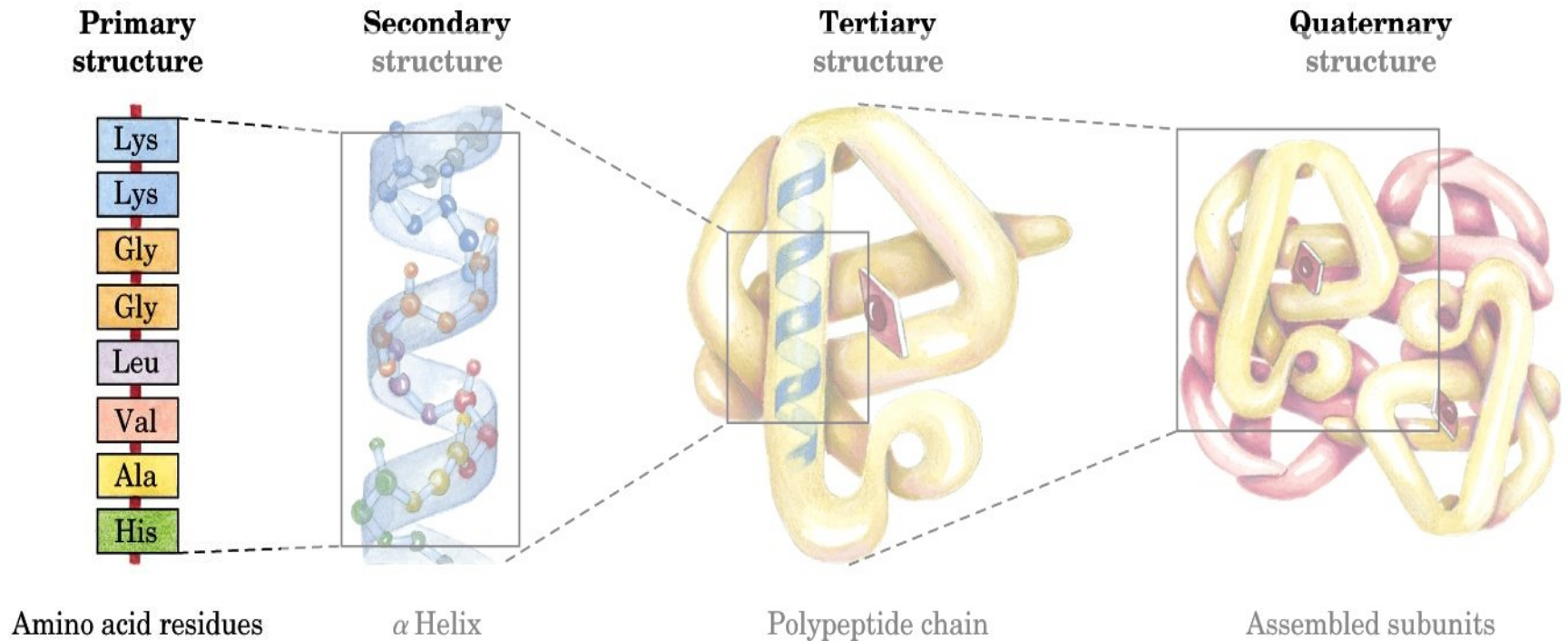
pepsin

- ◆ insulin
 - hormone that controls blood sugar levels

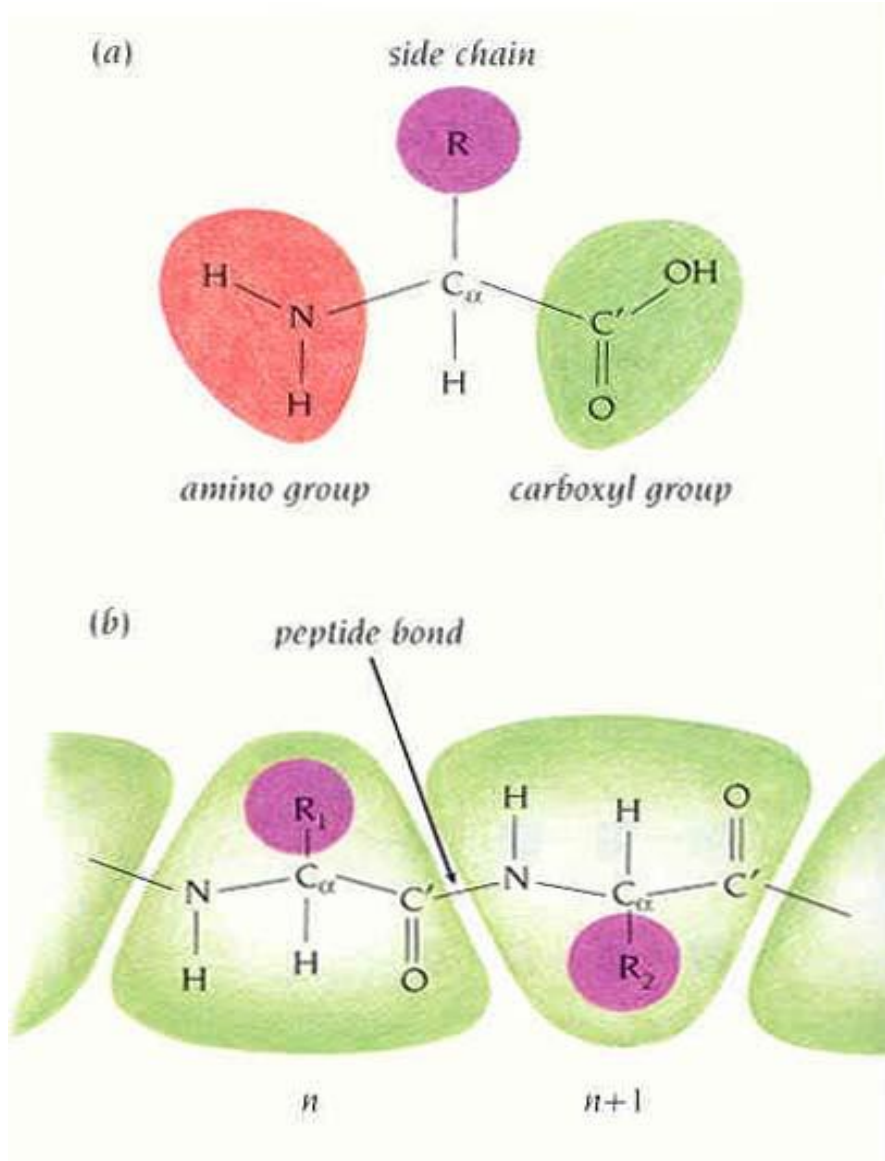


collagen (skin)

Πρωτοταγής δομή: η αμινοξική αλληλουχία μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας



ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΑΜΙΝΟΞΕΩΣ



(α) Ένα κεντρικό άτομο (**C α**) είναι συνδεδεμένο σε μια (**NH₂**), μια (**COOH**), ένα άτομο (**H**) και μια πλευρική ομάδα (**R**).

(β) Σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα η (**COOH**) του *n* αμινοξέος έχει δημιουργήσει πεπτιδικό δεσμό, C-N, με την (**NH₂**), του αμινοξέος *n*+1. Ένα μόριο νερού αποβάλλεται κατά τη διαδικασία.

Επαναλαμβανόμενες μονάδες, αμινοξικά κατάλοιπα

- άτομα της κύριας αλυσίδας
- πλευρικές ομάδες.

Το τμήμα της κύριας αλυσίδας πανομοιότυπο σε όλα τα κατάλοιπα

- Η πλευρική ομάδα **R**, διαφέρει

AMINOΞΕΑ

Ο γενετικός κώδικας καθορίζει τις 20 διαφορετικές πλευρικές ομάδες των αμινοξέων.

From **Protein Structure and Function**
by Gregory A Petsko and Dagmar Ringe

Ist position (5' end)	2nd position				3rd position (3' end)
	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

Amino acids	Abbreviations	Codons
Alanine	Ala A	GCA GCC GCG GCU
Cysteine	Cys C	UGC UGU
Aspartic acid	Asp D	GAC GAU
Glutamic acid	Glu E	GAA GAG
Phenylalanine	Phe F	UUC UUU
Glycine	Gly G	GGA GGC GGG GGU
Histidine	His H	CAC CAU
Isoleucine	Ile I	AUA AUC AUU
Lysine	Lys K	AAA AAG
Leucine	Leu L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Methionine	Met M	AUG
Asparagine	Asn N	AAC AAU
Proline	Pro P	CCA CCC CCG CCU
Glutamine	Gln Q	CAA CAG
Arginine	Arg R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serine	Ser S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Threonine	Thr T	ACA ACC ACG ACU
Valine	Val V	GUA GUC GUG GUU
Tryptophan	Trp W	UGG
Tyrosine	Tyr Y	UAC UAU

ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

• Εάν **μόνο ένα** αμινοξύ αρχίζει με ένα συγκεκριμένο γράμμα τότε αυτό το γράμμα χρησιμοποιείται:

C = Cys = Cysteine = Κυστεΐνη

H = His = Histidine = Ιστιδίνη

I = Ile = Isoleucine = Ισολευκίνη

M = Met = Methionine = Μεθειονίνη

S = Ser = Serine = Σερίνη

V = Val = Valine = Βαλίνη

• Εάν **περισσότερα από ένα αμινοξέα** αρχίζουν με ένα συγκεκριμένο γράμμα, αυτό το γράμμα θα εκχωρηθεί στο πιο συχνά εμφανιζόμενο αμινοξύ :

A = Ala = Alanine = Αλανίνη

G = Gly = Glycine = Γλυκίνη

L = Leu = Leucine = Λευκίνη

P = Pro = Proline = Προλίνη

T = Thr = Threonine = Θρεονίνη

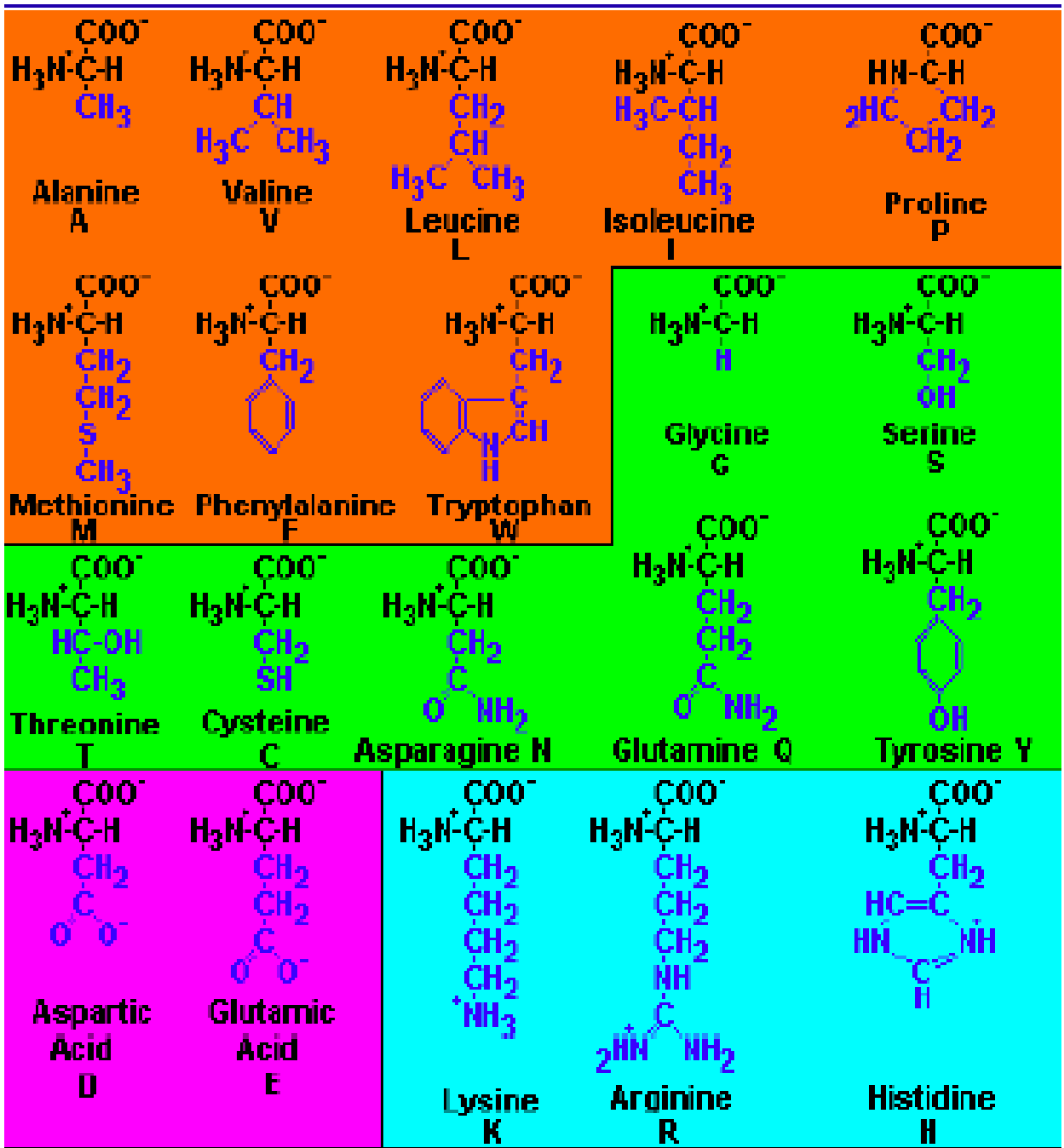
• Κάποια άλλα είναι **φωνητικά προτεινόμενα** :

F = Phe = Phenylalanine ('Fenylalanine') = Φαινυλαλανίνη

R = Arg = Arginine ('aRginine') = Αργινίνη

Y = Tyr = Tyrosine ('tYrosine') = Τυροσίνη

W = Trp = Tryptophan = Τρυπτοφάνη

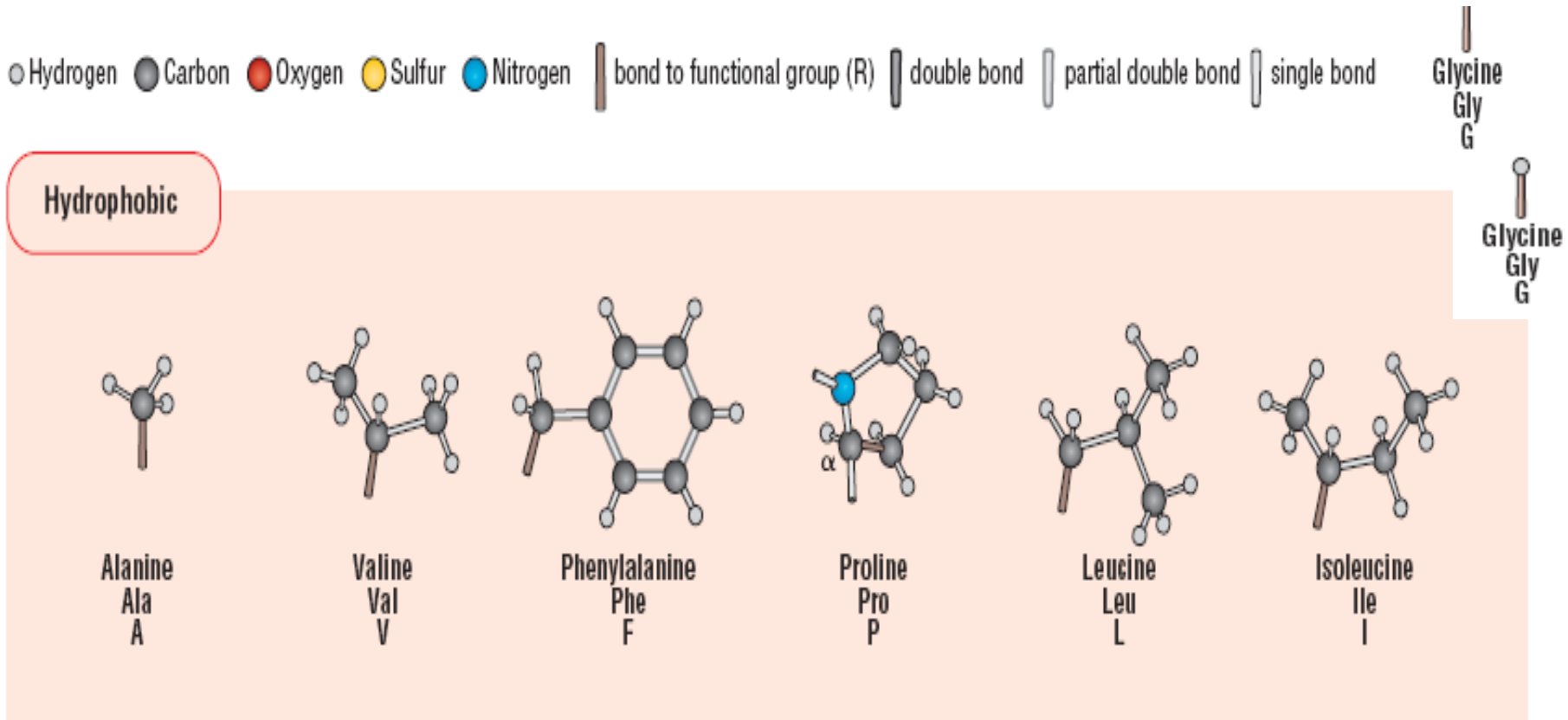


ΥΔΡΟΦΟΒΑ

ΥΔΡΟΦΙΛΑ

ΟΞΙΝΑ -ΒΑΣΙΚΑ

ΥΔΡΟΦΟΒΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

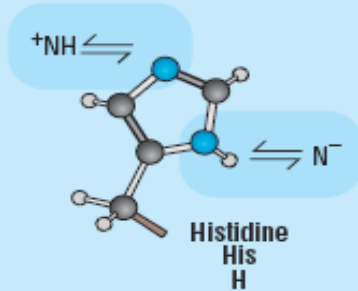
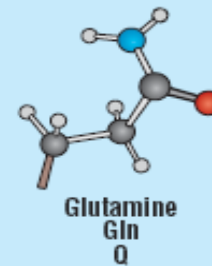
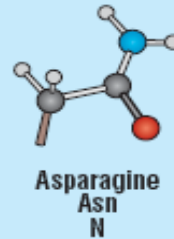
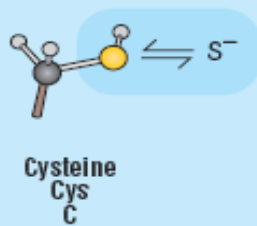
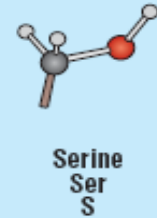
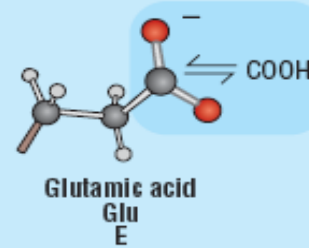
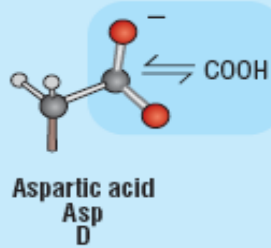


Λαμβάνουν μέρος σε αλληλεπιδράσεις *van der Waals* μόνο. Η τάση τους να αποφεύγουν το νερό και να διατάσσονται το ένα έναντι του αποτελεί τη βάση της υδρόφοβης φύσης τους.

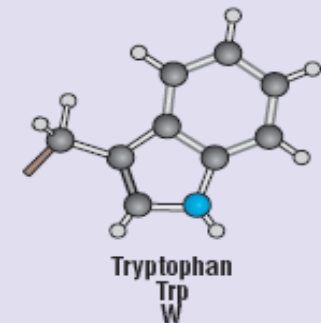
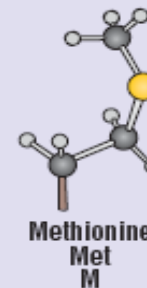
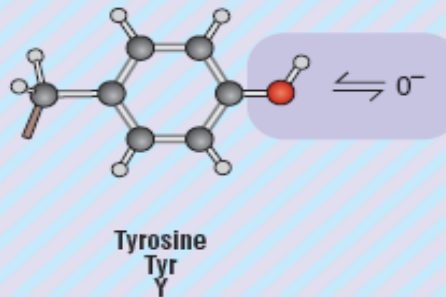
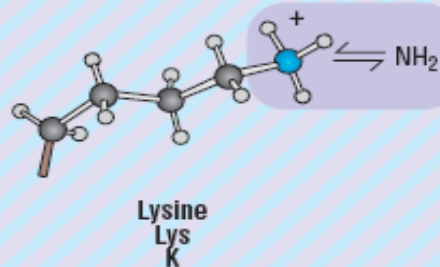
Το αμινοξύ γλυκίνη (G) είναι το απλούστερο όλων έχει ξεχωριστές ιδιότητες και θεωρείται ότι αποτελεί ξεχωριστή κατηγορία ή ότι ανήκει στα υδρόφοβα αμινοξέα

ΥΔΡΟΦΙΛΑ – ΑΜΦΙΠΑΘΗ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Hydrophilic



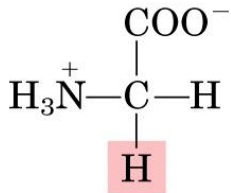
Amphipathic



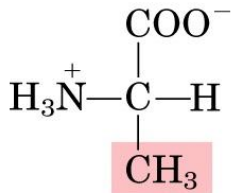
Τα υδρόφιλα αμινοξέα δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους, με πολικούς οργανικούς διαλύτες και με το νερό

Τα αμφιπαθή αμινοξέα έχουν πολικό και μη –πολικό χαρακτήρα και έτσι έχουν μια τάση να αλληλεπιδρούν μεταξύ υδρόφοβων και υδρόφιλων μορίων

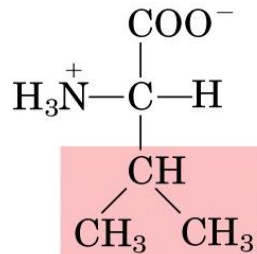
Nonpolar, aliphatic R groups



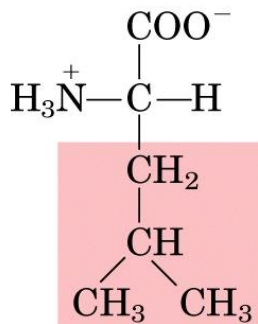
Glycine



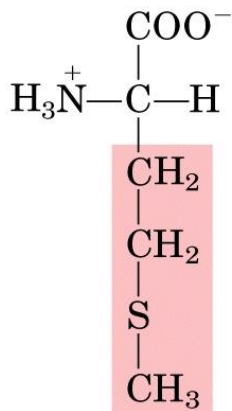
Alanine



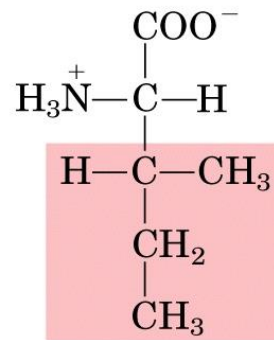
Valine



Leucine



Methionine



Isoleucine

G

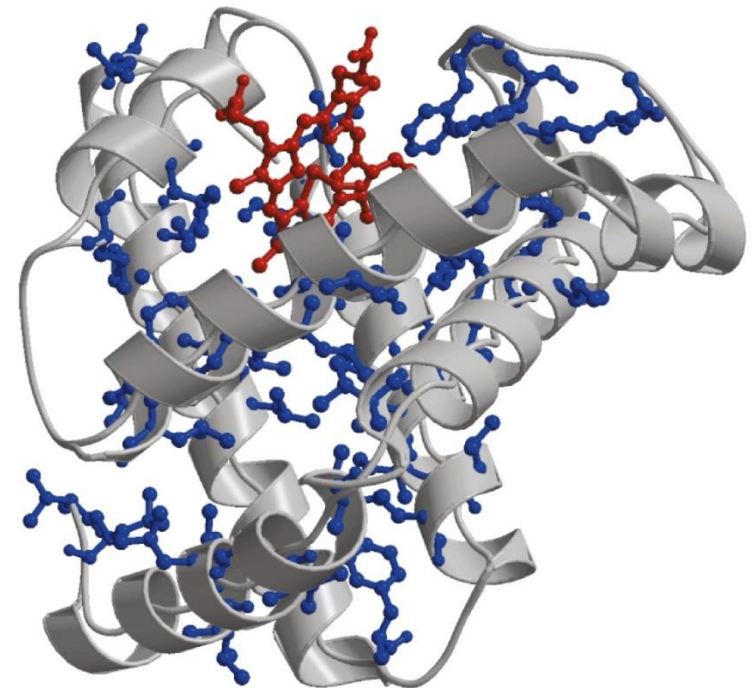
A

Συνήθως βρίσκονται στο εσωτερικό της πρωτεΐνης

Π.χ στη Μυογλοβίνη

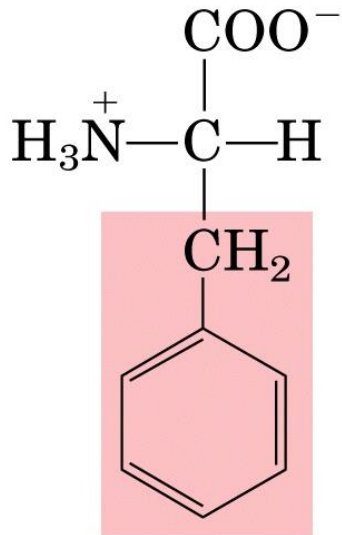
Blue = non-polar R-group

Red = Αίμη



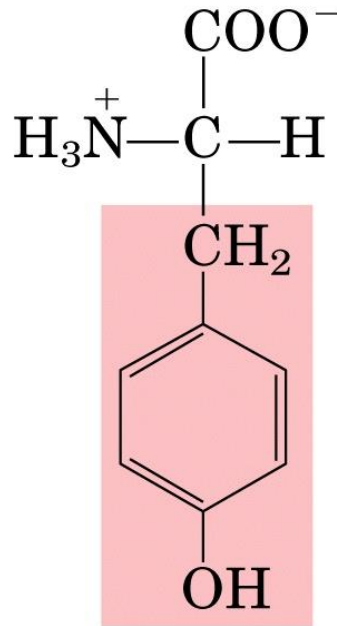
(d)

Aromatic R groups



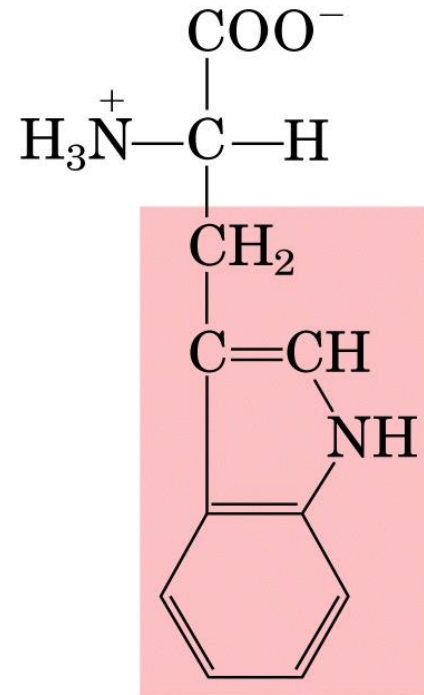
F

Phenylalanine



Y

Tyrosine

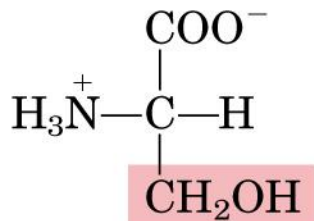


Tryptophan W

Εσωτερικά

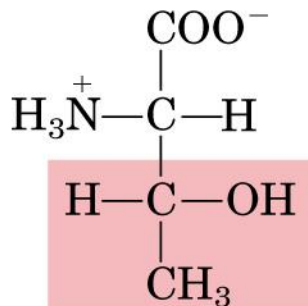
Επιφανειακά /Εσωτερικά

Polar, uncharged R groups



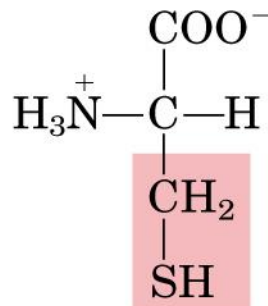
S

Serine



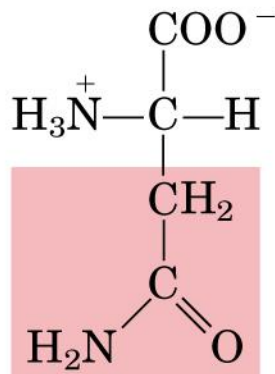
T

Threonine



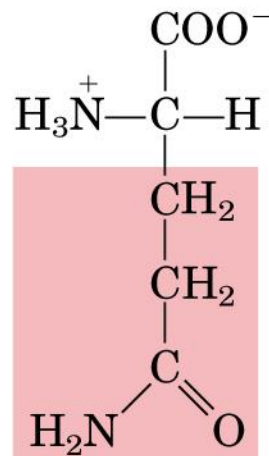
C

Cysteine



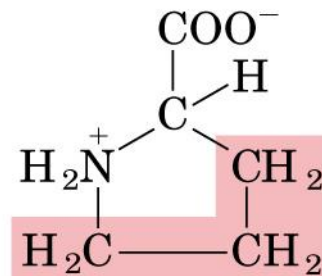
N

Asparagine



Q

Glutamine

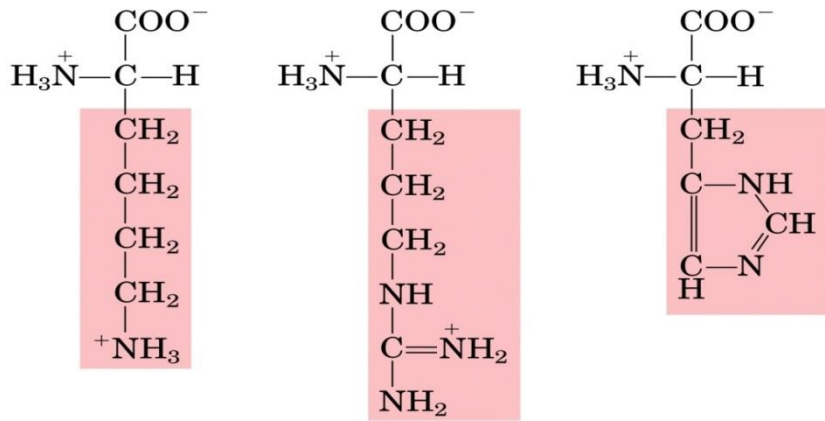


P

Proline

Συνήθως βρίσκονται στο εξωτερικό τμήμα της πρωτεΐνης

Positively charged R groups

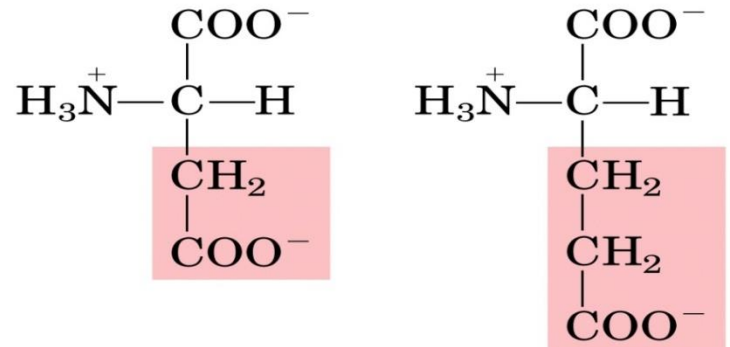


Lysine

Arginine

Histidine

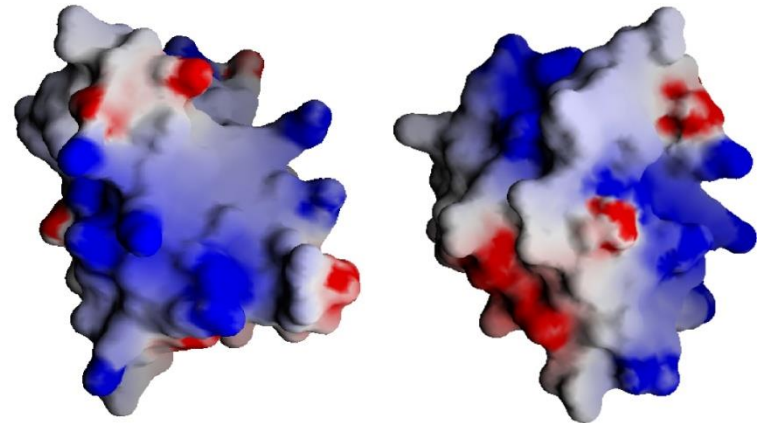
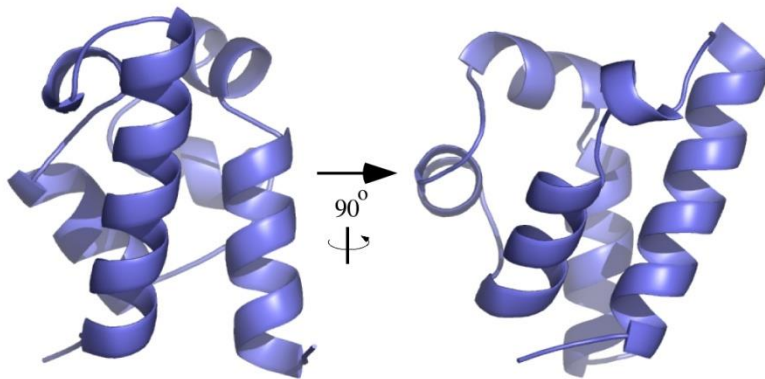
Negatively charged R groups



Aspartate

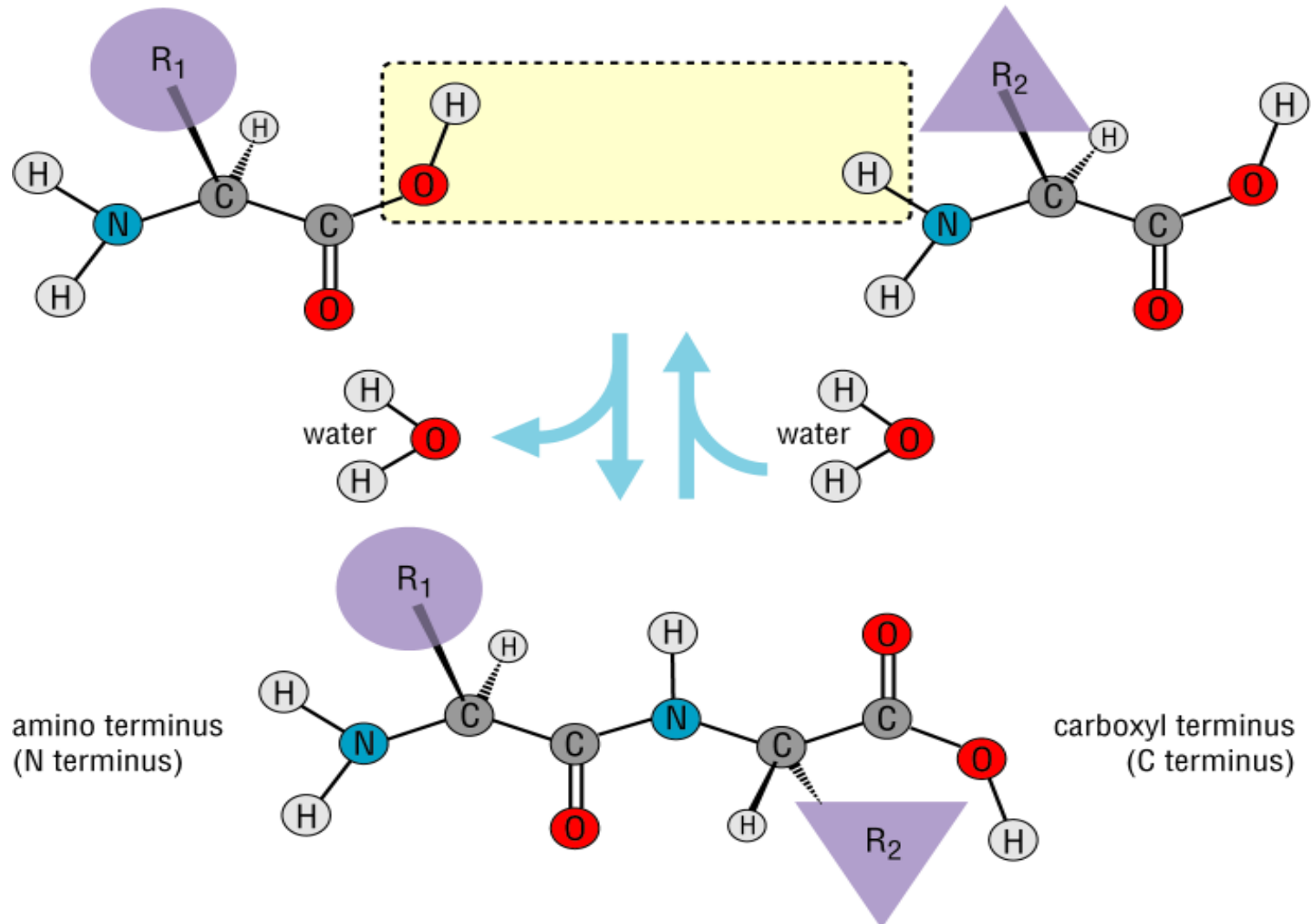
Glutamate

Βρίσκονται στο εξωτερικό τμήμα των πρωτεϊνών και κάποιες φορές στο εσωτερικό αλλά τότε συνδέονται με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα σχηματίζοντας ιοντικούς δεσμούς

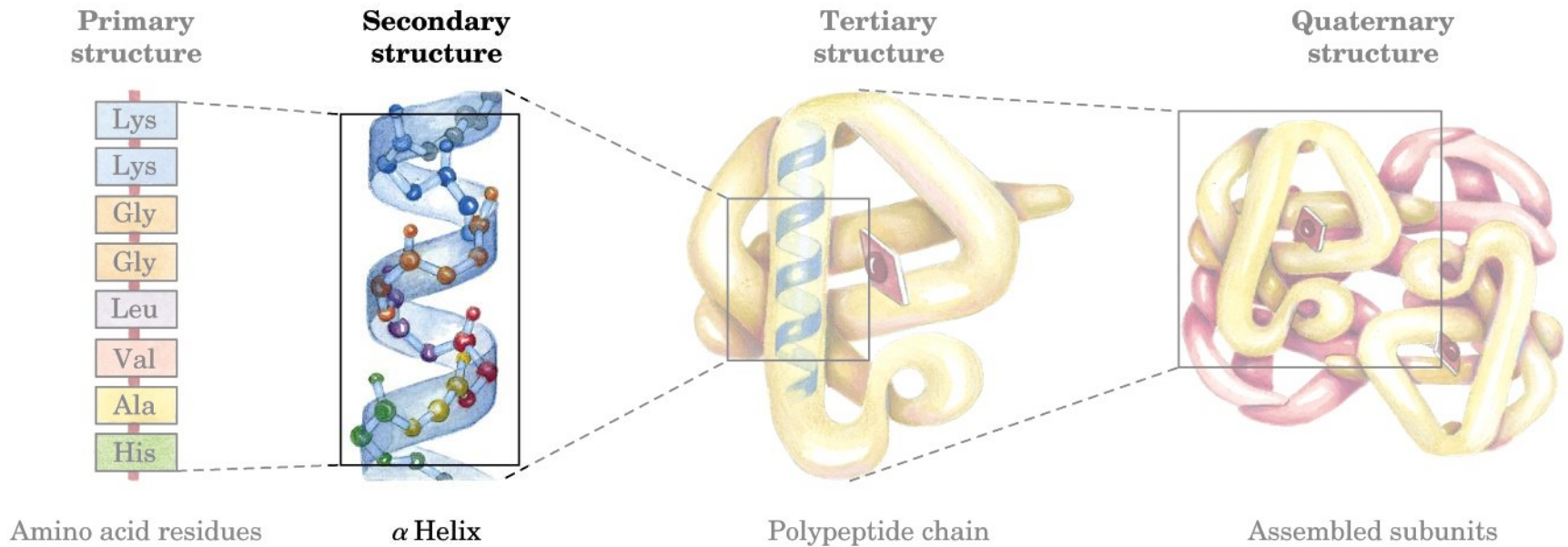


ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ

From **Protein Structure and Function** by Gregory A Petsko and Dagmar Ringe

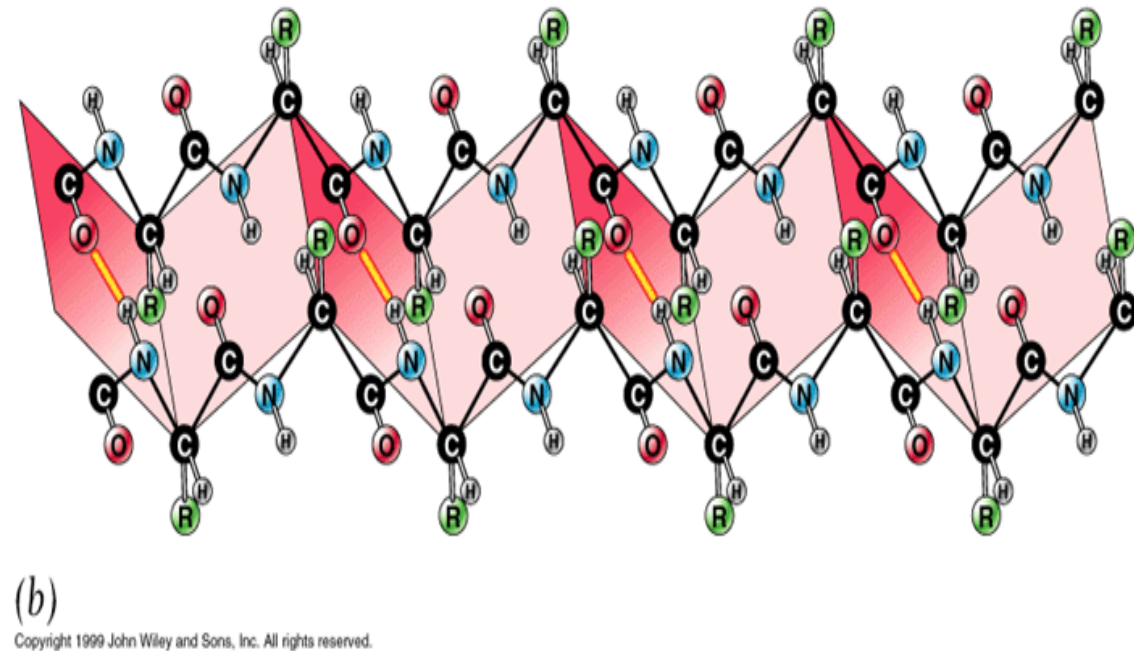
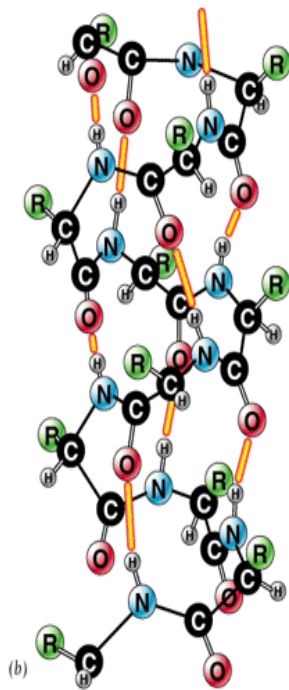
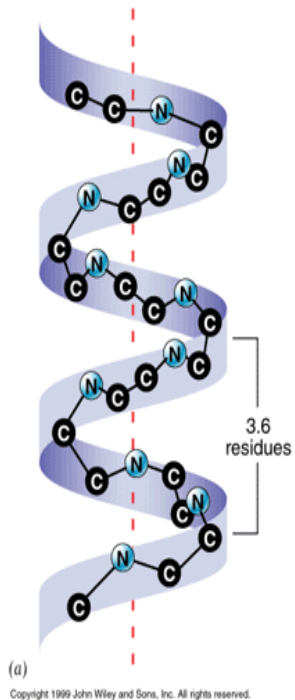


Δευτεροταγείς δομές: Κοντινές περιοχές της αλυσίδας δημιουργούν α-έλικες ή β-κλώνους.

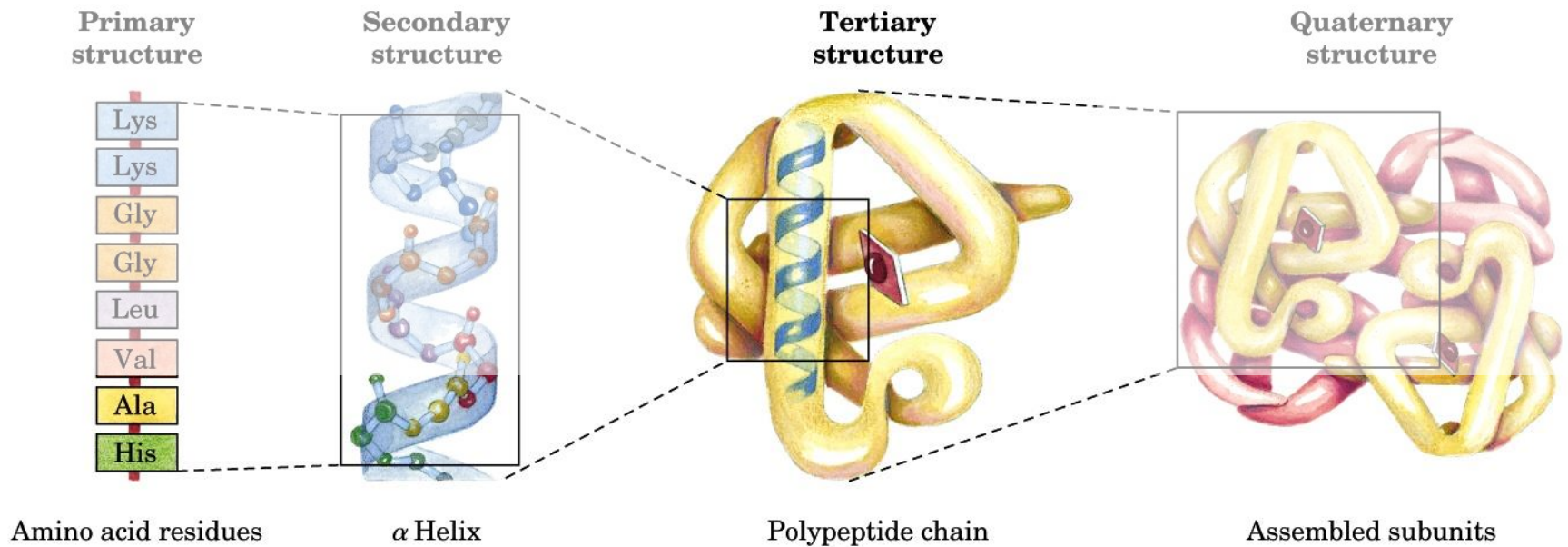


Στοιχεία Δευτεροταγούς Δομής

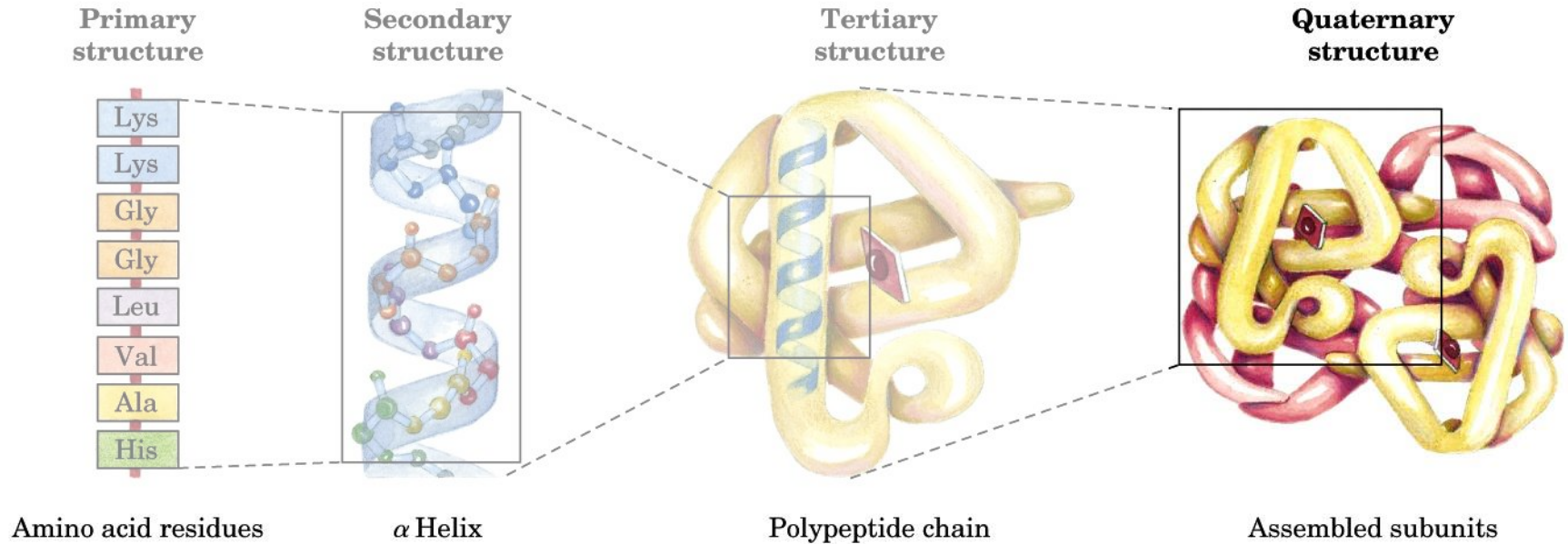
• Η δευτεροταγής δομή είναι συνήθως δύο τύπων: α -έλικες ή β -πτυχωτές επιφάνειες (ή β -πτυχωτά φύλλα). Και οι δυο τύποι χαρακτηρίζονται από δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις ομάδες NH και C=O της κύριας αλυσίδας και σχηματίζονται όταν ένας αριθμός συνεχόμενων καταλοίπων έχει τις ίδιες (ϕ) και (ψ) γωνίες κατά προσέγγιση.



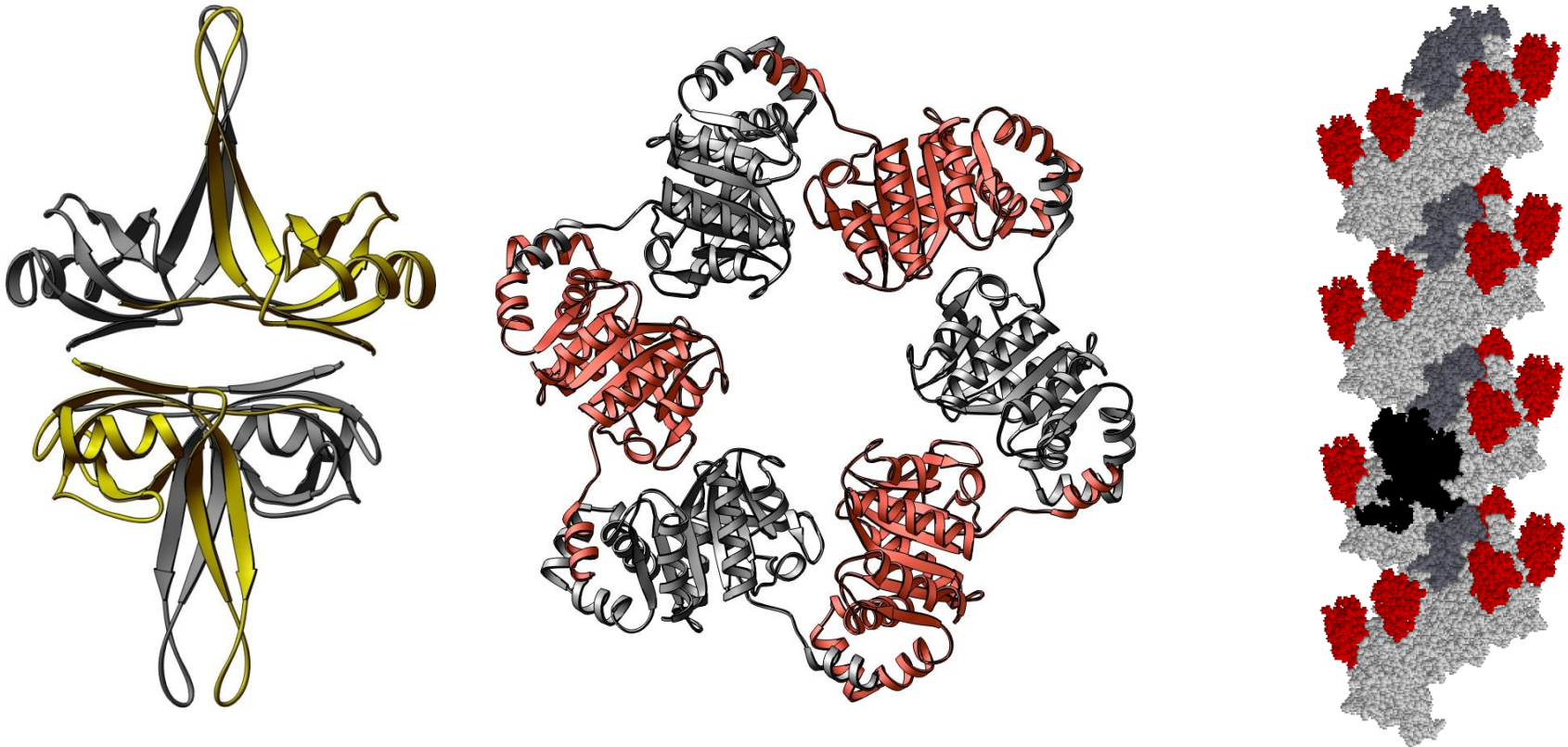
Τριτοταγής δομή: δημιουργείται με το 3D πακετάρισμα δευτεροταγών δομών σε σφαιρικές μονάδες που ονομάζονται αυτοτελείς δομικές περιοχές (**domains**)



Τεταρτοταγή δομή : η τελική πρωτεΐνη μπορεί να περιλαμβάνει περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες διευθετημένες μεταξύ τους με ανώτερη οργάνωση



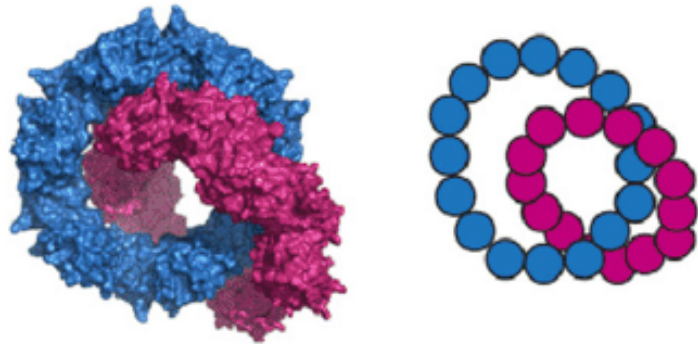
Κατά τη δημιουργία 3-ταγούς και 4-ταγούς δομής αμινοξέα απομακρυσμένα μεταξύ τους πλησιάζουν για να φτιάξουν μια λειτουργική περιοχή, ένα ενεργό κέντρο



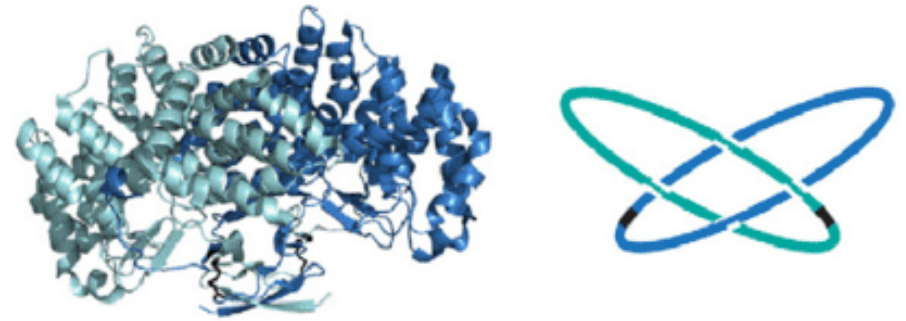
Οι αυτοτελείς δομικές περιοχές (domains) μπορεί να είναι περισσότερες από μια σε μια πρωτεΐνη και έχουν συγκεκριμένη λειτουργία

ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΜΟΤΙΒΑ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

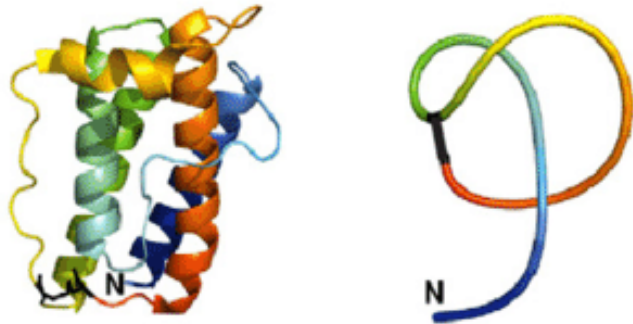
(a)



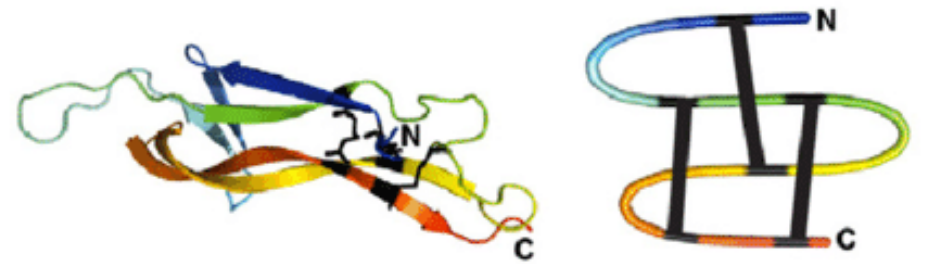
(b)



(c)



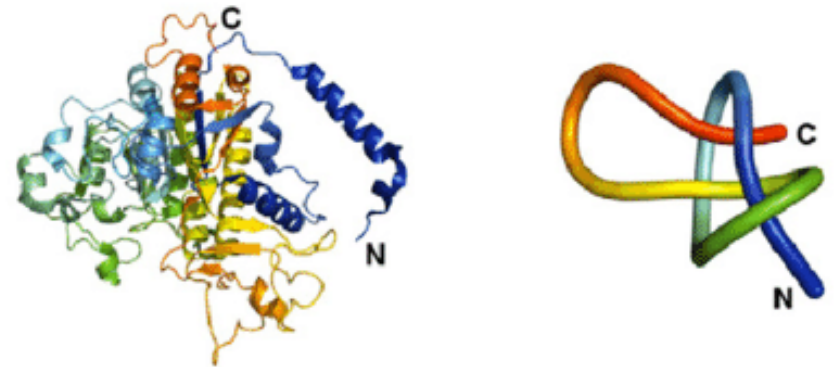
(d)



(e)



(f)



ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Σημαντικό : Τεράστιος αριθμός πρωτεϊνών σε μία πηγή

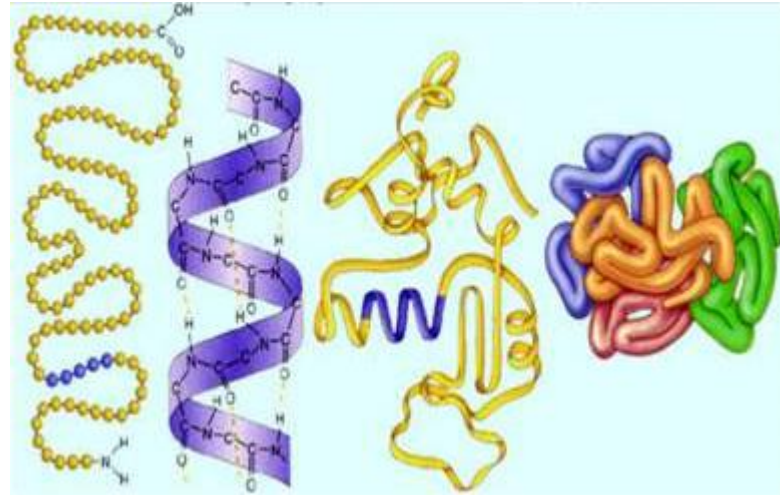
- ✓ Ευαίσθητες στις χημικές διεργασίες
- ✓ Δυσκολία στην εύκολη απόκτηση αρκετής ποσότητας λειτουργικής πρωτεΐνης για μελέτη



Πώς να μελετήσετε τις πρωτεΐνες;

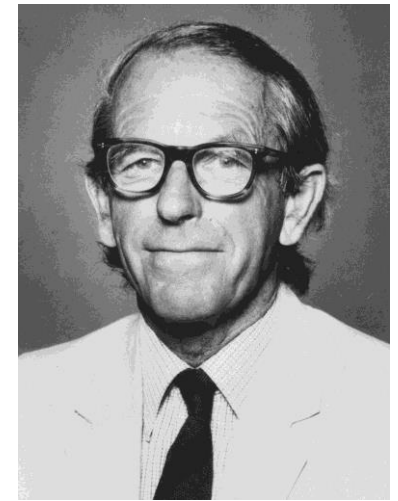
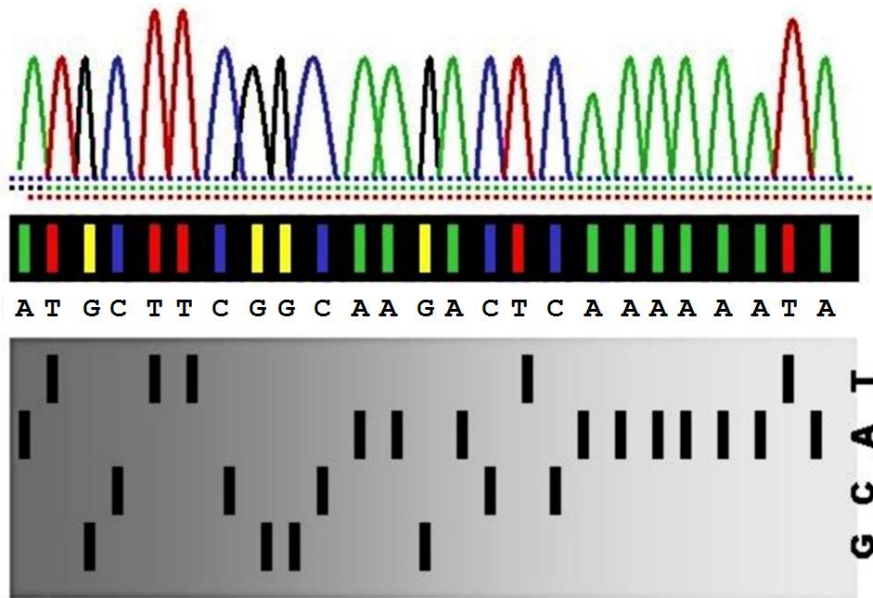
- ✓ Οι πρωτεΐνες μπορούν να καθαριστούν από κύτταρα ή ιστούς
- ✓ Ο καθορισμός της δομής μιας πρωτεΐνης ξεκινά με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας αμινοξέων της.
- ✓ Οι τεχνικές γενετικής μηχανικής επιτρέπουν τη μεγάλης κλίμακας παραγωγή, σχεδιασμό και ανάλυση σχεδόν οποιασδήποτε πρωτεΐνης

Ανάλυση πρωτεϊνών



- Προσδιορισμός της αλληλουχίας αμινοξέων μιας πρωτεΐνης (άμεσος)
- Προσδιορισμός της αλληλουχίας αμινοξέων μιας πρωτεΐνης με ανάλυση γονιδιακής αλληλουχίας (έμμεσος)

Προσδιορισμός της αλληλουχίας αμινοξέων μιας πρωτεΐνης



Frederick Sanger

- 1955 Amino acid sequence of insulin
- 1958 Nobel Prize
- 1992 The Wellcome Trust and the Medical Research Council established the Sanger Centre (Sanger Institute) in Cambridge

Οι πρωτεΐνες μπορούν να απομονωθούν από κύτταρα ή ιστούς Ομογενοποίηση Βιολογικού δείγματος – Διάσπαση κυττάρων

Αρχικό δείγμα π.χ βιολογικό υγρό, καλλιέργεια μικροοργανισμών, φυτικός ιστός, ζωικός ιστός

Το δείγμα περιέχει: **πρωτεΐνες, DNA**

- Εξωκυτταρικά (που μπορούν να συλλεχθούν χωρίς ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης)
- Ενδοκυτταρικά (που απαιτούν διάσπαση των κυττάρων)
- Θρεπτικά συστατικά (κυρίως σάκχαρα και άλατα)
- Οργανικά προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού όπως ένζυμα, αντιβιοτικά, αμινοξέα, βιταμίνες, νουκλεοτίδια κλπ.

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ

1. ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ - ΙΣΤΩΝ, ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ

BREAKING CELLS AND TISSUES

The first step in the purification of most proteins is to disrupt tissues and cells in a controlled fashion.

Using gentle mechanical procedures, called **homogenization**, the plasma membranes of cells can be ruptured so that the cell contents are released. Four commonly used procedures are shown here.

The resulting thick soup (called a **homogenate** or an **extract**) contains large and small molecules from the cytosol, such as enzymes, ribosomes, and metabolites, as well as all of the membrane-enclosed organelles.



- 1 Break cells with high-frequency sound.



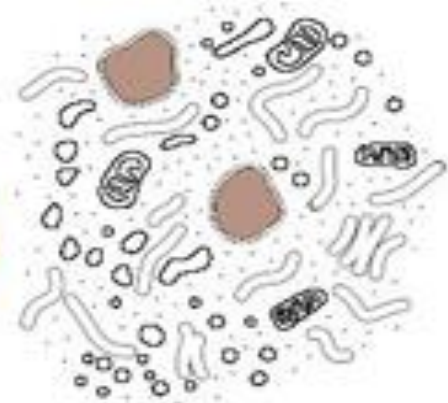
- 2 Use a mild detergent to make holes in the plasma membrane.



- 3 Force cells through a small hole using high pressure.



- 4 Shear cells between a close-fitting rotating plunger and the thick walls of a glass vessel.



When carefully conducted, homogenization leaves most of the membrane-enclosed organelles intact.

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ

1. ΧΗΜΙΚΗ ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ –ΙΣΤΩΝ, ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ

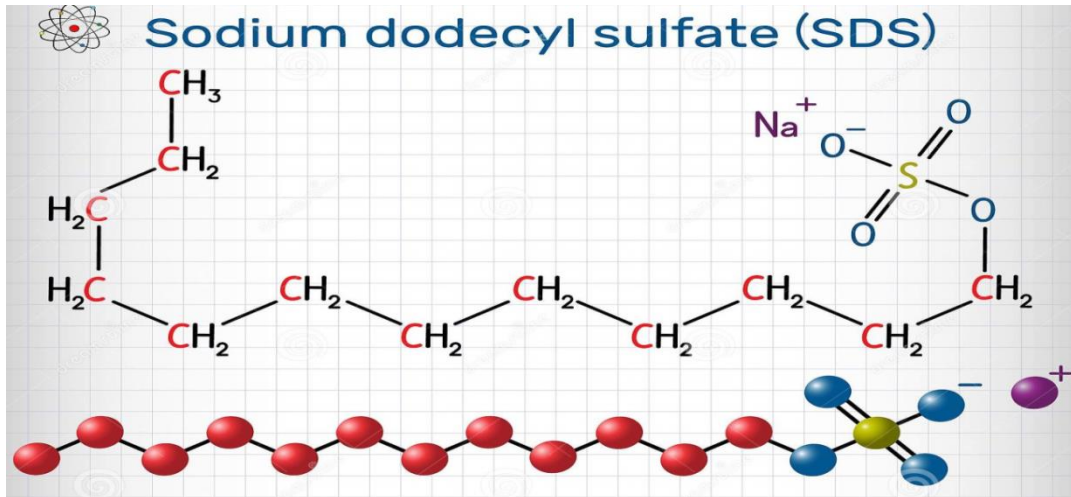
Προστίθεται ένα διάλυμα ομογενοποίησης - **Cell lysis**

1. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffer): π.χ TRIS, PBS δίνουν «φυσιολογικές τιμές» pH (7-8)
2. Ισορροπημένη σύσταση αλάτων: KCl, NaCl για διατήρηση της ιονικής ισχύος του ομογενοποιημένου δείγματος
3. Σακχαρόζη: σταθεροποίηση πρωτεϊνών (εμποδίζει την ωσμωτική λύση των κυτταρικών οργανιδίων).
4. Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (**EDTA**): δεσμεύει τα δισθενή μέταλλα, όπως Ca^{2+} , με αποτέλεσμα την αναστολή των μεταλλο-πρωτεασών, λιπασών
5. Αναστολείς προτεασών (**Protease Inhibitors**) : π.χ PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride). Επίσης DNase ή RNase.
6. Αναγωγικοί παράγοντες (Reducing agents): 2-mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT). Εμποδίζουν την οξείδωση πρωτεϊνών
7. Απορρυπαντικά (**Detergents**) : Triton X-100, δωδεκανόθειϊκό νάτριο SDS.

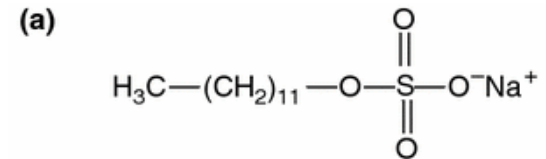
ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ

1.ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ - ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΜΕ ΑΠΟΡΡΥΠΑΝΤΙΚΑ

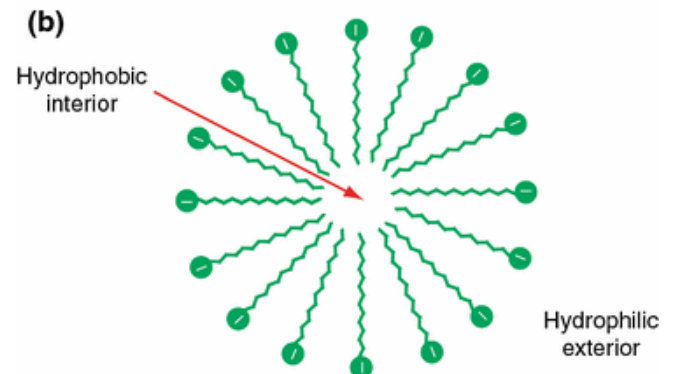
Διαλύματα που περιέχουν απορρυπαντικά, όπως το δωδεκυλοθειικό νάτριο Sodium Dodecyl Sulphate (SDS).



Αμφιπαθές μόριο, αποτελείται από μια υδρόφοβη ουρά και μια υδρόφιλη κεφαλή



Represented as



ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ

2.ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΑΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

- **Καταβύθιση (πυκνότητα, μέγεθος).** Η ταχύτητα καταβύθισης εξαρτάται τόσο από το μέγεθος όσο και από την πυκνότητα του σωματιδίου.
- **Διήθηση (μέγεθος).** Η διεργασία διαχωρισμού στερεών αιωρουμένων σε ένα ρευστό κατά τη διαβίβαση του αιωρήματος μέσα από στρώμα πορώδους υλικού (ηθμός).
- **Φυγοκέντρωση (πυκνότητα, μέγεθος).**
Ίδια αρχή με την καθίζηση με την διαφορά ότι έχουμε φυγοκεντρικό πεδίο με επιτάχυνση $\omega^2 r$.

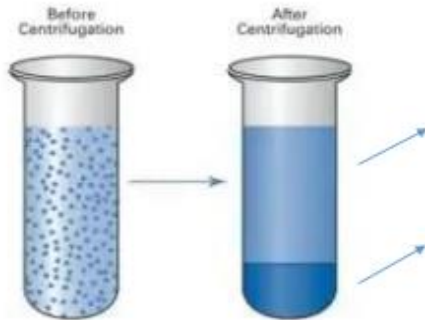
ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ

2. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

Φυγοκέντρηση - centrifugation

1. Η φυγοκέντρηση είναι μέθοδος ευρείας χρήσης για τον **διαχωρισμό κυττάρων** ακόμα και υποκυτταρικών οργανιδίων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων.
2. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και για την **ανάλυση των φυσικών ιδιοτήτων** των μακρομορίων

Το δείγμα προς
ανάλυση
υποβάλλεται
σε συνθήκες
άσκησης
φυγόκεντρου
δύναμης



Υπερκείμενο - Supernatant: Το υγρό που μένει πάνω από το ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση

Pellet: το ίζημα που σχηματίζεται στον πυθμένα του σωλήνα μετά τη φυγοκέντρηση

$$\text{Φυγόκεντρος δύναμη } F = m \omega^2 r$$



- Τα σωματίδια που είναι διασκορπισμένα σε ένα υγρό μείγμα καθιζάνουν λόγω βαρύτητας ($1 \times g$) αν η πυκνότητά τους είναι μεγαλύτερη από αυτήν του μείγματος. **Χρονοβόρα διαδικασία για ένα εργαστήριο!** Ένα σωματίδιο θα μετακινηθεί μέσα σε ένα υγρό αν βρεθεί σε πεδίο φυγόκεντρης δύναμης. Η δύναμη που αναπτύσσεται στα σωματίδια είναι πολύ μεγαλύτερη από τη δύναμη της βαρύτητας

2. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

- **ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ:**

Διαδοχικές φυγοκεντρήσεις κάθε φορά με μεγαλύτερη ταχύτητα. Κάθε φορά συλλέγουμε το υπερκείμενο και ξαναφυγοκεντρούμε σε μεγαλύτερες στροφές.

- **ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗ ΠΥΚΝΩΤΗΤΑΣ:**

Χρησιμοποιούμε συνεχή ή ασυνεχή βαθμίδωση πυκνότητας (συνήθως υδατικό διάλυμα σουκρόζης 15%-40%). Μετά τη φυγοκέντρηση τα διαφορετικής πυκνότητας συστατικά του δείγματος θα ισορροπούν σε διαφορετική θέση στο μήκος του σωλήνα ανάλογα με την πυκνότητά τους.

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

2. Διαφορική φυγοκέντρηση – παράδειγμα

Διαχωρισμός κυτταρικών υποσωματιδίων με βάση το μέγεθος

Κυτταρικό ομογενοποίηση:

Φυγοκέντρηση στα **600g** για 10min

→ καταβύθιση ανέπαφων κυττάρων και πυρήνων (pellet)

Φυγοκέντρηση υπερκείμενου στα **15000g** για 10min

→ καταβύθιση μιτοχονδρίων, λυσοσωματίων, περοξισωματίων

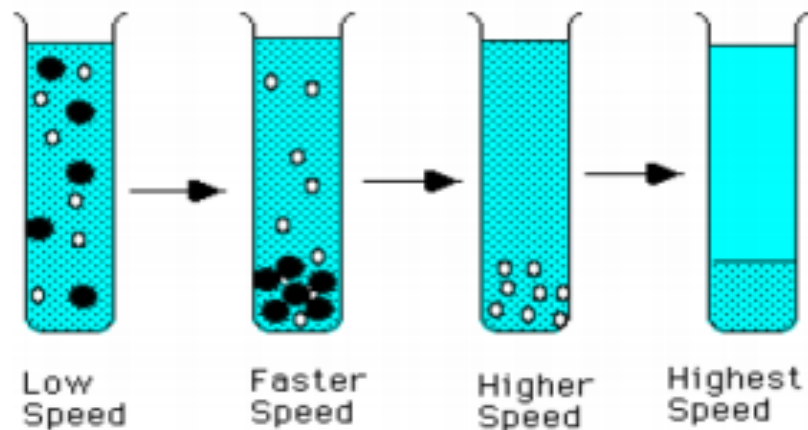
Φυγοκέντρηση υπερκείμενου στα **100000g** για 30-60min

→ καταβύθιση ριβοσωμάτων, μικροσωμάτων

Φυγοκέντρηση υπερκείμενου στα **300000g** για 1-2h

→ καταβύθιση υπομονάδων ριβοσωμάτων

→ στο υπερκείμενο βρίσκονται οι διαλυτές πρωτεΐνες και το διαλυτό τμήμα του κυτταροπλάσματος



υπερφυγοκέντρηση

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

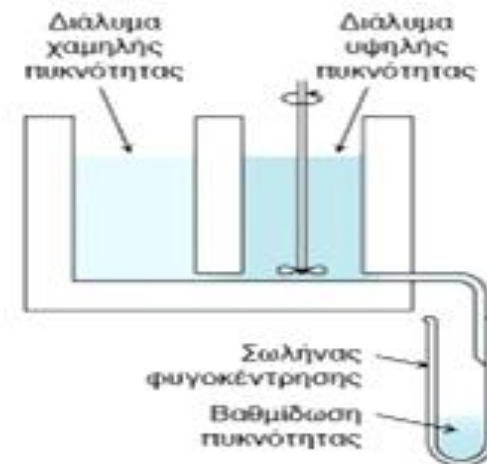
- Ο ρυθμός καθίζησης των συστατικών εξαρτάται από το μέγεθος του κάθε σωματιδίου και την πυκνότητά του.
- Αν έχουμε σωματίδια της ίδιας πυκνότητας θα καθιζάνουν πιο γρήγορα τα μεγαλύτερα σε μέγεθος
- Αν έχουμε σωματίδια ίδιου μεγέθους θα καθιζάνουν πιο γρήγορα τα πυκνότερα

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ

3. Φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας (Density gradient centrifugation)

- Η δημιουργία μιας βαθμίδωσης πυκνότητας σε έναν φυγοκεντρικό σωλήνα επιτρέπει τον διαχωρισμό σωματιδίων με διαφορετικούς S .
- Η δημιουργία βαθμίδωσης συγκέντρωσης επιτυγχάνεται με υλικά όπως η σακχαρόζη, γλυκερόλη ή το ficoll που είναι ένας ουδέτερος πολυσακχαρίτης, μεγάλου μοριακού βάρους, με πολλές διακλαδώσεις, υδρόφιλος, υδατοδιαλυτός.

1. Αναμειγνύοντας ίσες ποσότητες ενός διαλύματος χαμηλής πυκνότητας (όπως 5% σακχαρόζη) και ενός διαλύματος υψηλής πυκνότητας (όπως 20% σακχαρόζη) επιτυγχάνουμε τη δημιουργία μιας γραμμικής βαθμίδωσης σακχαρόζης από 20% στον πυθμένα έως 5% στην κορυφή του σωλήνα



(A)

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ

Βαθμίδωση διαλύματος σακχαρόζης 5-20%

Πυκνότητα₁ < πυκνότητα₂ < πυκνότητα₃ < πυκνότητα₄ < πυκνότητα₅ < πυκνότητα₆

Το δείγμα τοποθετείται στην κορυφή του φυγοκεντρικού σωλήνα ως λεπτή στοιβάδα

Στο τέλος της φυγοκέντρωσης τα σωματίδια έχουν διαχωριστεί ανάλογα με το μέγεθος και τη μάζα τους



Τα σωματίδια μπορούν να συλλεχθούν στο τέλος της φυγοκέντρωσης ανοίγοντας μια οπή στον πυθμένα του σωλήνα

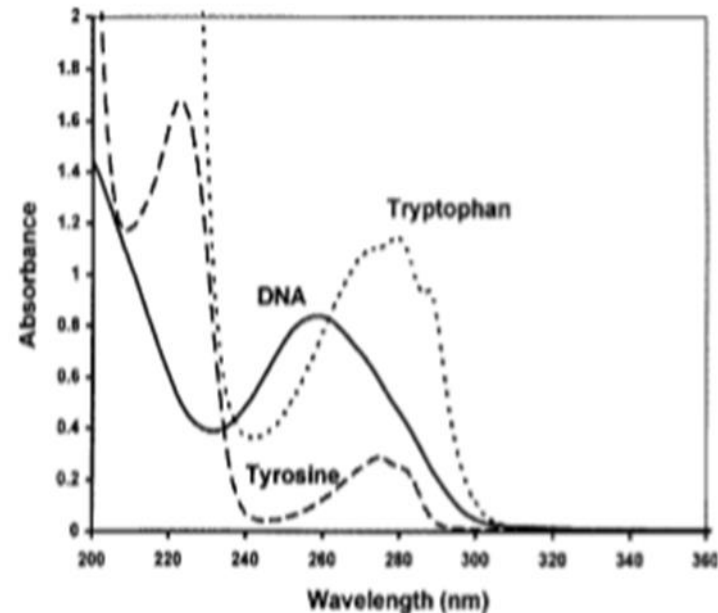
Η προτιμώμενη μέθοδος διαχωρισμού υποκυτταρικών σωματιδίων και μακρομορίων

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Συχνά στηρίζεται σε αντιδράσεις ομάδων αμινοξέων.
Απαραίτητος ο προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης.

- **Φασματοφωτομετρικά:** Λόγω της απορρόφησης των αρωματικών δακτυλίων της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης στα 280nm.

Οι δακτυλίοι των αρωματικών αμινοξικών καταλοίπων (**τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη**) παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 280nm, γιατί τα ηλεκτρόνια του αρωματικού δακτυλίου είναι απεντοπισμένα (είναι ελεύθερα να κινηθούν σε ολόκληρο το συζυγές σύστημα).



- **Μέθοδος Bradford (1976)** Βασίζεται στην απορρόφηση (595 nm) της χρωστικής Coomassie Blue

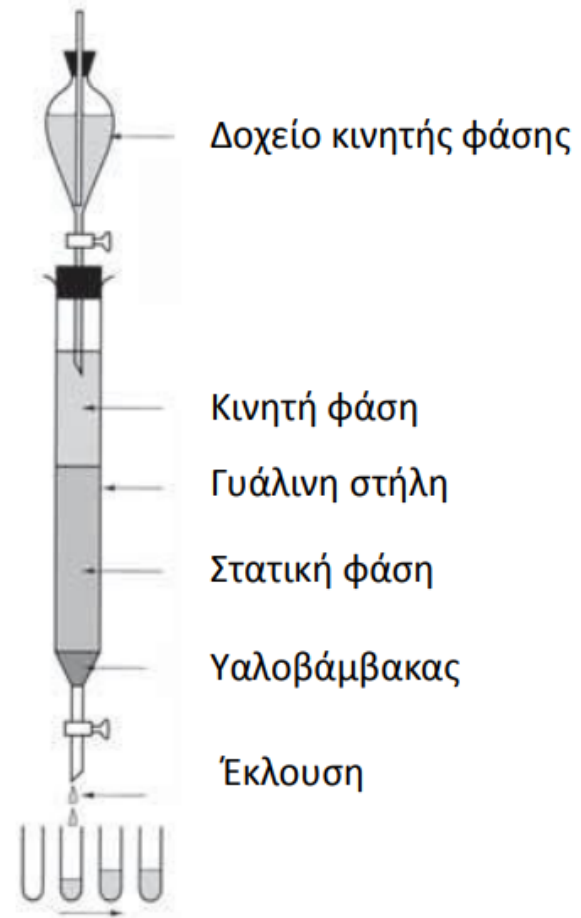
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Χρωματογραφία Στήλης

Το προς διαχωρισμό δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης, έτσι ώστε να δημιουργήσει μια διακριτή ζώνη. • Το δείγμα διέρχεται από τη στατική φάση. • Στη συνέχεια το δείγμα εκλύεται από την κινητή φάση.

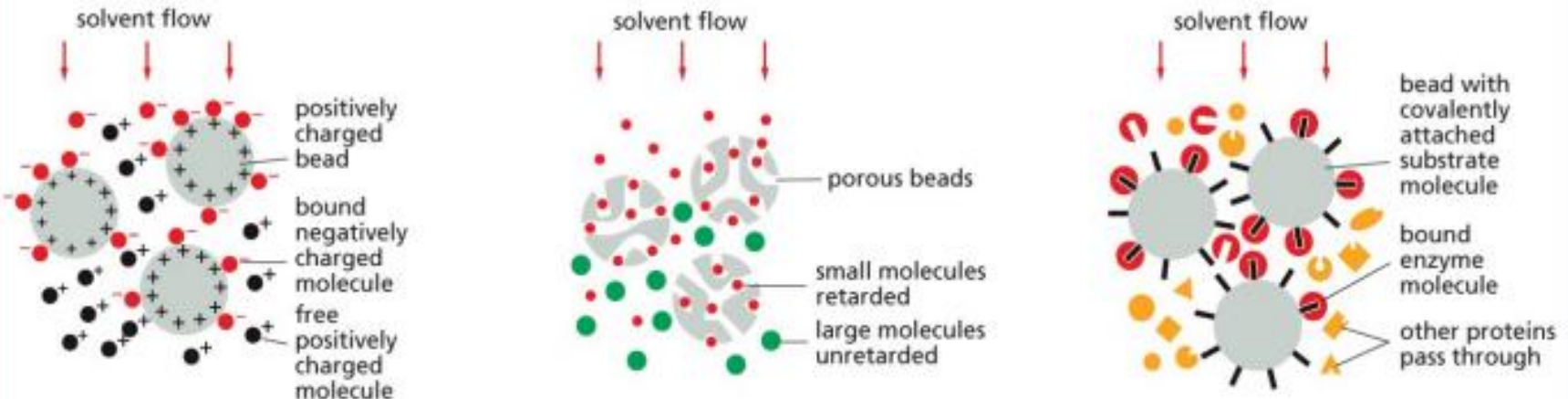
• Εάν οι διάφορες ουσίες του δείγματος έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής, τότε θα διαχωριστούν μέσα στη στήλη και θα εκλουστούν (θα εξέλθουν) σε διαφορετικούς χρόνους, όσο η κινητή φάση περνά μέσα από τη στήλη.

• Εάν κάτω από τη στήλη τοποθετηθεί κλασματοσυλλέκτης, τότε μπορούν να συλλεγούν τα διάφορα κλάσματα, καθώς βγαίνουν από τη στήλη.



THREE KINDS OF CHROMATOGRAPHY

Although the material used to form the matrix for column chromatography varies, it is usually packed in the column in the form of small beads. A typical protein purification strategy might employ in turn each of the three kinds of matrix described below, with a final protein purification of up to 10,000-fold. Purity can easily be assessed by gel electrophoresis (Panel 4–5).



(A) ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

Ion-exchange columns are packed with small beads carrying either positive or negative charges that retard proteins of the opposite charge. The association between a protein and the matrix depends on the pH and ionic strength of the solution passing down the column. These can be varied in a controlled way to achieve an effective separation.

(B) GEL-FILTRATION CHROMATOGRAPHY

Gel-filtration columns separate proteins according to their size. The matrix consists of tiny porous beads. Protein molecules that are small enough to enter the holes in the beads are delayed and travel more slowly through the column. Proteins that cannot enter the beads are washed out of the column first. Such columns also allow an estimate of protein size.

(C) AFFINITY CHROMATOGRAPHY

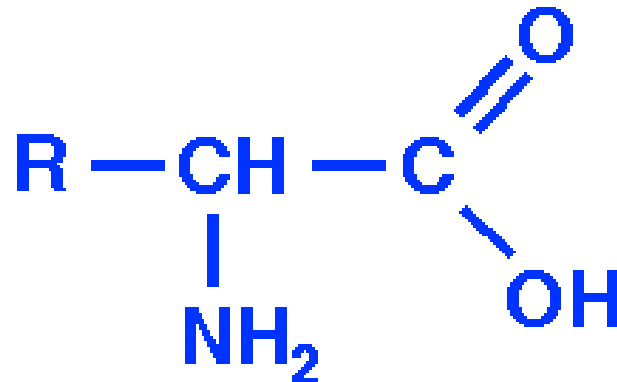
Affinity columns contain a matrix covalently coupled to a molecule that interacts specifically with the protein of interest (e.g., an antibody or an enzyme substrate). Proteins that bind specifically to such a column can subsequently be released by a pH change or by concentrated salt solutions, and they emerge highly purified (see Figure 4–55).

ΜΕΘΟΔΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Καθορισμός του μοριακού βάρους (ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ)
- Διερεύνηση της καθαρότητας
- Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης στο δείγμα ή και επαλήθευση της ήδη γνωστής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης
- Διερεύνηση της ύπαρξης πρωτεολυτικής δραστηριότητας
- Αναζήτηση πιθανών πρωτεϊνικών τροποποιήσεων (π.χ. μεθυλίωση).

ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Το μέγεθος μετράται σε kilodaltons (kD)
- **Dalton** = περίπου η μάζα ενός ατόμου υδρογόνου ή 1.66×10^{-24} gram
- Μέσο μέγεθος αμινοξέος = 110 daltons
- Μοριακό βάρος πρωτεϊνών : 5.500 -220.000 g/mol

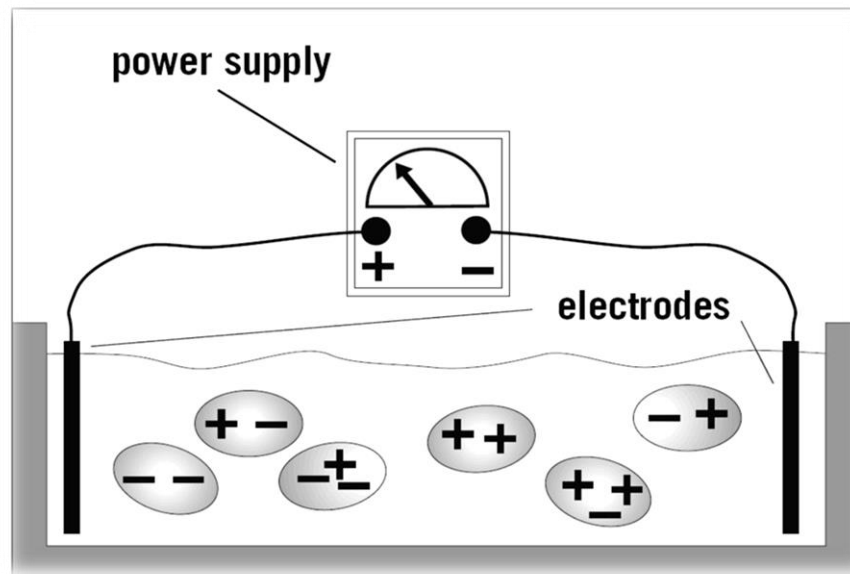


ΜΕΘΟΔΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

Φορτισμένα μόρια σε διάλυμα (πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα) μετακινούνται υπό την επίδραση σταθερού ηλεκτρικού πεδίου

Μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών με βάση το ηλεκτρικό τους φορτίο και την ταχύτητα μετακίνησης στο ηλεκτρικό πεδίο

Η σχετική ταχύτητά τους εξαρτάται από το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα της πρωτεΐνης, τη θερμοκρασία και τις ιδιότητες του μέσου που κινούνται και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου



Υποστρώματα της Ηλεκτροφόρησης

- Αδρανή υλικά
- Επίπεδα, κυλινδρικά ή σε μορφή σφαιριδίων (τζελ με πόρους)

Ως υπόστρωμα μπορεί να χρησιμοποιηθούν τα παρακάτω:

- Τζελ αγαρόζης
- Τζελ αμύλου
- **Τζελ πολυακρυλαμιδίου**
- Οξική κυτταρίνη
- Διηθητικό χαρτί ή χαρτί Whatman

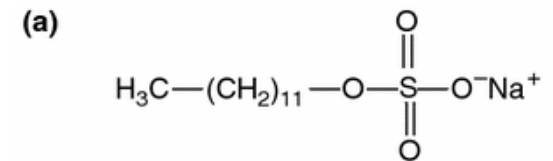
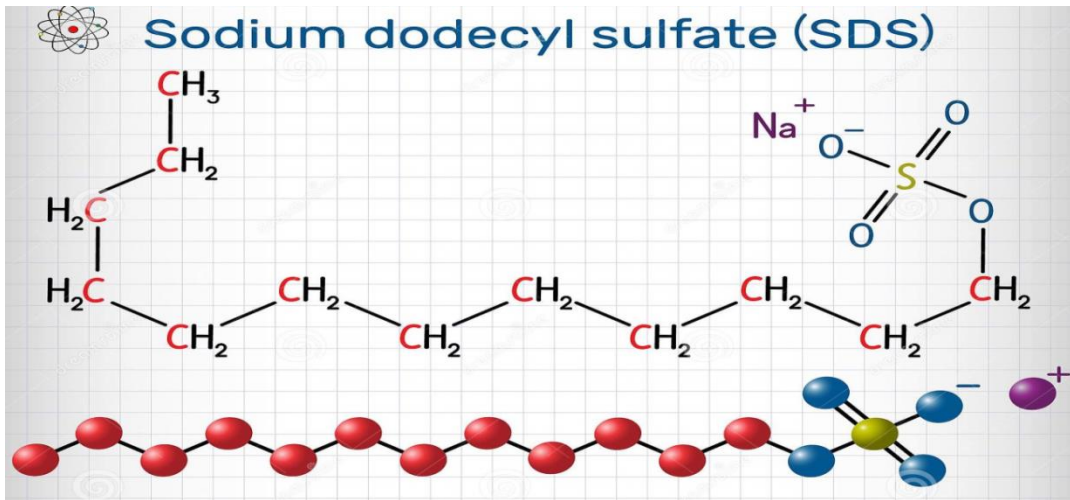
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE

(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis)

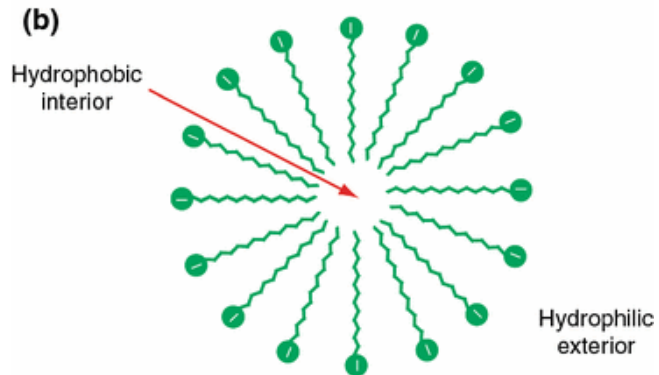
Διαχωρισμός με βάση το Μοριακό Βάρος των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

SDS αποδιατακτικός παράγοντας

Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)

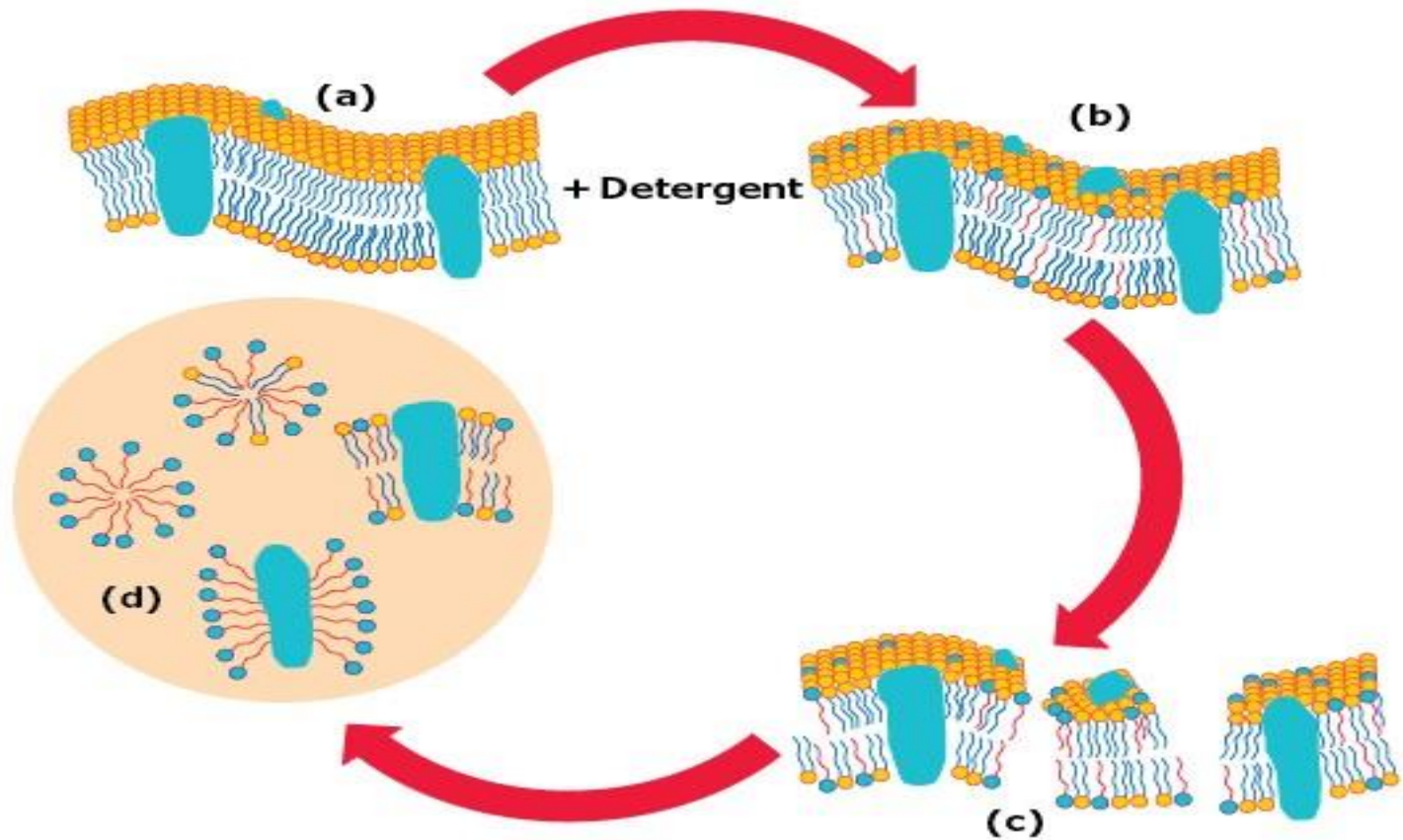


Represented as



Αμφιπαθές μόριο, αποτελείται από μια υδρόφοβη ουρά και μια υδρόφιλη κεφαλή

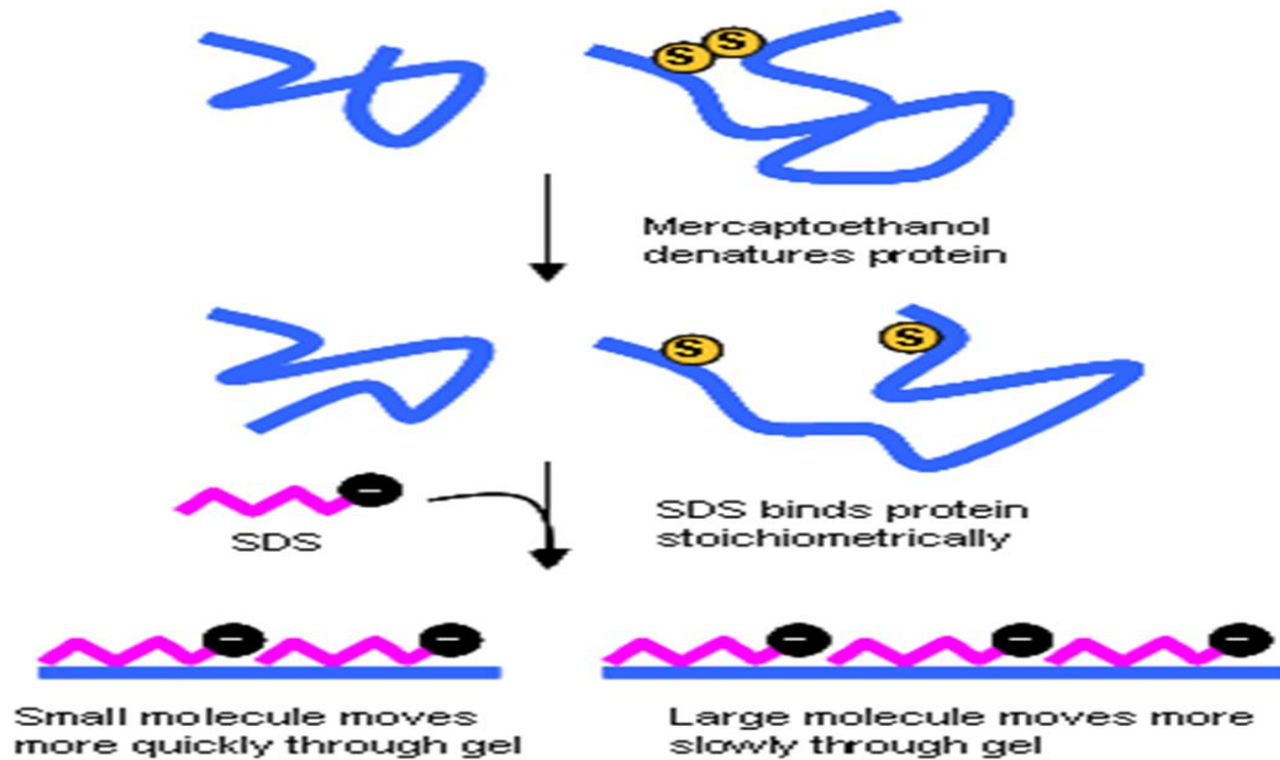
SDS



- Διασπά τη συνοχή των φωσfolιπιδίων και δημιουργεί σύμπλοκα με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες καθιστώντας τις υδατοδιαλυτές
- Δεσμεύει και τις μη μεμβρανικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες
- Διαταράσσει τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών
- Απομακρύνει τις ιστόνες από τα μόρια DNA
- **Προσδίδει αρνητικό φορτίο στα μόρια**

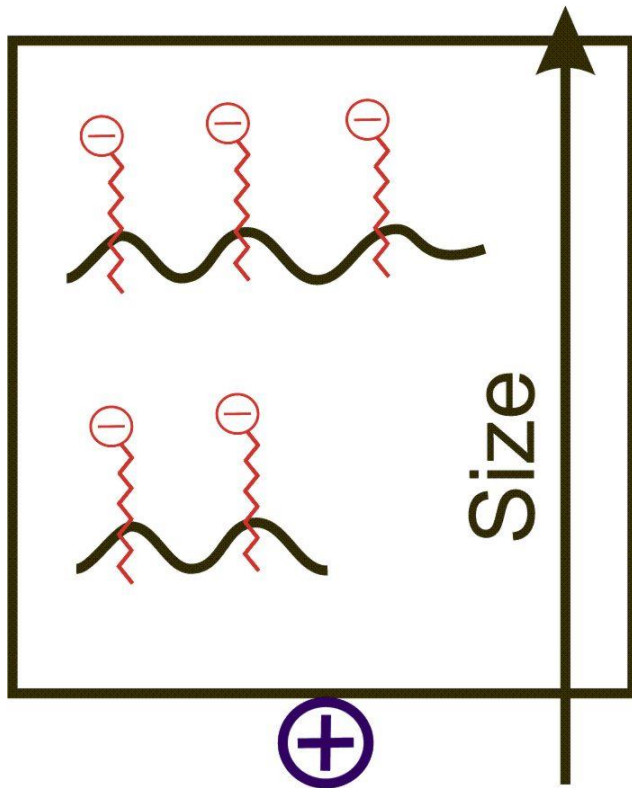
SDS αρνητικά φορτισμένος αποδιατακτικός παράγοντας

- Το SDS προσδένεται στα υδρόφοβα τμήματα της πρωτεΐνης, καταστρέφοντας την τριτοταγή της δομή, ώστε να διατηρείται στο διάλυμα της σε διαμόρφωση χαμηλότερης οργάνωσης.
- Το σύμπλεγμα του SDS με την αναδιατεταγμένη πρωτεΐνη, αποκτά σημαντικό αρνητικό φορτίο, που είναι ανάλογο με τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης
- Ως αποτέλεσμα, η μοριακή μάζα του συμπλόκου SDS-πρωτεΐνης είναι ανάλογη με το μέγεθος και κατ' επέκταση με το μήκος της αλυσίδας.



Προστίθεται συνήθως μερκαπτοαιθανόλη (BME) ή Dithiothreitol (DTT) που έχουν την ιδιότητα να ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται μεταξύ ομάδων -SH κυστεινών. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση.

SDS PAGE



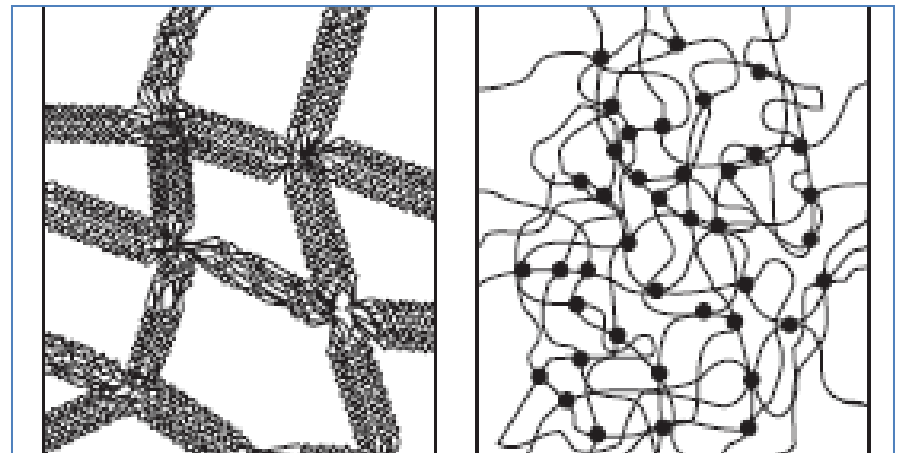
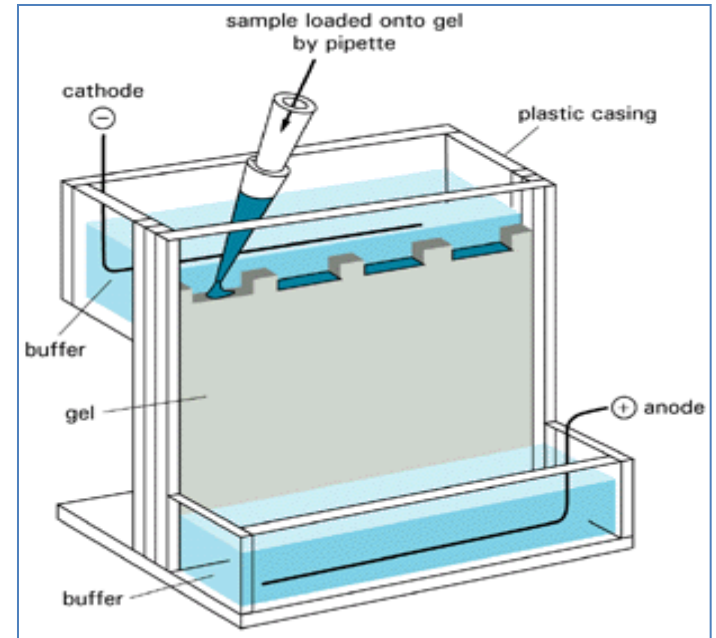
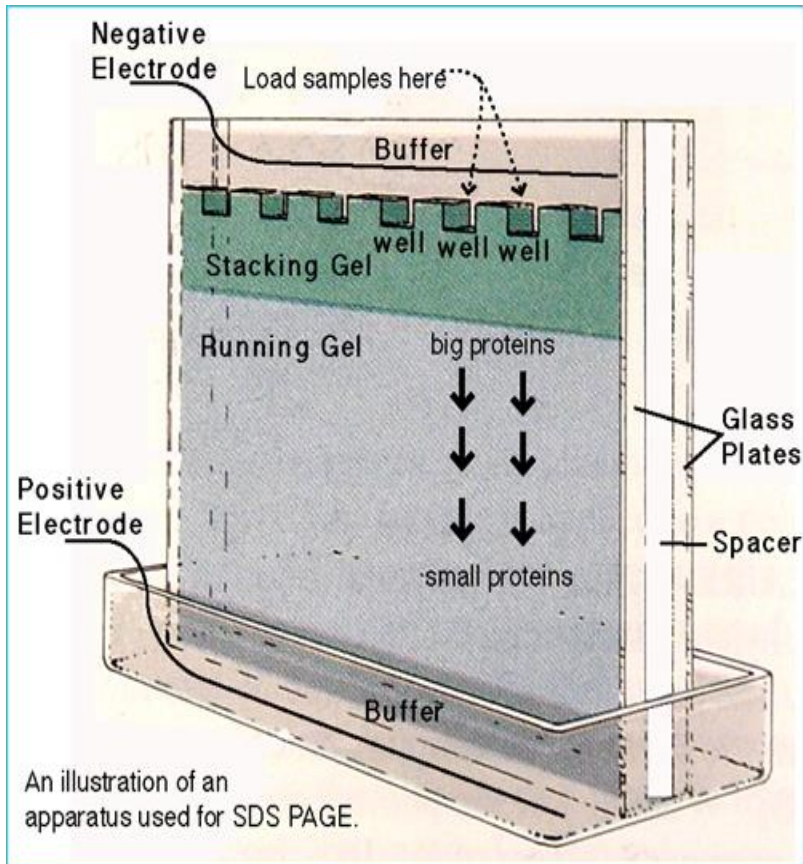
Μέγεθος πρωτεϊνών kilodaltons (kD)

Dalton = περίπου η μάζα ενός ατόμου υδρογόνου ή 1.66×10^{-24} gram

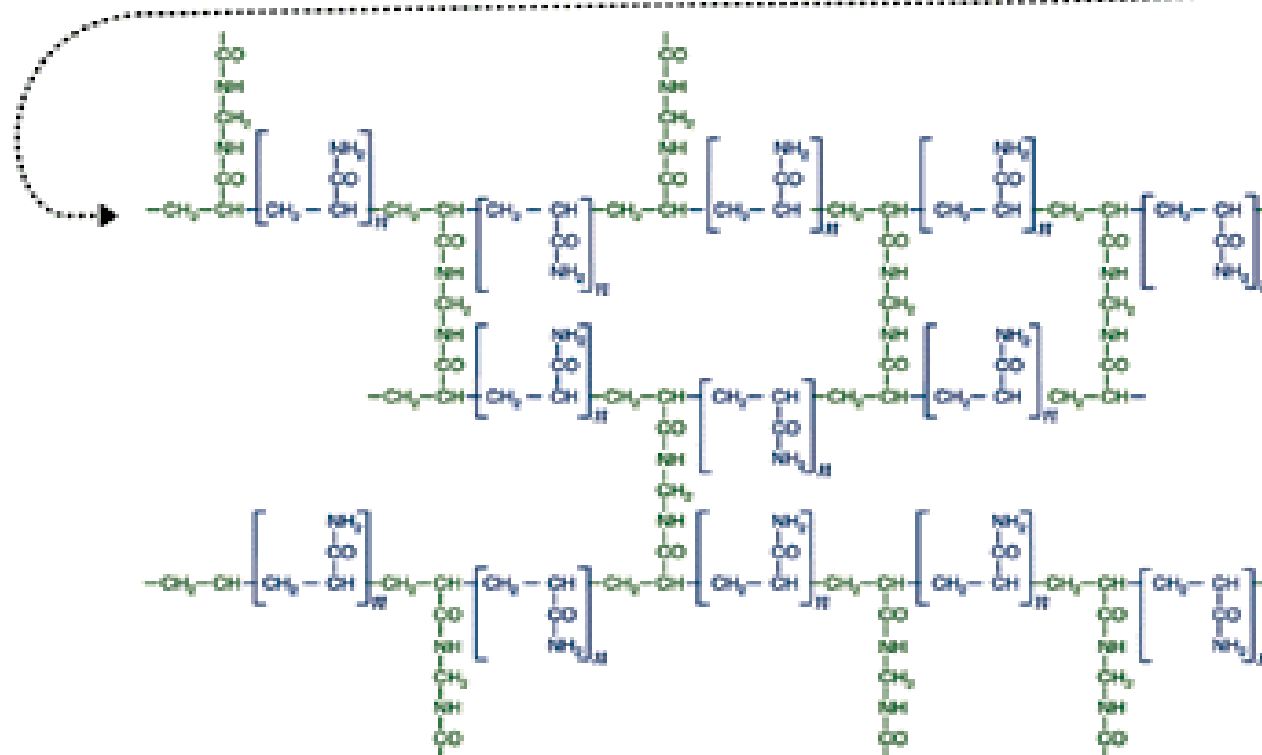
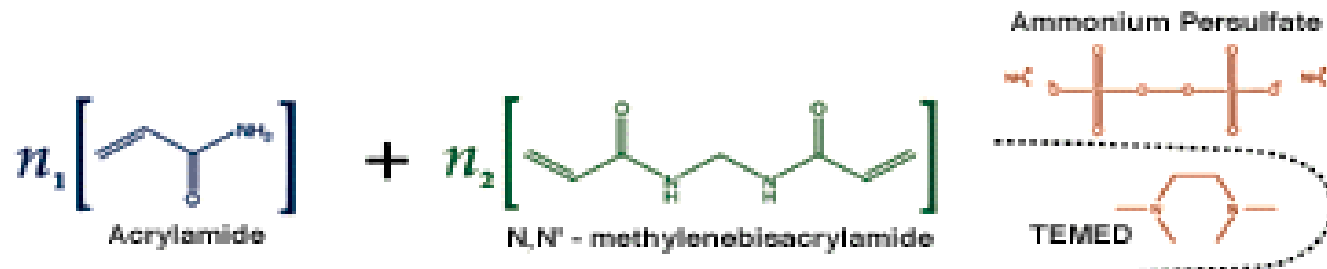
Μέσος όρος μάζας αμινοξέως = 110 daltons

Πολύ καλός διαχωρισμός ώστε να επιτρέπει την ακριβή εκτίμηση του μεγέθους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Gels



Κατασκευή πηκτώματος (Gels)



The Polyacrylamide Matrix

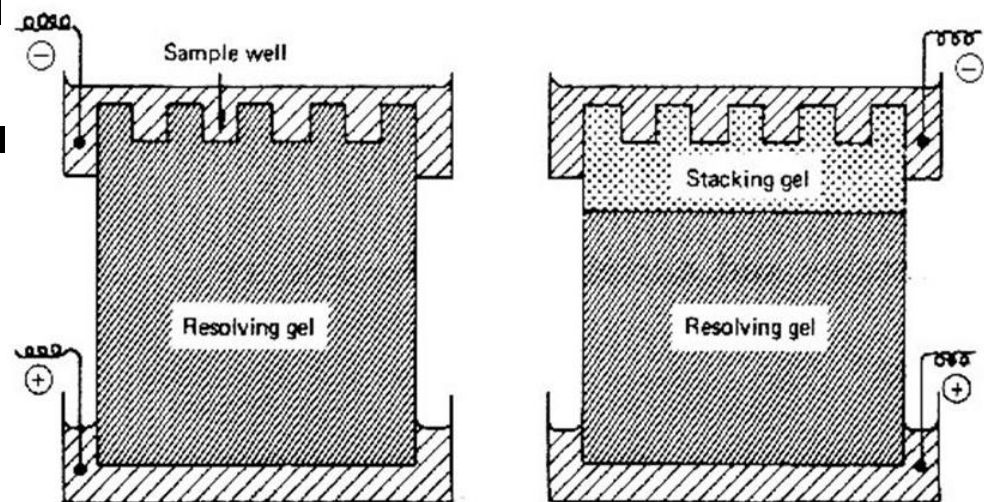
Κατασκευή πήκτωματος (Gel)

Το πήκτωμα μπορεί να κατασκευαστεί είτε με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης είτε με τη δημιουργία ενός “συγκεντρωτικού” gel (**stacking gel**) ακριβώς πάνω από το “αναλυτικό” gel (**resolving gel**).

Το **stacking gel** έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το **resolving gel**, στο οποίο γίνεται και ο διαχωρισμός του δείγματος.

Η διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης επιτρέπει στα δείγματα να συγκεντρωθούν στο πρώτο πήκτωμα (**stacking gel**) πριν εισέλθουν στο δεύτερο πήκτωμα όπου και

Με τον τρόπο αυτό το κάθε δείγμα ξεκινάει να διαχωρίζεται από το ίδιο σημείο.



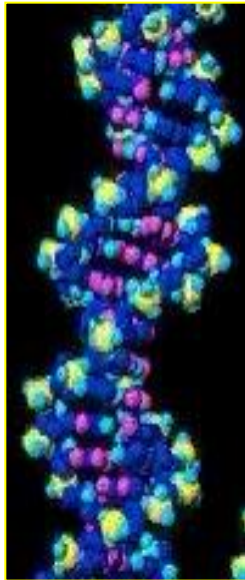
Καταλληλότερες κλίμακες ανάλυσης (Optimal Resolution Ranges) (Hames, 1981)

(%) συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης	Αναλυτική ικανότητα
15% Gel	15 με 45 kDa
12,5% Gel	15 με 60 kDa
10% Gel	18 με 75 kDa
7,5% Gel	30 με 120 kDa
5% Gel	60 με 212 kDa

Απαιτούμενος χρόνος (ενδεικτικά)

Προετοιμασία πηκτής διαχωρισμού: 30 λεπτά.
Προετοιμασία πηκτής επιστοίβασης: 30 λεπτά.
Φόρτωση (τοποθέτηση) δειγμάτων: 15 λεπτά.
Ηλεκτροφόρηση: 30-45 λεπτά.
Χρωματισμός: Coomassie Staining (30 λεπτά),
Χρωστική αργύρου (3 ώρες).

Γιατί
χρησιμοποιούμε
Τζελ
Πολυακρυλαμιδίου
για τον διαχωρισμό
Πρωτεϊνών



- Έχει σφικτό σταθερό ικρίωμα
- Ιδανικό για διαχωρισμό πρωτεϊνών
- Μικρότερο μέγεθος πόρου σε σχέση με την αγαρόζη
- Οι πρωτεΐνες είναι αρκετά μικρότερες από το DNA
 - Μέσο βάρος αμινοξέως = 110 daltons
 - Μέσο βάρος ζεύγους νουκλεοτιδίου = 649 daltons
 - 1 kilobase of DNA = 650 kD
 - 1 kilobase of DNA encodes 333 amino acids = 36 kD

Ρυθμιστικά διαλύματα

Μεταφορά ηλεκτρικού ρεύματος

Διατήρηση σταθερού PH

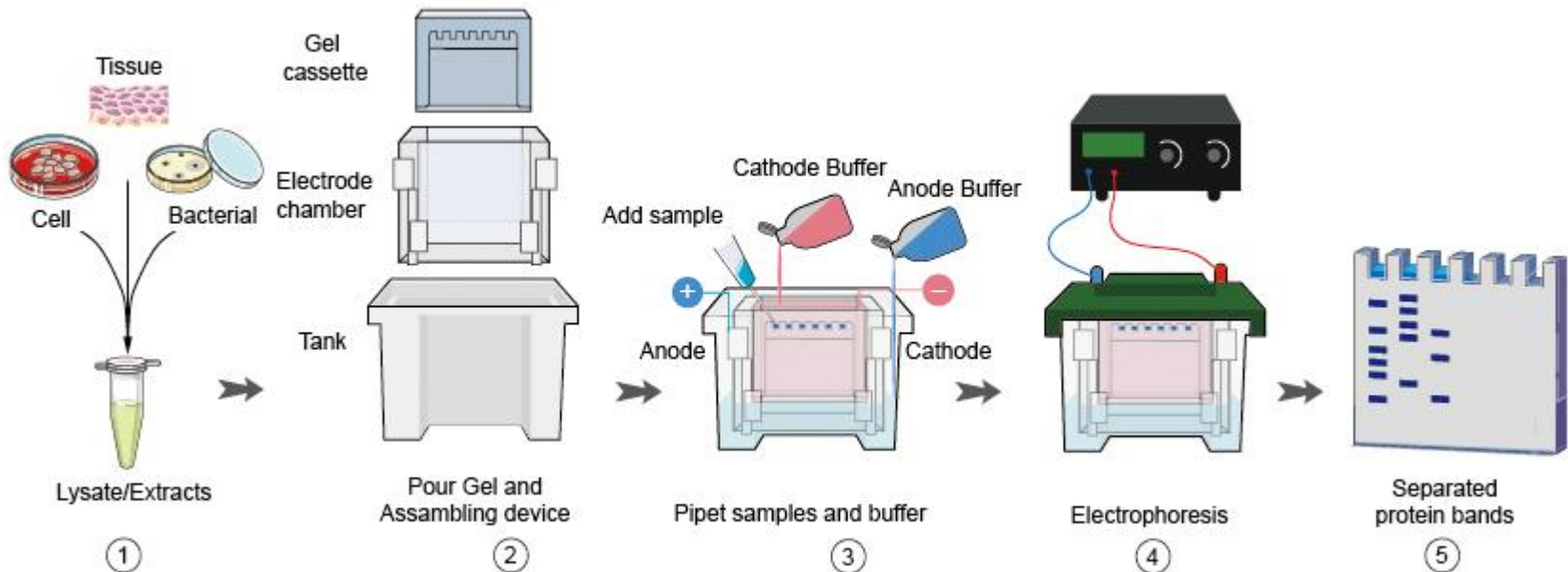
Συνήθως Διάλυμα Tris (2-hydroxymethyl-2methyl-1,3-propanediol)

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ή διάλυμα ηλεκτροδίων (Running buffer), 1 λίτρο

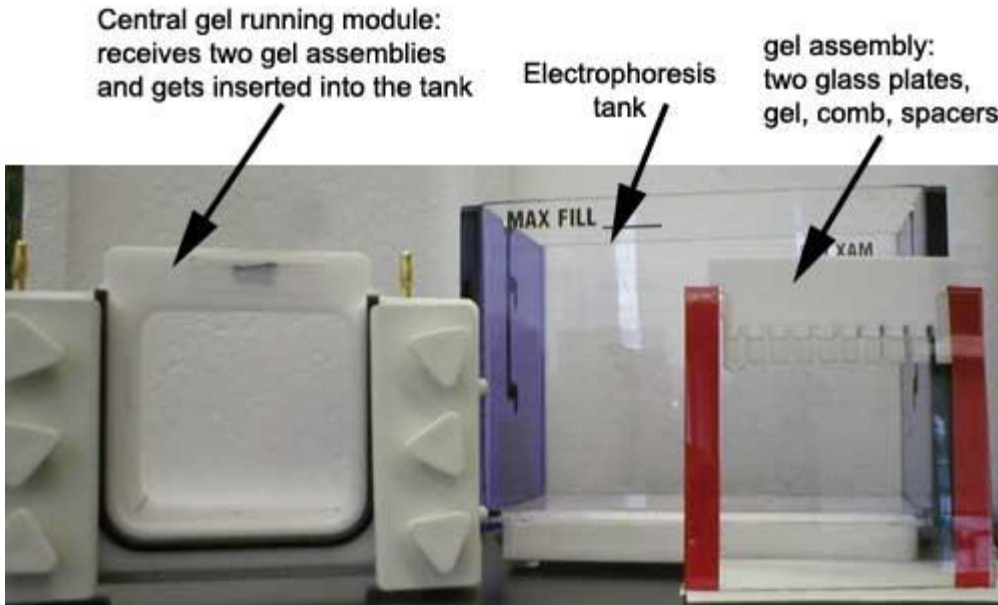
3 g Tris (25 mM)

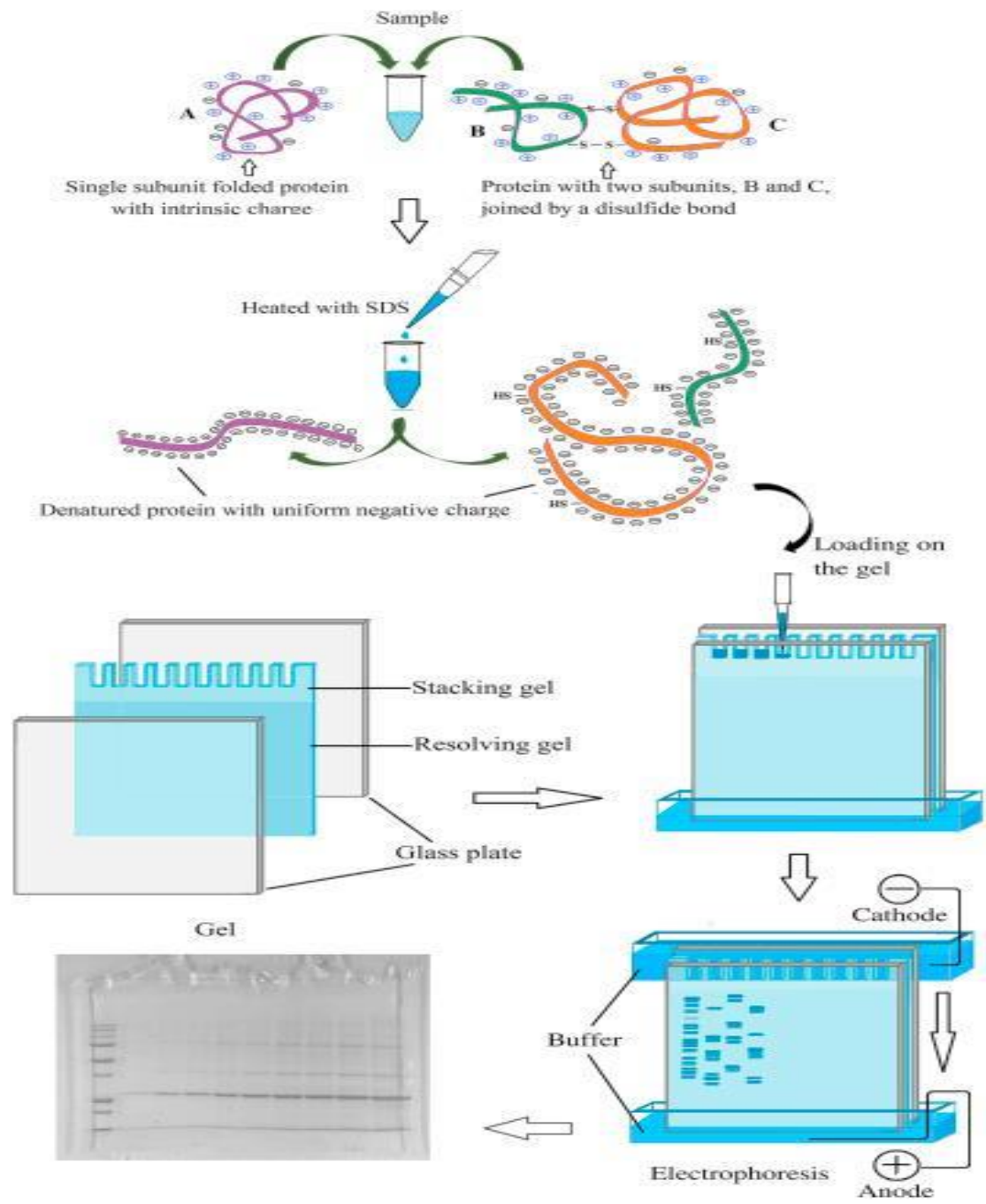
14,4 g γλυκίνης (192 mM)

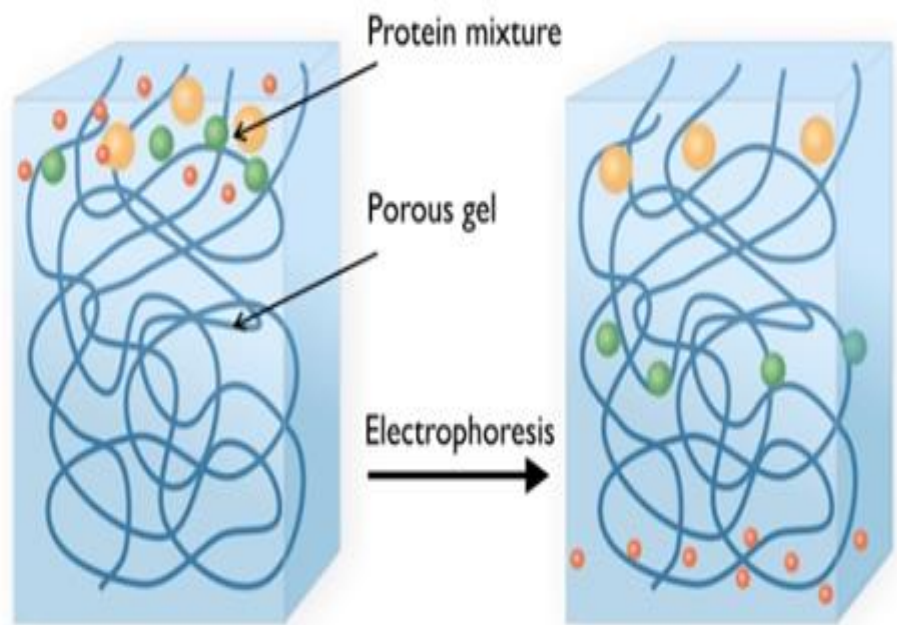
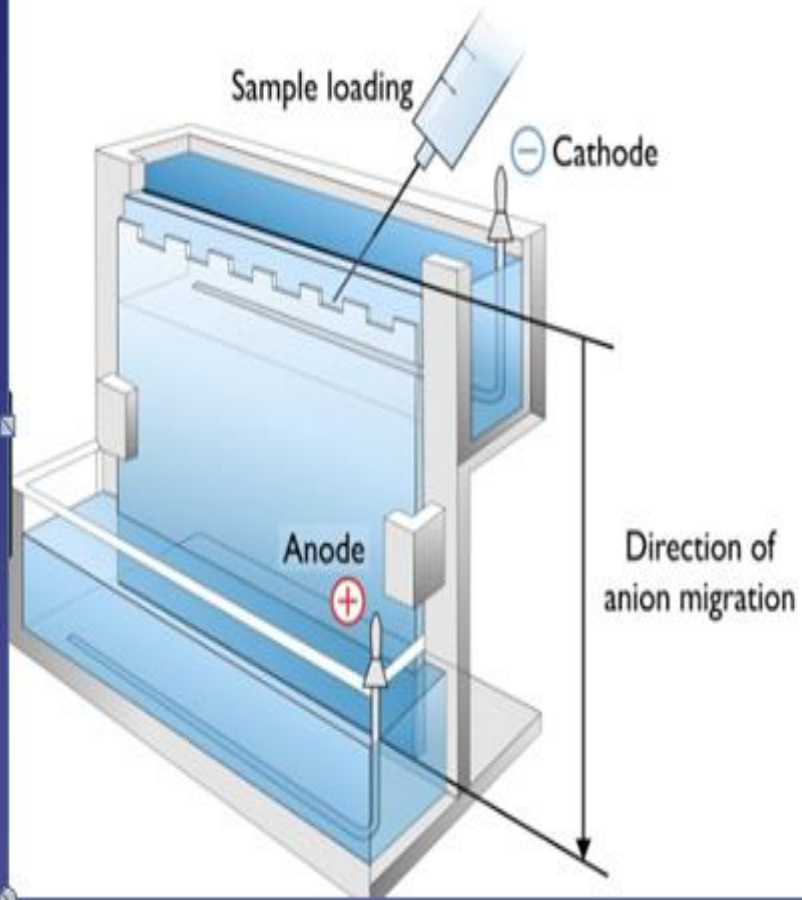
1 g SDS (0.1%)



Η τοποθέτηση των δειγμάτων γίνεται στις ειδικές θέσεις «πηγάδια» που δημιουργούνται στο πήκτωμα με την τοποθέτηση πλαστικής «χτένας» όταν το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό.







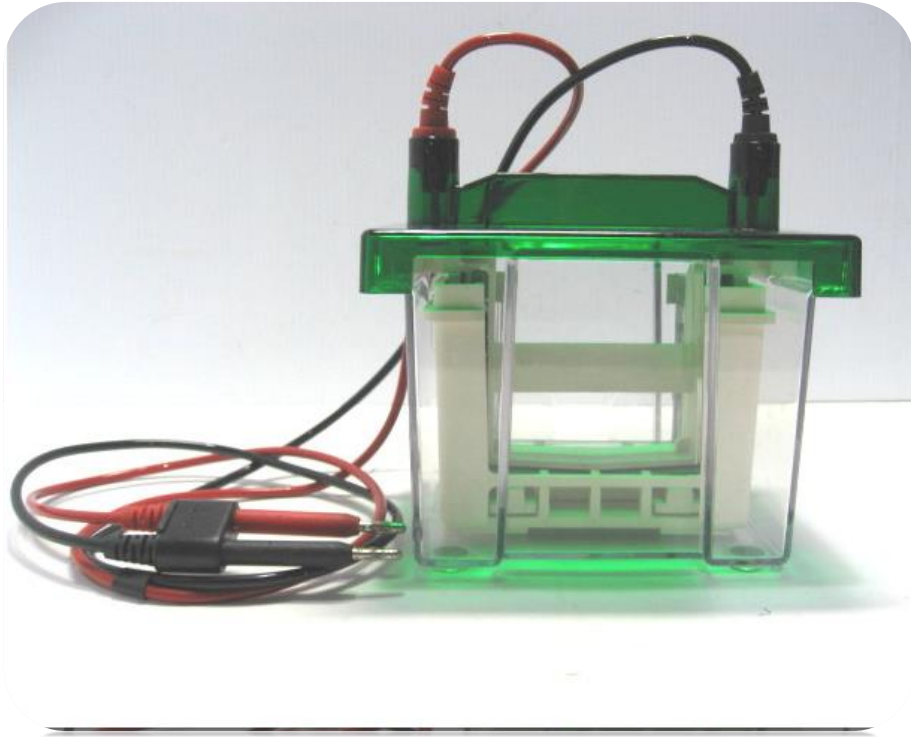
ΤΖΕΛ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ



Τι χρειαζόμαστε

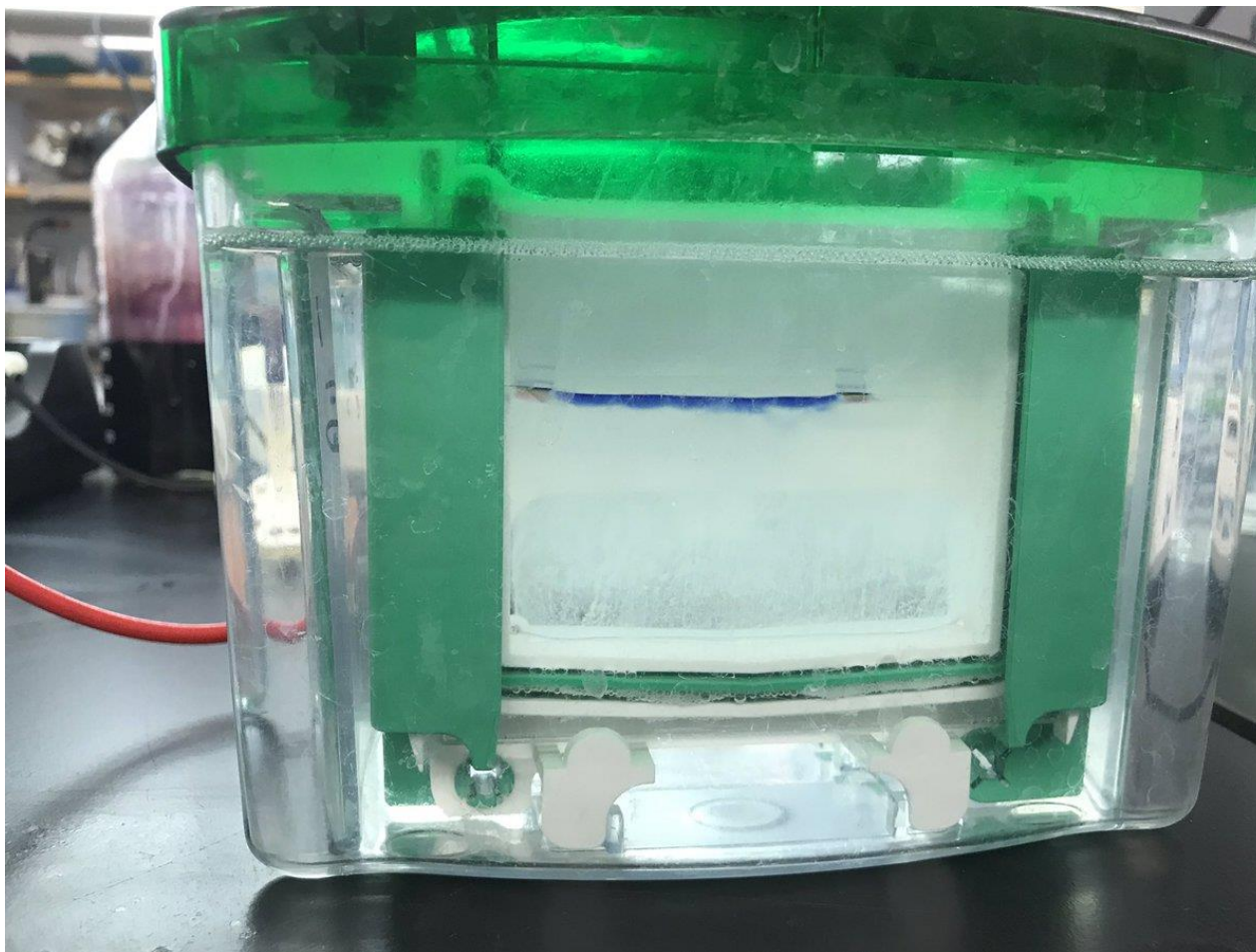
1. **Συσκευή Ηλεκτροφόρησης** (πηγή ρεύματος, λεκάνη με 2 δεξαμενές, ταινία Η/Φ)
2. **Ρυθμιστικά διαλύματα:** μεταφορά ηλεκτρικού ρεύματος και διατήρηση σταθερού ΡΗ
3. **Υποστηρικτικά μέσα** (ταινίες οξικής κυτταρίνης, αγαρόζη, **πήκτωμα ακρυλαμιδίου**)
4. **Χρωστικές:** μετά το πέρας της Η/Φ γίνονται ορατές οι ζώνες χάρη στα σύμπλοκα χρωστικών και πρωτεϊνών (χρώση Ponceau, Amido Black, **Coomassie Brilliant Blue R250**, χρώση αργύρου-χρυσού)

ΣΥΣΚΕΥΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

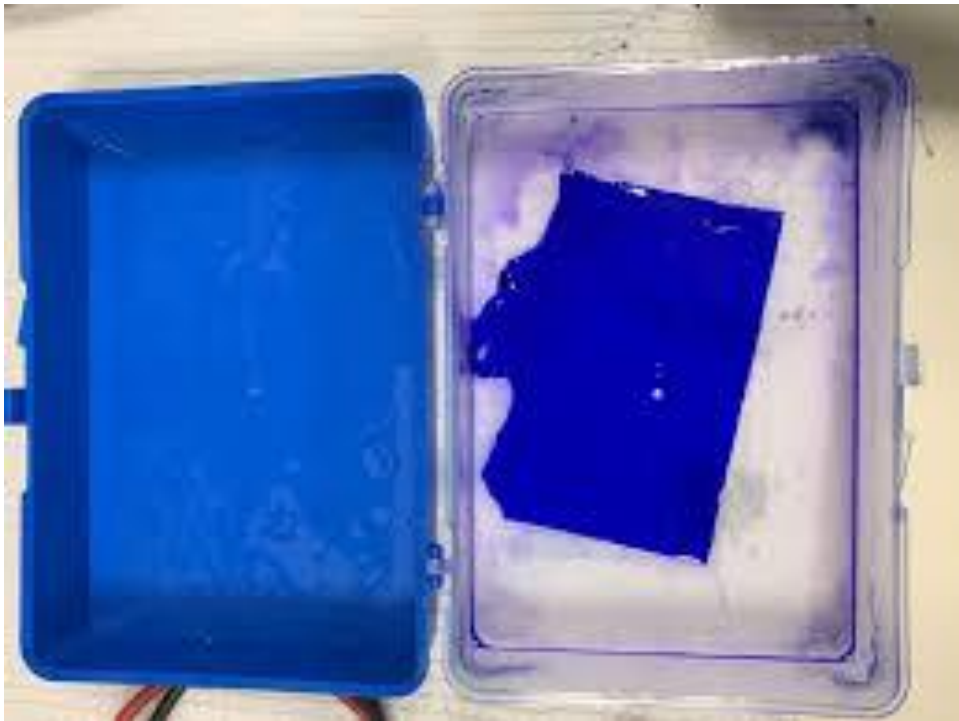


ΤΡΟΦΟΔΟΤΙΚΟ ΡΕΥΜΑΤΟΣ

ΜΕΤΩΠΟ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

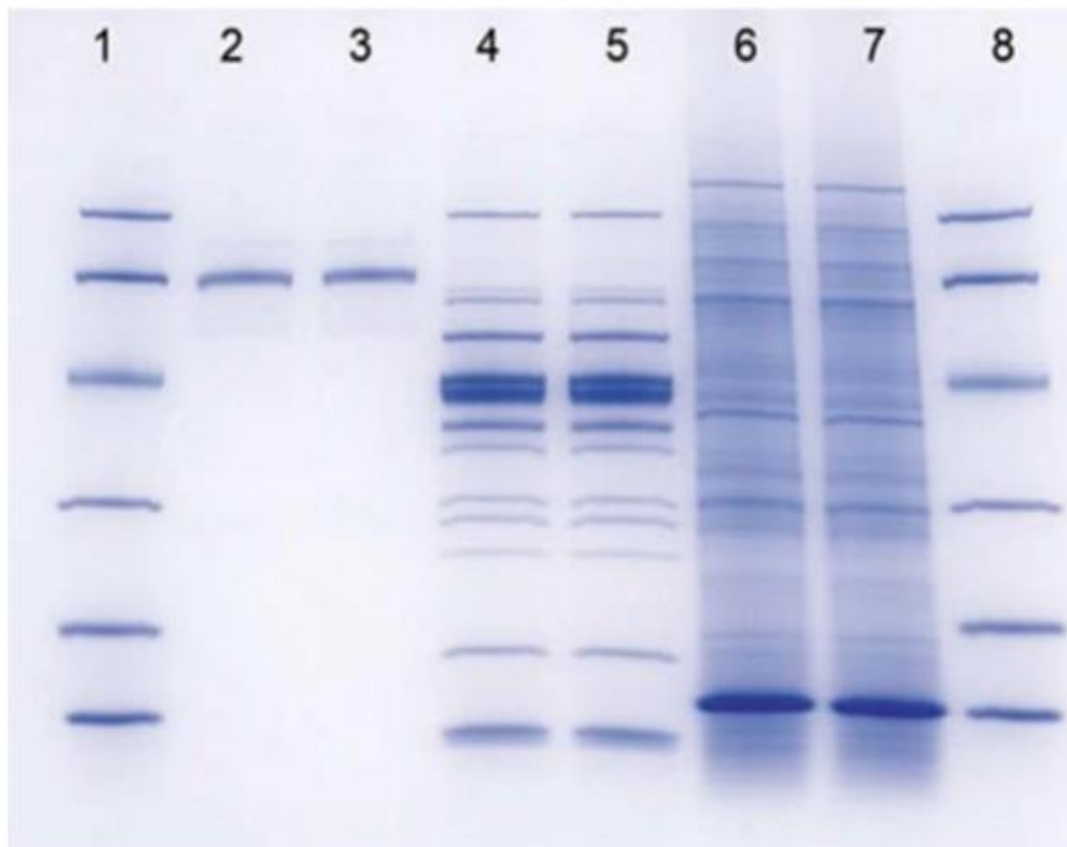


ΧΡΩΣΗ – ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ



Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΜΑ



ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Το φορτίο μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από το pH

Ισοηλεκτρικό Σημείο (pI) μιας πρωτεΐνης είναι το pH στο οποίο το ολικό φορτίο της είναι μηδέν. **Δεν μετακινείται σε ηλεκτρικό πεδίο.**

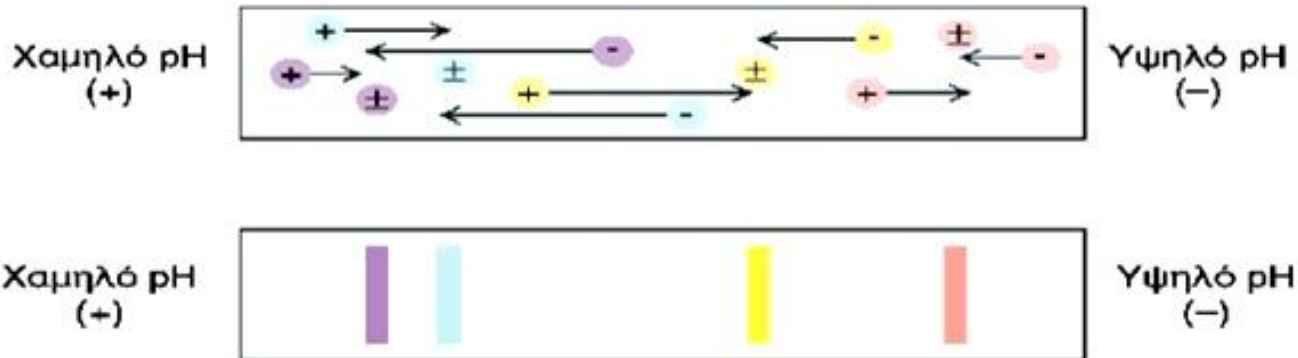
Αν $pH > pI$ η πρωτεΐνη είναι ανιόν (-) κινείται προς την άνοδο σε ηλεκτρικό πεδίο.

Αν $pH < pI$ η πρωτεΐνη είναι κατιόν (+) κινείται προς την κάθοδο.

ΠΙΝΑΚΑΣ : Ισοηλεκτρικά σημεία ορισμένων πρωτεϊνών

• Πρωτεΐνη	pI	Πρωτεΐνη	pI
• Πεψίνη	1.0	Μυοσφαιρίνη	7.0
• Λευκωματίνη	4.8	Αιμοσφαιρίνη	7.07
• Ινσουλίνη	5.35	Ριβονουκλεάση	7.8
• γ-σφαιρίνες	6.4-7.2	Κυτόχρωμα c	10.6

Ισοηλεκτρικός Εστιασμός



Δημιουργία στην πηκτή μιας βαθμίδωσης pH ηλεκτροφορώντας ένα μίγμα ηλεκτρολυτών

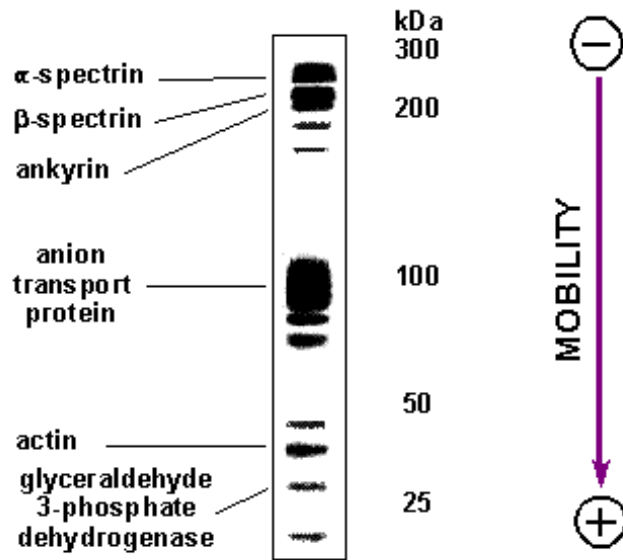
Μετά την τοποθέτηση του δείγματος των πρωτεϊνών, το ηλεκτρικό ρεύμα θα οδηγήσει τις πρωτεΐνες στο ισοηλεκτρικό τους σημείο

Οι πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλα πειράματα αν κόψουμε τις αντίστοιχες ζώνες

ΔΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών με βάση το ηλεκτρικό τους φορτίο και την ταχύτητα μετακίνησης σε ηλεκτρικό πεδίο

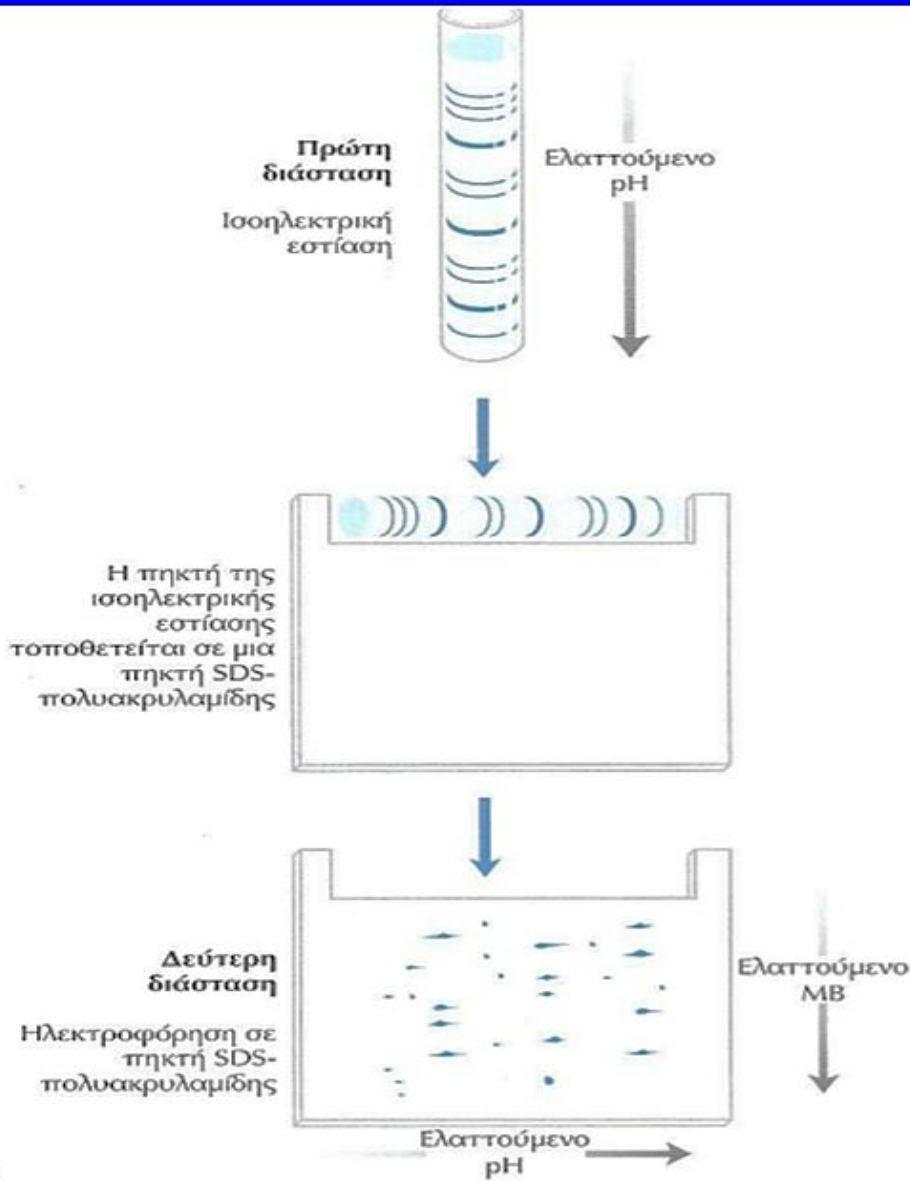
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS- πολυακρυλαμιδίου



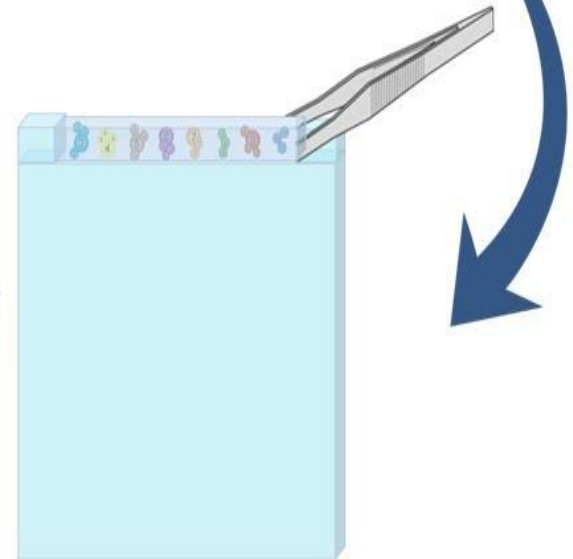
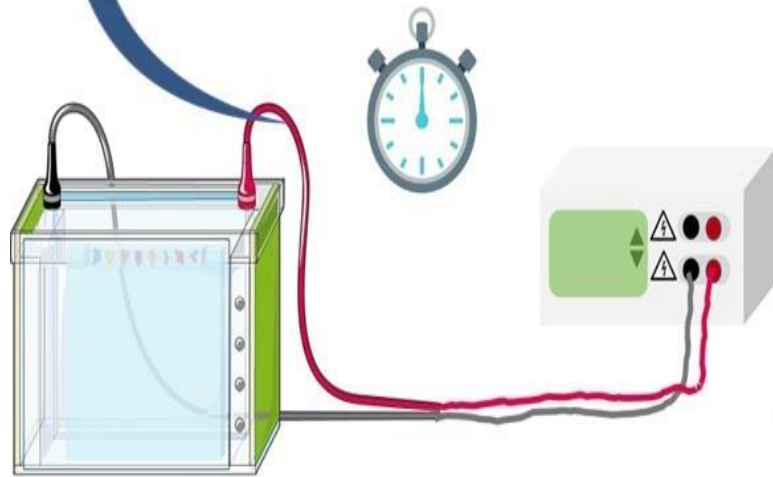
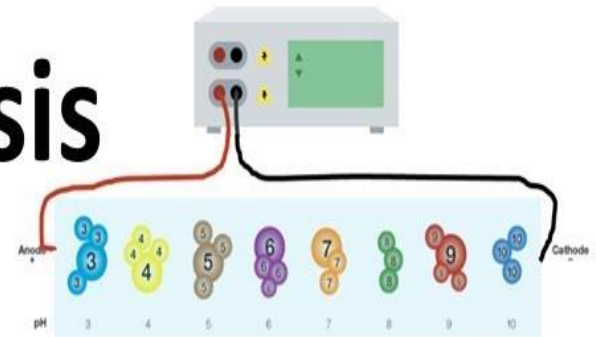
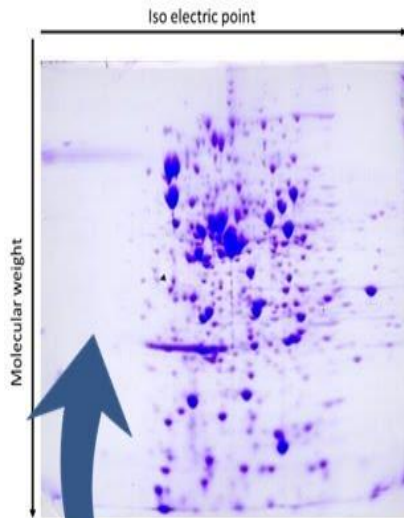
- Ο Ισοηλεκτρικός Εστιασμός διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο
- Η Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση τις μάζες τους

Ανάλυση πρωτεϊνών της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων

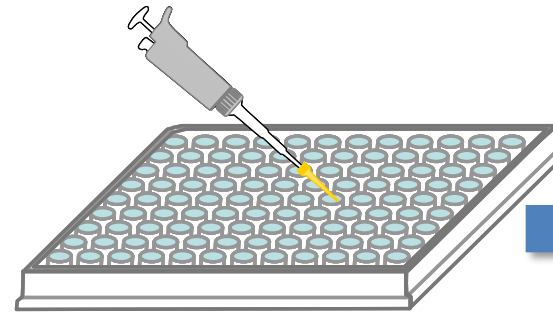
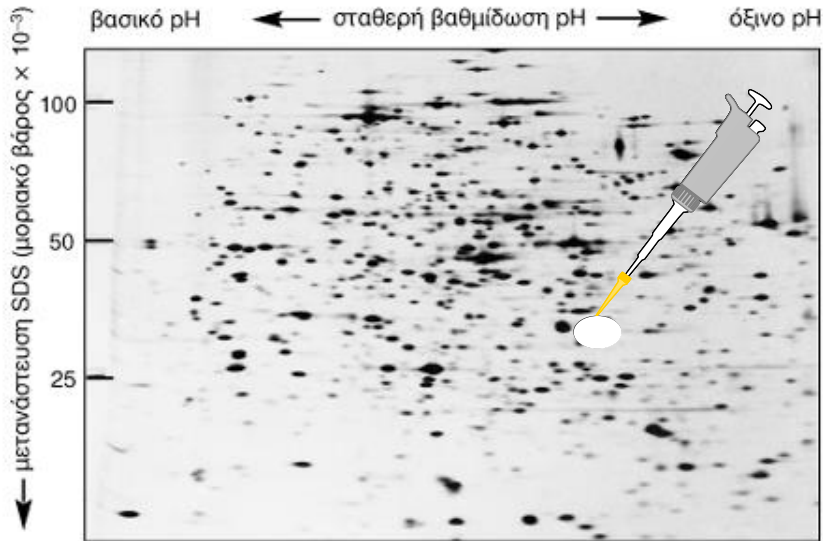
ΔΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ



2D gel electrophoresis



Αναγνώριση πρωτεϊνών



Απομόνωση πρωτεϊνικών κηλίδων



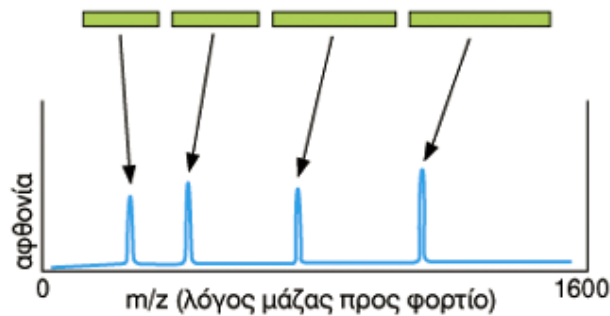
Πέψη με θρυψίνη
παραγωγή πεπτιδίων



MALDI-TOF

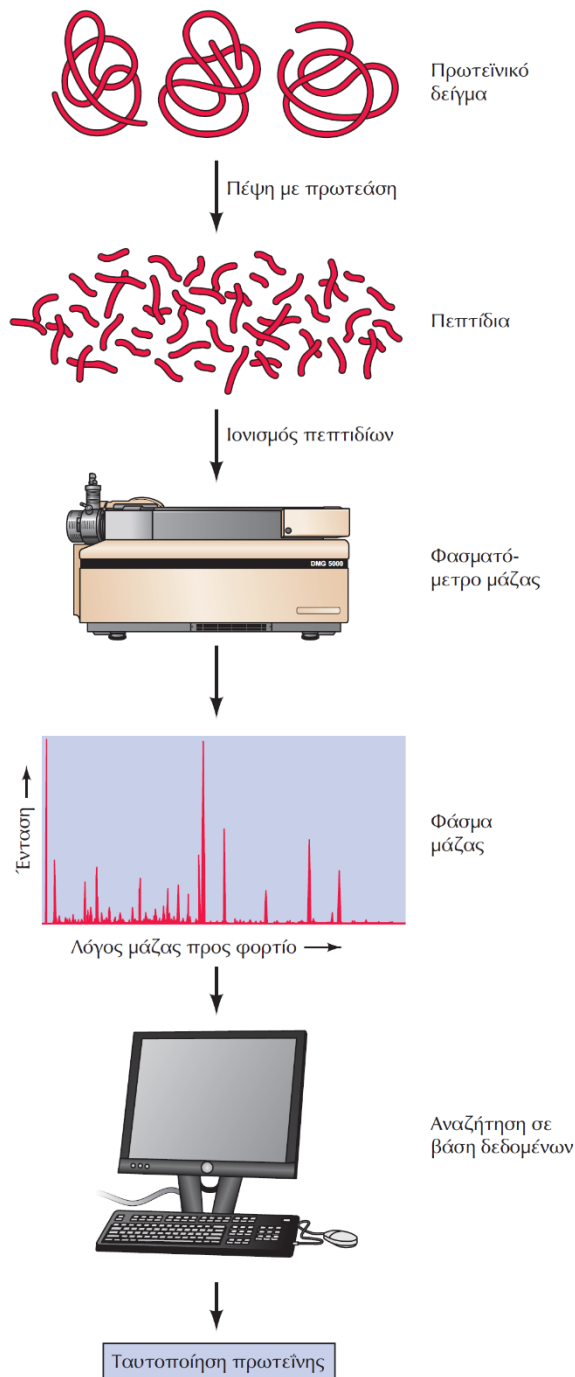


Φασματοσκοπία μάζας



Αναγνώριση Πρωτεϊνών





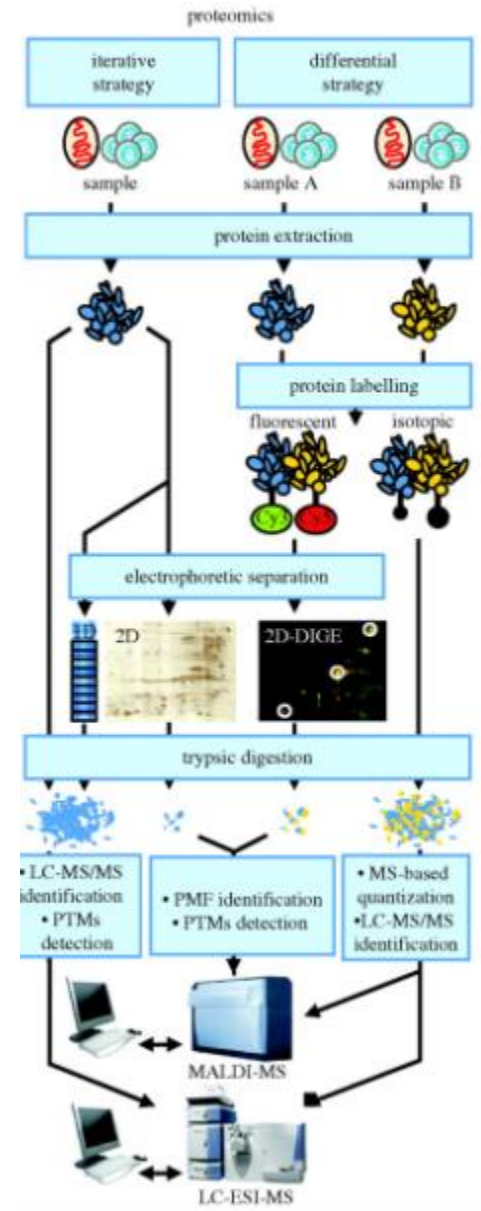
Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας

- Το πρωτεϊνικό δείγμα (για παράδειγμα, μια κηλίδα που αποκόπηκε από πήκτωμα ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων) υφίσταται πέψη με μια πρωτεάση η οποία διασπά την πρωτεΐνη σε μικρότερα πεπτιδία.
- Τα πεπτιδία ακολούθως ιονίζονται και αναλύονται σε ένα φασματόμετρο μάζας, το οποίο μετρά τον λόγο μάζας προς φορτίο για κάθε πεπτιδίο.
- Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται σε ένα **φάσμα μαζών**, το οποίο συγκρίνεται με θεωρητικά φάσματα μάζας αποθηκευμένα σε μια βάση δεδομένων.
- Αυτά τα θεωρητικά φάσματα αντιστοιχούν στα πεπτιδία που θα προέκυπταν μετά από κατεργασία με τρυψίνη όλων των γνωστών πρωτεϊνών.
- Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση μιας **άγνωστης πρωτεΐνης**.

ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ

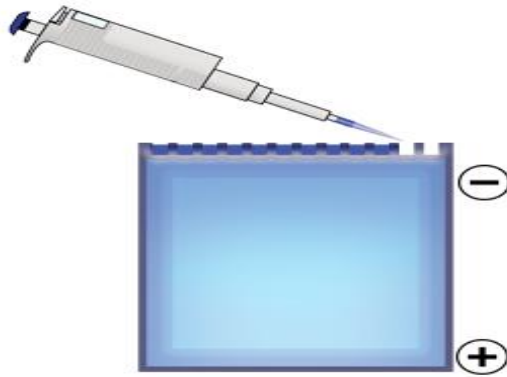


ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ ΜΑΖΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (MALDI)
Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

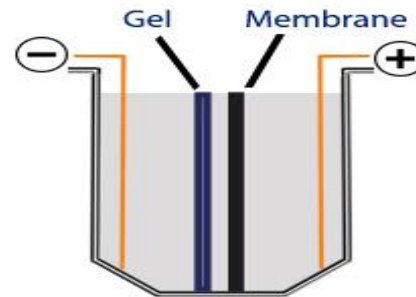


Τεχνική Western Blotting

Τεχνική υβριδοποίησης που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παρουσίας μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης μέσα σε ένα δείγμα. Χρησιμοποιεί SDS-PAGE για να διαχωρίσει τις πρωτεΐνες με βάση το μέγεθος και τη δέσμευσή τους με πρωτογενή αντισώματα, τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν από δευτερογενή αντισώματα κατά την ανάπτυξη χρώματος



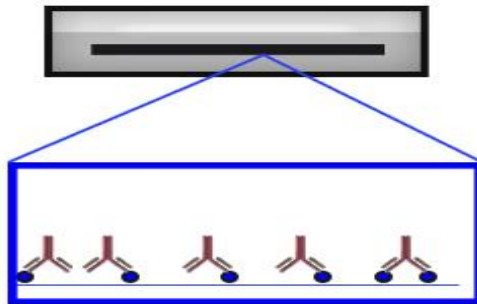
1. Load and separate protein samples on SDS-PAGE gel.



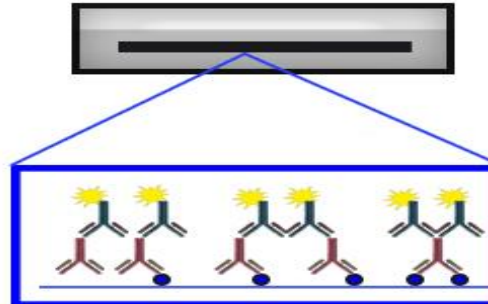
2. Electrophoretically transfer fractionated proteins onto PVDF or nitrocellulose membrane.



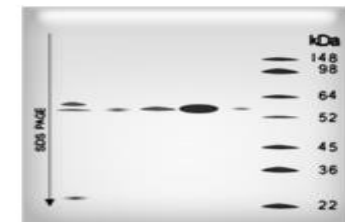
3. Block the membrane with neutral protein (BSA or milk).



4. Incubate the membrane with primary antibody specific to target protein. Wash.



5. Incubate the membrane with HRP-labeled secondary antibody specific to primary antibody. Wash.



6. Incubate the blot with chemiluminescent HRP substrate and expose to film.

Τεχνική Western Blotting

- **SDS-PAGE** - Το δείγμα πρωτεΐνης διαχωρίζεται με βάση το μέγεθος τους με SDS-PAGE.
- **Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη** - Οι πρωτεϊνικές κλασματικές πρωτεΐνες μεταφέρονται είτε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης είτε πολυφινυλιδενίου (PVDF). Οι τεχνικές που εμπλέκονται σε αυτή τη μεταφορά είναι μεταφορά διάχυσης.
- **Αποκλεισμός μη συγκεκριμένων ιστότοπων** - Οι μη κατειλημμένες θέσεις στη μεμβράνη αποκλείονται για να αποτραπεί η μη ειδική δέσμευση πρωτεϊνών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μη λιπαρό ξηρό γάλα ή αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) για το σκοπό αυτό.
- **Επώαση πρωτογενών αντισωμάτων** - Η δεσμευμένη μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα πρωτεύοντος αντισώματος. Αυτά τα πρωταρχικά αντισώματα συνδέονται με μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη στη μεμβράνη.
- **Επώαση δευτερογενούς αντισώματος** - Η μεμβράνη επωάζεται με δευτερογενή αντισώματα, τα οποία δεσμεύονται με τα πρωτεύοντα αντισώματα. Τα δευτερεύοντα αντισώματα συζεύγνυνται με τις πρωτεΐνες αναφοράς. Αυτές οι πρωτεΐνες αναφοράς μπορούν να είναι βιοτίνη, αλκαλική φωσφατάση ή υπεροξειδάση άγριου ραπανιού.
- **Ανίχνευση πρωτεϊνών με ανάπτυξη χρώματος** - Τα συζευγμένα ενζυμικά μόρια αντιδρούν με το υπόστρωμα τους για να δημιουργήσουν ένα προϊόν είτε με ραδιοϊσότοπο, ένζυμοανολογικά ή χημειοφωταύγεια.

ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατηγορία βιοχημικών μεθόδων που συνδυάζουν τεχνολογίες χημείας και ανοσολογίας.

- Απλές
- Γρήγορες
- Δυνατότητα ταυτόχρονης μελέτης μεγάλου αριθμού δειγμάτων

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- 1) Κλινική έρευνα (κατανόηση του φυσιολογικού και παθολογικού ρόλου βιολογικά δραστικών ουσιών, κατανόηση ασθενειών, ανάπτυξη νέων διαγνωστικών εργαλείων)
- 2) Διάγνωση ασθενειών, βιοχημικές αναλύσεις αίματος και ούρων (ορμονικές, βιοχημικών δεικτών κ.α.)
- 3) Φαρμακευτική βιομηχανία (ανακάλυψη και ανάπτυξη φαρμάκων, μελέτες μεταβολισμού και τοξικολογικές μελέτες)

ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ (IMMUNOASSAYS)

Οι ανοσοχημικές τεχνικές ανάλυσης βασίζονται στην επιλεκτική αντίδραση ενός αναλύτη : αντιγόνο (Ag) με το αντίσωμα (Ab), για να δώσει ένα προϊόν (Ag-Ab) το οποίο μπορεί να μετρηθεί.

Η αντίδραση δέσμευσης γίνεται αντιληπτή με τη χρήση **ιχνηθέτη** (φθορίζουσα ή φωσφορίζουσα ένωση, ραδιενεργός ένωση, ή ένζυμο που καταλύει κάποια αντίδραση, η οποία παράγει ακτινοβολία ή φωταύγεια).

Ανοσοενζυμικές μέθοδοι: ανίχνευση συμπλόκου με ενζυμικές αντιδράσεις παραγωγής φωτός ή έγχρωμων ουσιών

Ραδιοανοσολογικές μέθοδοι : ανίχνευση συμπλόκου με μέτρηση της εκπεμπόμενης ραδιενέργειας

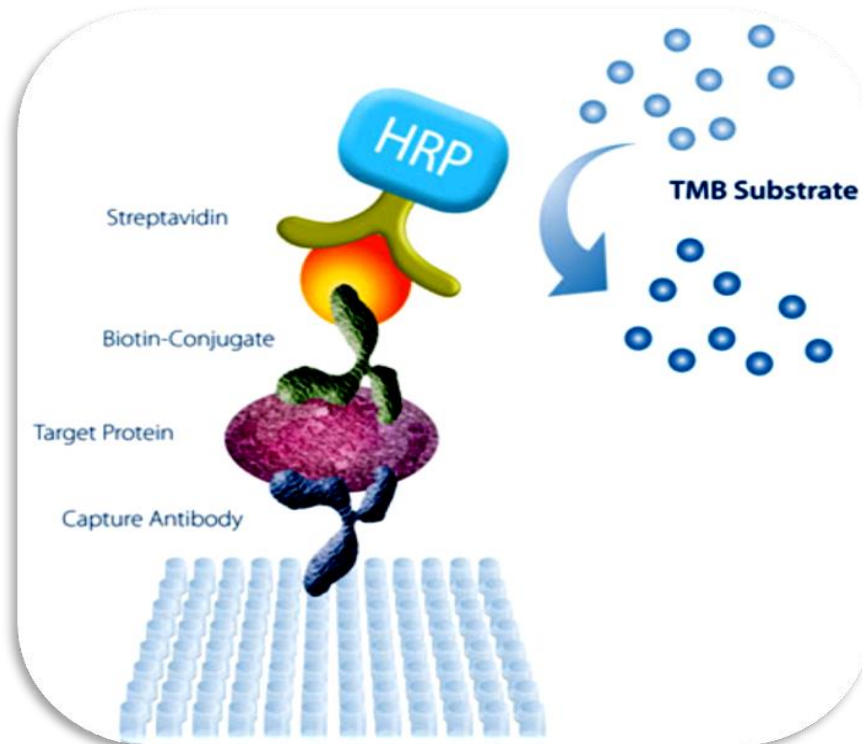
Ανοσοφθορισμομετρικές μέθοδοι : όταν ο ιχνηθέτης είναι φθορίζουσα ουσία

ELISA Τεχνική Ανοσο Ενζυμικής Ανάλυσης

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

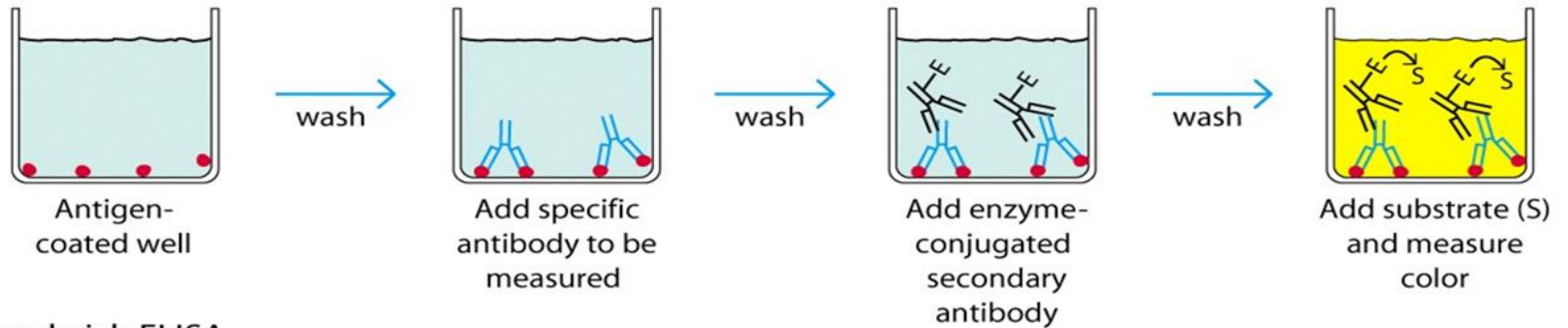
Δοκιμασία Ενζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης

1. Το αντιγόνο ενδιαφέροντος απορροφάται σε μια πλαστική επιφάνεια 'Sorbent'
2. Το αντιγόνο αναγνωρίζεται από ειδικό αντίσωμα 'Immuno'
3. Το αντίσωμα αναγνωρίζεται από ένα δεύτερο αντίσωμα 'Immuno', το οποίο είναι συζευγμένο με ένζυμο 'Enzyme Linked'
4. Το υπόστρωμα αντιδρά με το ένζυμο και παράγει έγχρωμο προϊόν

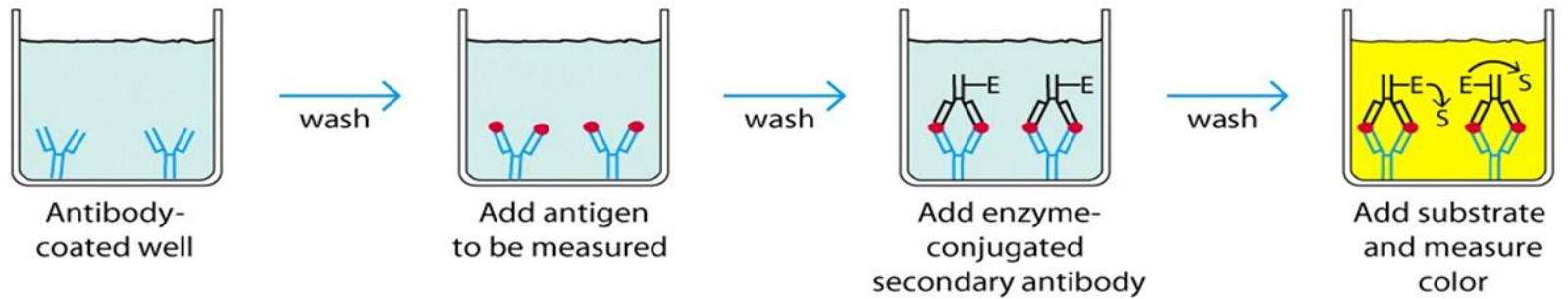


ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ELISA

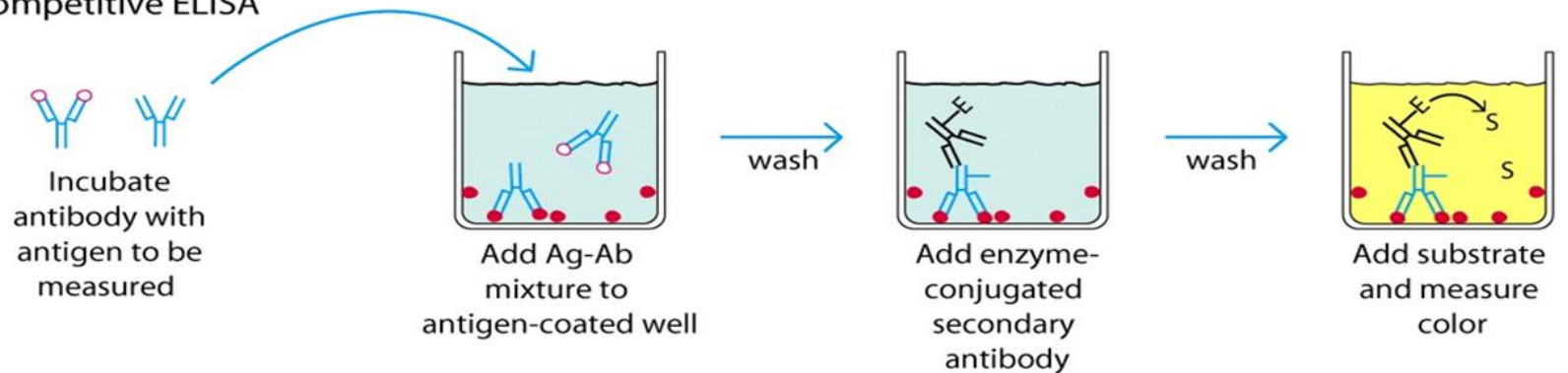
(a) Indirect ELISA



(b) Sandwich ELISA



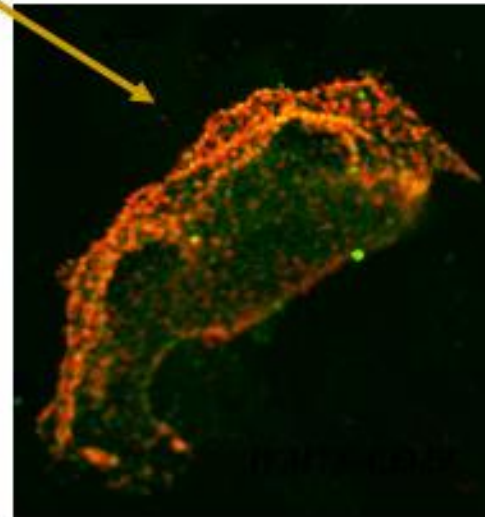
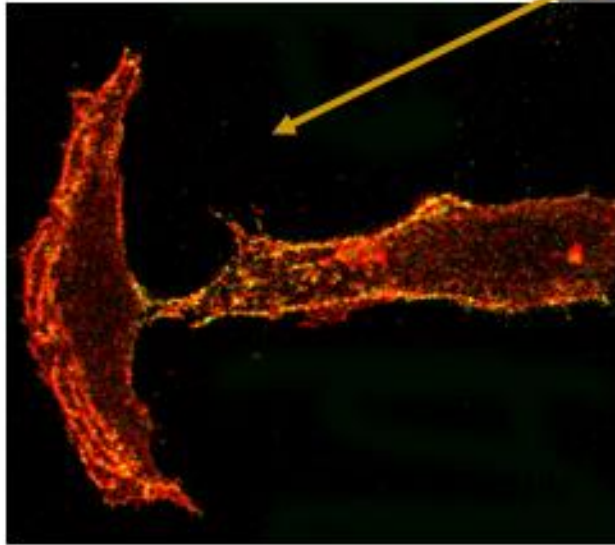
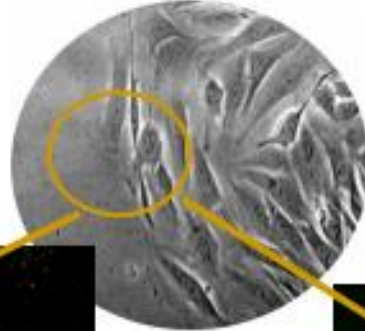
(c) Competitive ELISA



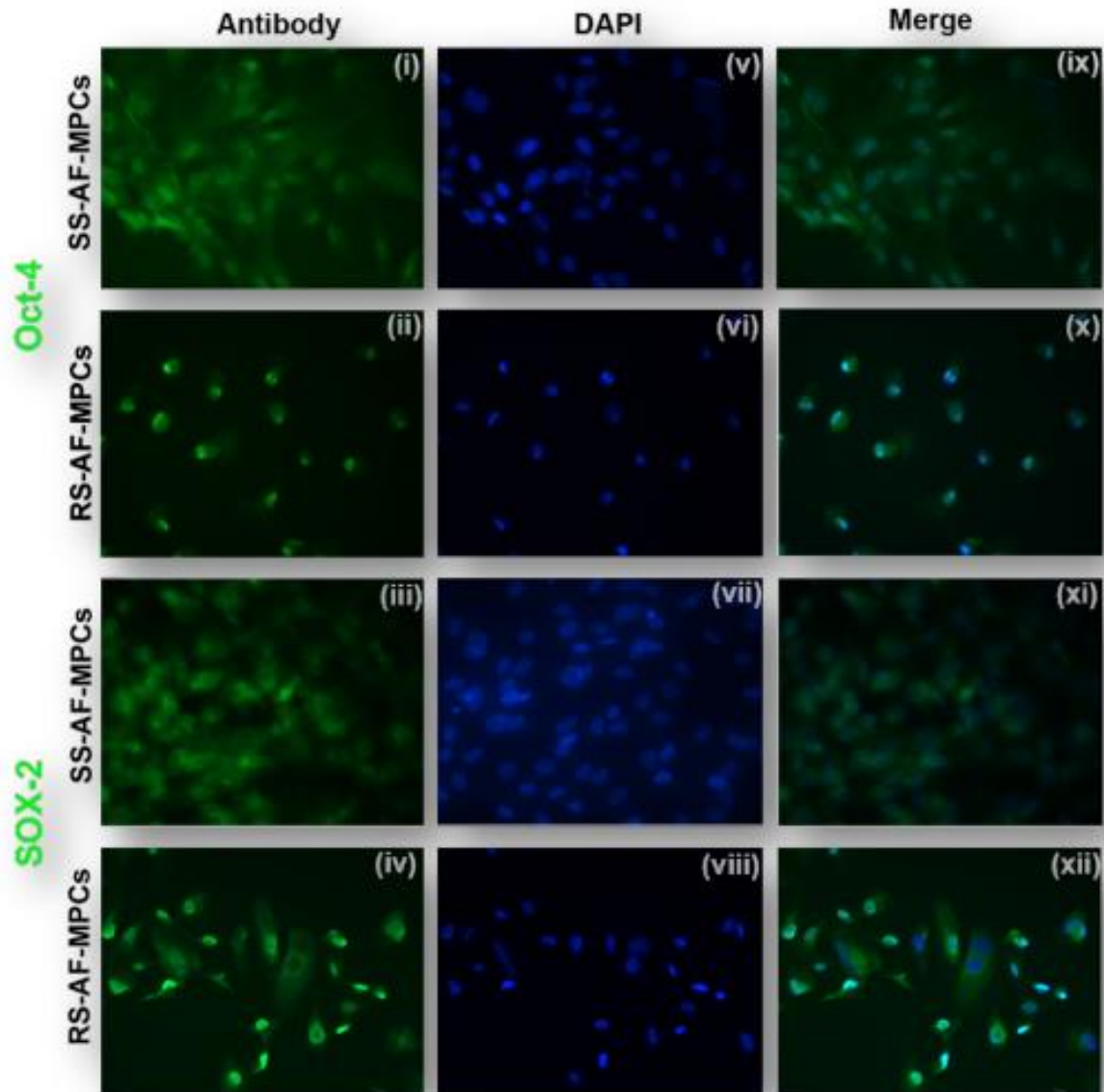
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ELISA

	ELISA	Έφαρμoγή
I	Παρακολούθηση έξαρσης ασθενειών	HIV, SARS, smallpox & anthrax
II	Ανίχνευση αντιγόνων	Pregnancy, drugs, GMO, BSE (and all the above)
III	Ανίχνευση αντισωμάτων	HIV, Lyme disease, smallpox and West Nile virus

Antibodies - Biomarkers



Antibodies- Biomarkers



ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

• Το κύριο χαρακτηριστικό μιας πρωτεΐνης είναι η ικανότητά της να υιοθετεί το σωστό σχήμα για την εκτέλεση μιας συγκεκριμένης λειτουργίας.



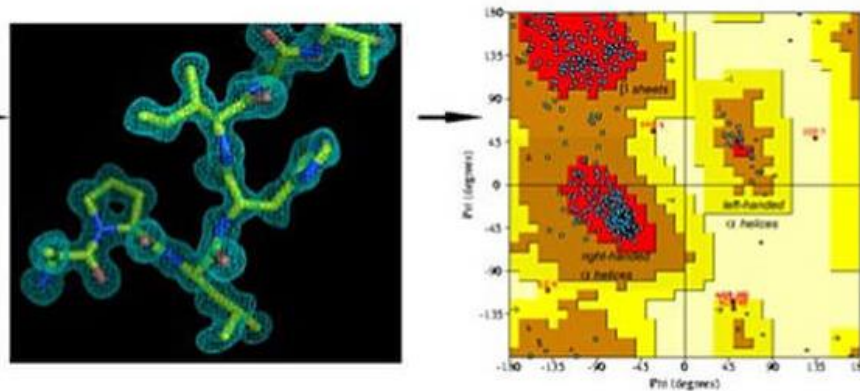
- Η αναγνώριση του σχήματος (δομής) της πρωτεΐνης είναι ένα κλειδί για την κατανόηση της βιολογικής της λειτουργίας και του ρόλου της στην υγεία και τις ασθένειες
- Οι αμινοξικές αλληλουχίες μπορούν να διπλωθούν με διάφορους τρόπους
- Μόνο μία από αυτές επιτρέπει σε μια πρωτεΐνη να λειτουργεί σωστά

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΔΟΜΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

- Η πρωτοταγής αμινοξική αλληλουχία είναι καθοριστική για τον προσδιορισμό της τελικής της δομής και δεν αλλάζει
- Οι πρωτεΐνες μπορούν να αλλάξουν το σχήμα και τη λειτουργία τους ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες βρίσκονται

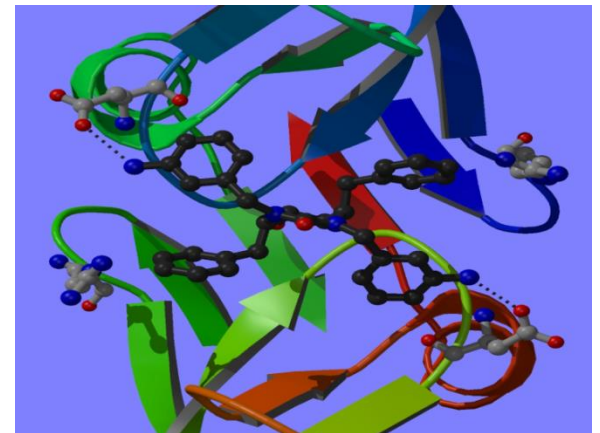
Η λειτουργικότητα ενός μορίου και η αλληλεπίδρασή του με τα γειτονικά μόρια δεν είναι δυνατόν να κατανοηθούν μόνο από τη χημική τους σύσταση, αλλά εξαρτώνται από την στερεοδιάταξή τους (τρισδιάστατη δομή)



ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ : Τρισδιάστατη δομή -> Πληροφορία θέσης μορίων στο χώρο σε **Ατομική Διακρίτικότητα**.

ΤΙ ΜΑΣ ΠΡΟΣΦΕΡΕΙ Η ΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

- Δεδομένα για τη λειτουργία, αλληλεπίδραση των βιομορίων
- Δεδομένα για την διαλεύκανση του πρωτεϊνικού διπλώματος
- Δεδομένα για την προέλευση και την εξέλιξη των οργανισμών
- Κατανόηση των αιτίων εκδήλωσης διαφόρων ασθενειών
- Δεδομένα για τον σχεδιασμό φαρμάκων
- Προγνώσεις για το πως οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν σε μεγάλα λειτουργικά δίκτυα
- Σχεδιασμός πρωτεϊνών με νέες ιδιότητες (Protein engineering)

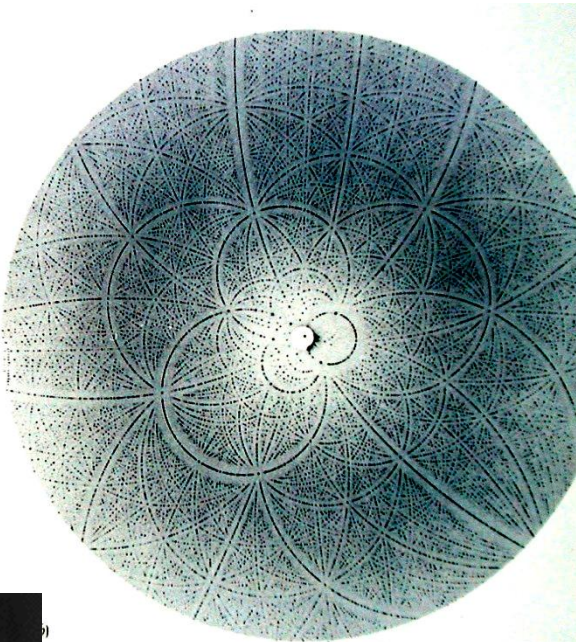


HIV protease – Drug design

Βραβείο Nobel στη Χημεία, 1962
Οι Max Perutz και Sir John Kowdery Kendrew
έλυσαν την δομή της μυογλοβίνης του φουσητήρα
(1957).



(a)

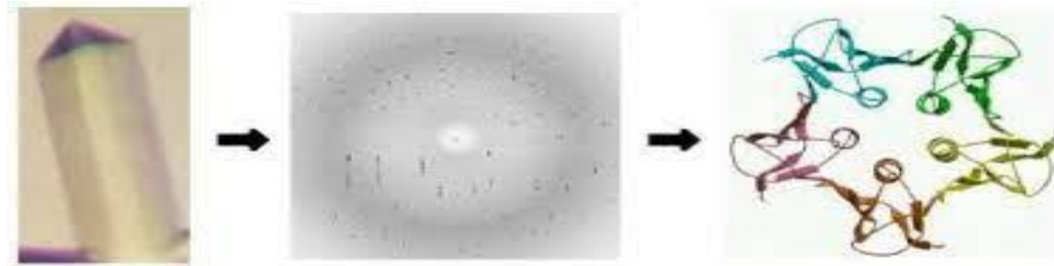


John Kendrew with the model of myoglobin. at low resolution. The heme group is the gray disk in the photo.



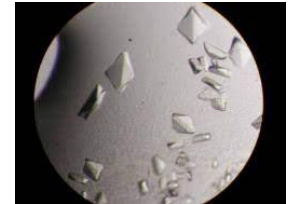
Max Perutz

Η σχέση μεταξύ ακολουθίας και δομής είναι πολύ περίπλοκη



1. Πειραματικοί μέθοδοι (Η καλύτερη προσέγγιση)

- [X-rays crystallography](#) – σταθερή δομή, κρύσταλλοι πρωτεϊνών
- [NMR](#) – σταθερή δομή – όχι για μεγάλες πρωτεΐνες

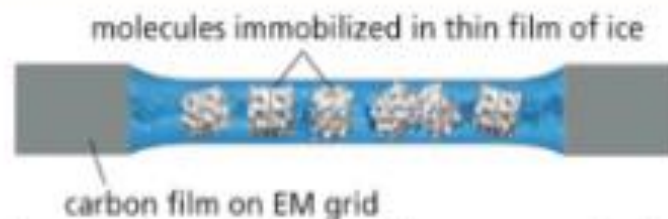


2. In-silico methods (επιμέρους λύσεις - Βασισμένη στην ομοιότητα)

- [Sequence or profile alignment](#) – σύγκριση ακολουθιών – συνήθως περιορισμένη 3D πληροφορία
- [Threading](#) – απαιτείται 3D πληροφορία, συνδυαστική πολυπλοκότητα
- [Ab-initio](#) πρόβλεψη δομής - όχι πάντα επιτυχής

CRYO-ELECTRON MICROSCOPY

X-ray crystallography remains the first port of call when determining proteins' structures. However, large macromolecular machines are often hard to crystallize, as are many integral membrane proteins, and for dynamic proteins and assemblies it is hard to access different conformations through crystallography alone. To get around these problems, investigators are increasingly turning to **cryo-electron microscopy** (cryo-EM) to solve macromolecular structures.



In this technique, a droplet of the pure protein in water is placed on a small EM grid that is plunged into a vat of liquid ethane at -180°C . This freezes the proteins in a thin film of ice and the rapid freezing ensures that the surrounding water molecules have no time to form ice crystals, which would damage the protein's shape.

ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>

Log in



actin



Search

[Advanced](#) [Create alert](#) [Create RSS](#)

[User Guide](#)

Save


Email


Send to

Sort by:

Best match



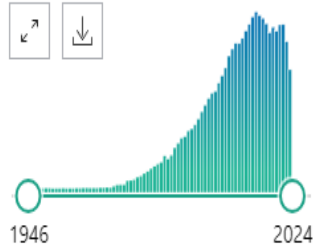
Display options 

MY NCBI FILTERS 

140,719 results

Page 1 of 14,072

RESULTS BY YEAR



TEXT AVAILABILITY

Abstract

Actin structure and function.

1 Dominguez R, Holmes KC.

Cite Annu Rev Biophys. 2011;40:169-86. doi: 10.1146/annurev-biophys-042910-155359.

PMID: 21314430 [Free PMC article.](#) [Review.](#)

Share

These properties, along with its ability to transition between monomeric (G-**actin**) and filamentous (F-**actin**) states under the control of nucleotide hydrolysis, ions, and a large number of **actin**-binding proteins, make **actin** a critical player in many cel ...

Actin and Actin-Binding Proteins.

2 Pollard TD.

Cite Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016 Aug 1;8(8):a018226. doi: 10.1101/cshperspect.a018226.

ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

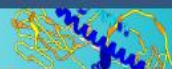
← → ↻ rcsb.org Ενημέρωση

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn About Documentation Careers COVID-19 MyPDB Contact us

RCSB PDB PROTEIN DATA BANK 211,377 Structures from the PDB 1,068,577 Computed Structure Models (CSM) 3D Structures Include CSM Help

Advanced Search | Browse Annotations

PDB-101 PDB EMDataResource NAKB WWPDB Foundation PDB-Dev f t y



New: More Computed Structure Models (CSM) available [Learn more](#)

- Welcome
- Deposit
- Search
- Visualize
- Analyze
- Download
- Learn

RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) enables breakthroughs in science and education by providing access and tools for exploration, visualization, and analysis of:

- Experimentally-determined 3D structures from the **Protein Data Bank (PDB)** archive
- Computed Structure Models (CSM)** from AlphaFold DB and ModelArchive

These data can be explored in context of external annotations providing a structural view of biology.

Explore NEW Features PDB-101 Training Resources

November Molecule of the Month

