

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΑΙ ΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ

ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ
Τμήμα Βιοχημείας κ Βιοτεχνολογίας



ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

ΒΑΣΕΙ

- ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ
- ΜΕΓΕΘΟΥΣ
- ΦΟΡΤΙΟΥ
- ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΜΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΜΟΡΙΑ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

(NMR,
ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ)



ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ



ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ
DNA



ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ



ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

ΠΡΩΤΕΟΜΑ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

ΠΡΩΤΕΟΜΑ

ΕΙΔΟΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ
ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΕΙΤΑΙ

ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ

- ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΥΠΟ
- ΤΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΣΤΑΔΙΟ
- ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΣΤΑΤΙΚΟ

ΕΙΝΑΙ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΟ ΑΠΟ ΤΟ
ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

ΛΟΓΩ
ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟΥ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ
ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗΣ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ
ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ
ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΩΝ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ

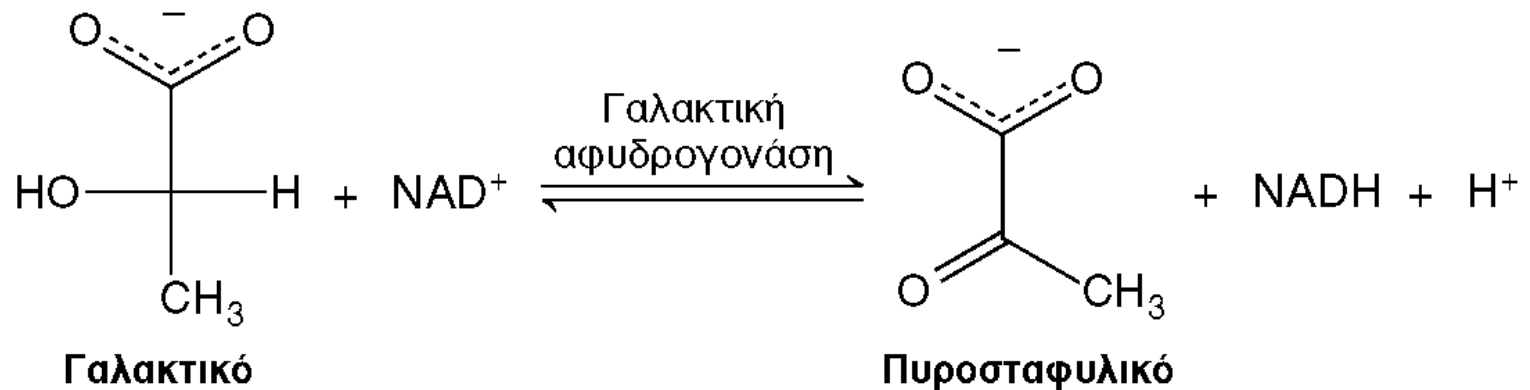
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΠΡΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ (ASSAY)

ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ **ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗ** ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΟΥ ΕΠΙΤΡΕΠΕΙ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΙΑΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

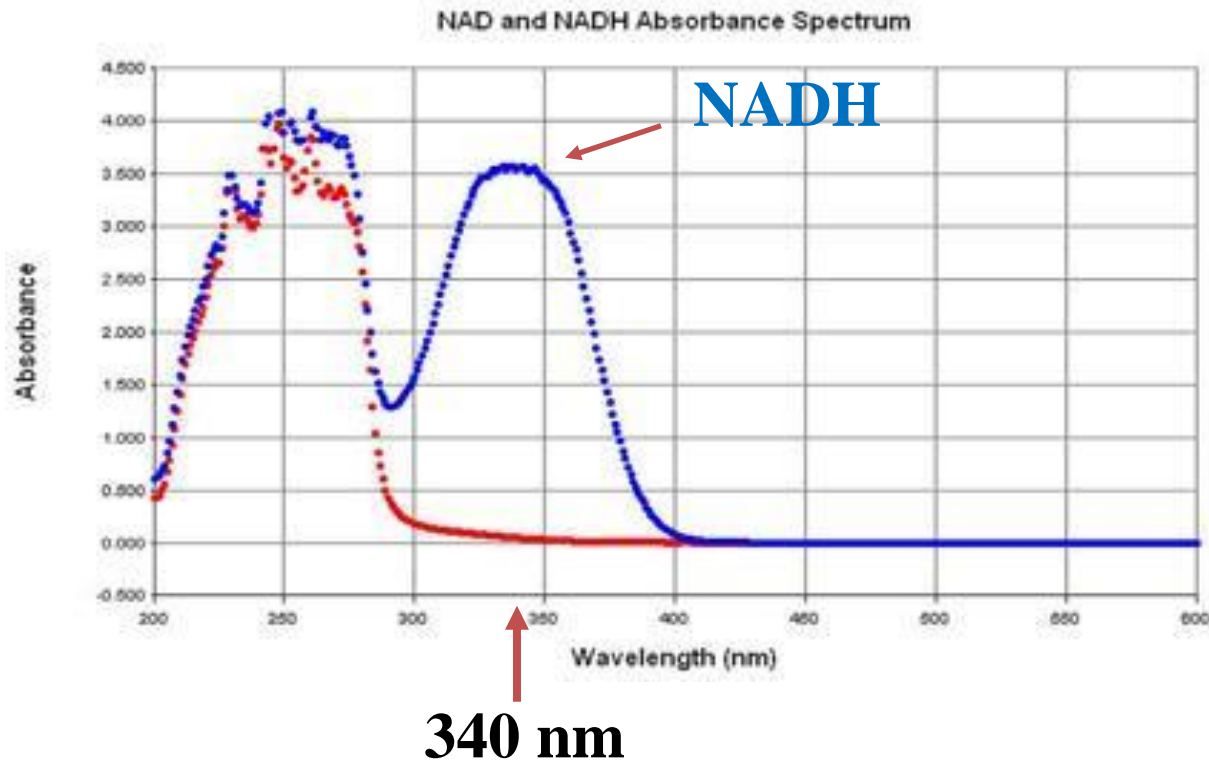
Π.Χ.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ



ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ NADH

Φάσμα απορρόφησης **NAD/NADH**



ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ – ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ: ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ ΣΤΗ ΜΟΝΑΔΑ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ: ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ/ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

ΑΥΞΗΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΘΩΣ ΠΡΟΧΩΡΑΜΕ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΜΙΑΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

ΣΤΑΔΙΑΚΟΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΠΡΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΧΡΗΣΗ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΤΩΝ
ΤΕΦΛΟΝ – ΓΥΑΛΙ, ΓΥΑΛΙ



ΜΕΘΟΔΟΙ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ

A



B



<http://www.lsu.edu>

ΜΕΘΟΔΟΙ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

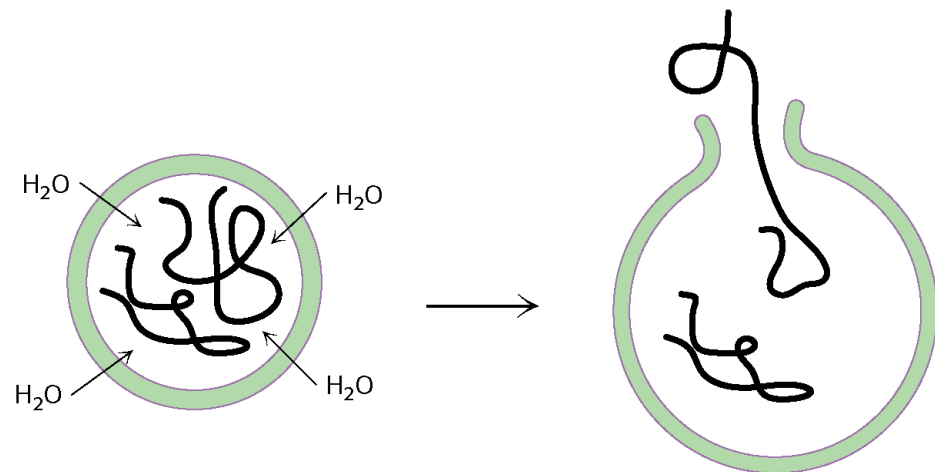
ΧΡΗΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

ΥΠΟΤΟΝΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

ΧΡΗΣΗ ΑΛΑΤΟΣ

ΧΡΗΣΗ ΑΠΟΡΡΥΠΑΝΤΙΚΟΥ (SDS, TRITON X-100)



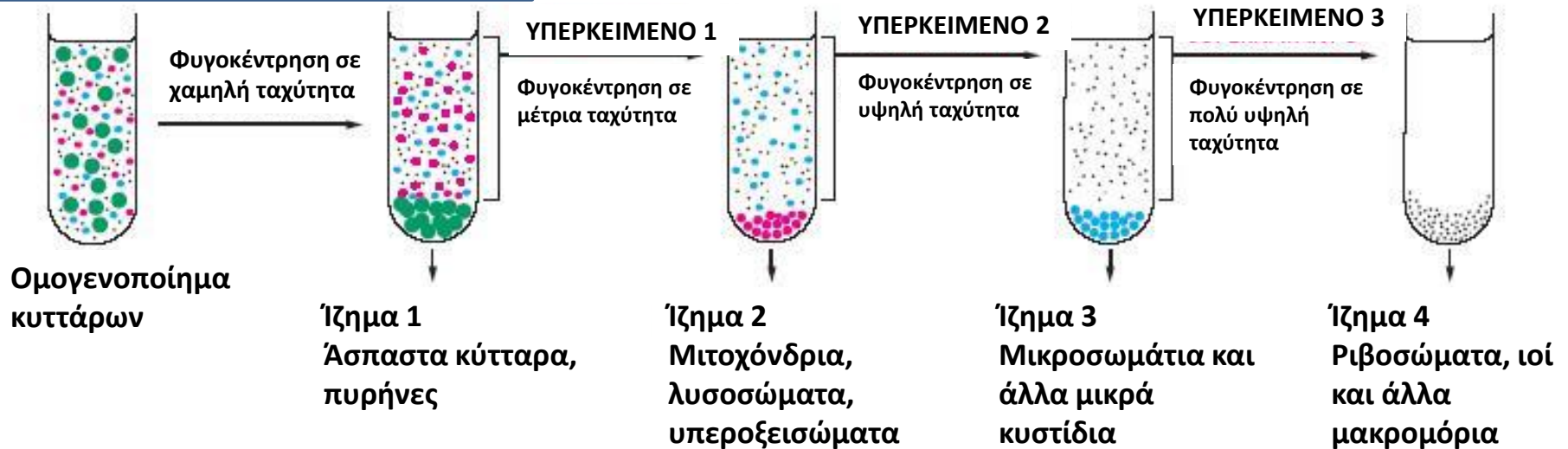
ΡΗΞΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΛΟΓΩ ΩΣΜΩΣΗΣ

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ – ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ

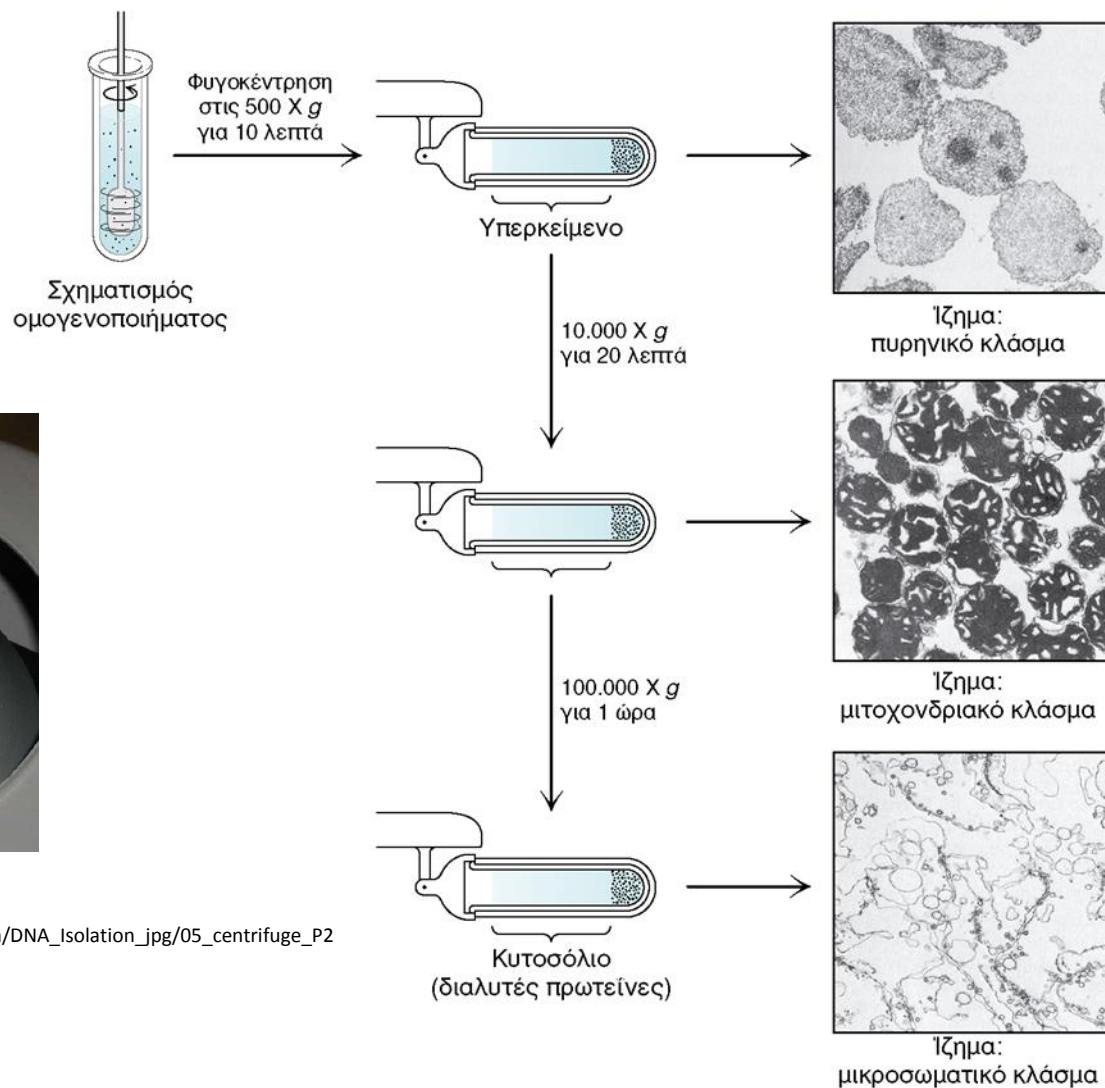
Διαφορική Φυγοκέντρηση

Διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με συνεχώς αυξανόμενη ταχύτητα

Διαχωρισμός των κυτταρικών συστατικών με βάση το μέγεθος και την πυκνότητα. Τα μεγαλύτερα και μεγαλύτερης πυκνότητας συστατικά κατακρημνίζονται πρώτα. Η πρώτη φυγοκέντρηση οδηγεί στο σχηματισμό ενός ίζηματος και ενός υπερκειμένου. Τα μικρότερα σωματίδια μένουν στο υπερκείμενο το οποίο στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε μεγαλύτερες ταχύτητες και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.



ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ



http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Genetics/DNA_Isolation/DNA_Isolation_jpg/05_centrifuge_P2_060005.jpg

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

ΔΙΑΦΟΡΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

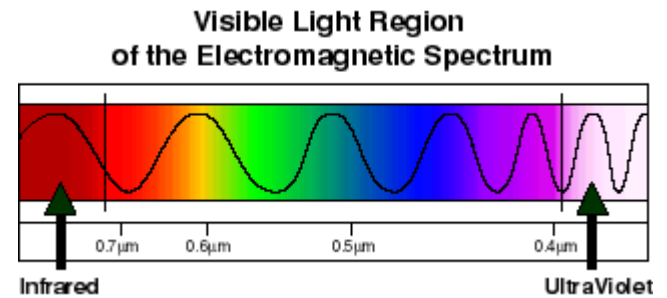
ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΣΤΑ 280 nm (UV)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΟΥΡΙΑΣ
ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD
ΜΕΘΟΔΟΣ LOWRY



ΠΕΡΙΟΧΗ ΟΡΑΤΟΥ



<http://science.hq.nasa.gov/kids/imagers/ems/visible.gif>

Η απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας προκαλεί μεταπτώσεις ηλεκτρονίων εξωτερικών στοιβάδων ηλεκτρονίων

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ-ΠΕΡΙΟΧΗ ΟΡΑΤΟΥ

Εάν περάσει λευκό φως μέσα από ένα έγχρωμο διάλυμα, ορισμένα μήκη κύματος του φωτός, απορροφούνται εκλεκτικά

Η φωτομετρία ασχολείται με την ποιοτική και ποσοτική αξιοποίησης της απορρόφησης, που προκύπτει από διάφορες ενώσεις, που απορροφούν φως

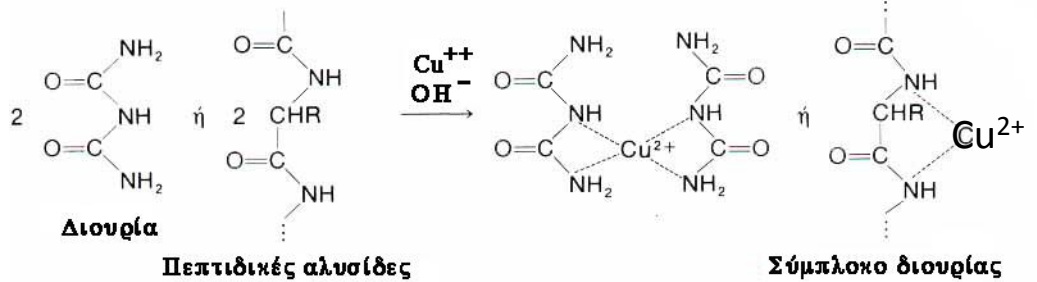
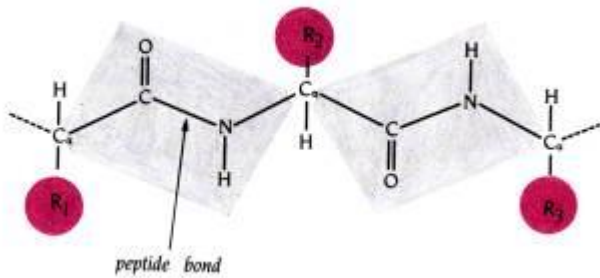
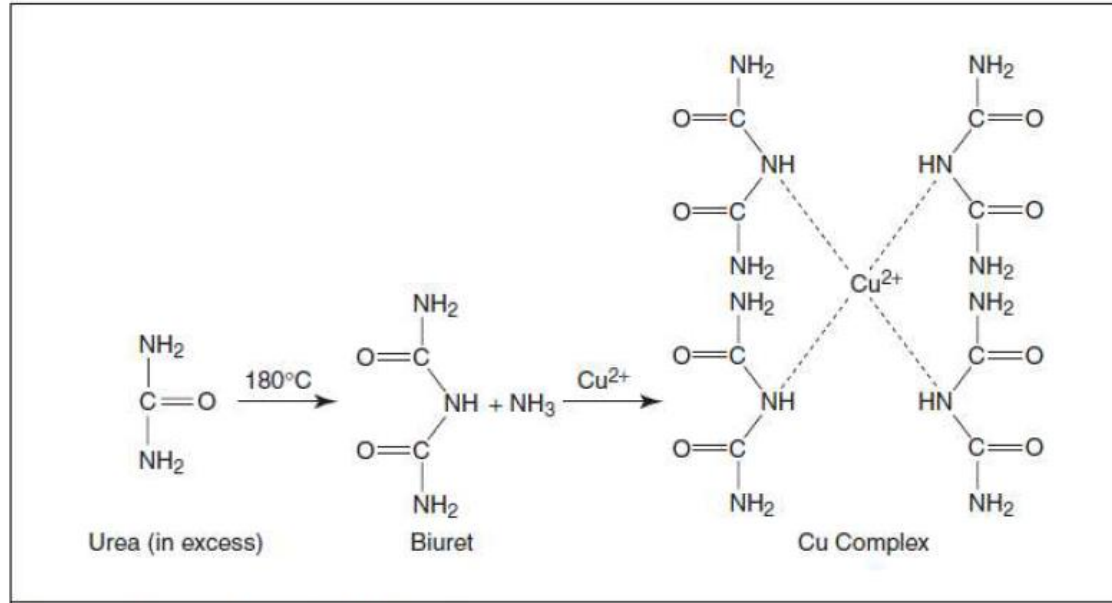
NΟΜΟΣ ΤΟΥ BEER LAMBERT

$$A = \log(I_0 / I) = \epsilon bc \text{ (mol/L)} = \alpha bc \text{ (g/L)}$$

- A =** Απορρόφηση (Absorbance). Καθαρός αριθμός
- I₀ =** Ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας
- I =** Ισχύς της εξερχόμενης από το διάλυμα ακτινοβολίας
- C =** Συγκέντρωση του διαλύματος σε mol/l ή gr/l
- b =** το μήκος διαδρομής που διανύει η δέσμη μέσα στο διάλυμα (cm)
- ε =** Σταθερά μοριακής απορρόφησης, όταν η c εκφράζεται σε mol/l
- α =** Σταθερά μοριακής απορρόφησης, όταν η α εκφράζεται σε gr/l

ε = Απορρόφηση A, ουσίας διαλύματος 1M, που μετράται σε κυψελίδα διαδρομής 1cm

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΟΥΡΙΑΣ



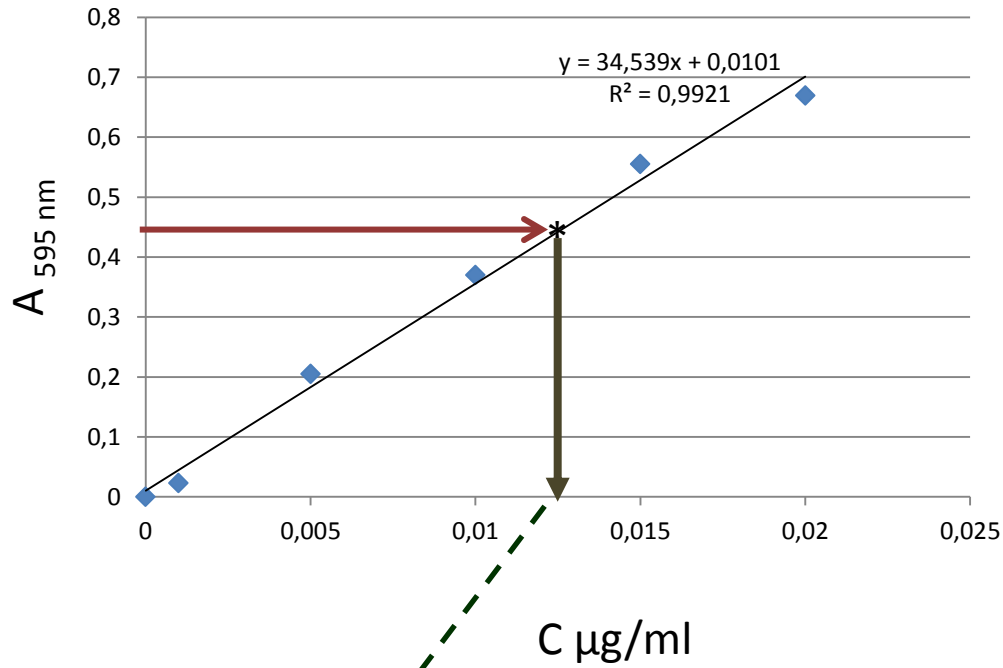
Έγχρωμο προϊόν
Απορρόφά στα 540 nm

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ

Αντιδραστήρια (ml)	σωλ.	σωλ.	σωλ.	σωλ.	σωλ.
	T	1	2	3	4
Καζεΐνη (2,5mg/ml) σε 10mM NaOH	–	0,5 ml	1 ml	2,0 ml	2,5 ml
10 mM NaOH	2,5 ml	2 ml	1,50 ml	0.5 ml	–
Διάλυμα Διουρίας	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ

Απορρόφηση
Άγνωστου
δείγματος



Συγκέντρωση άγνωστου δείγματος

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ

ΕΞΑΛΑΤΩΣΗ (Salting out) : Οι περισσότερες πρωτεΐνες παρουσιάζουν μικρότερη διαλυτότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος

Η συγκέντρωση άλατος που απαιτείται για να εξαλατωθεί μία πρωτεΐνη διαφέρει από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη

Salting in: Σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος, η διαλυτότητα της πρωτεΐνης αυξάνει με αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος (δηλαδή αύξηση της ιοντικής ισχύος)

Salting out: Καθώς η συγκέντρωση του άλατος (ιοντική ισχύς) αυξάνεται περαιτέρω, η διαλυτότητα της πρωτεΐνης αρχίζει να μειώνεται. Σε επαρκώς υψηλή ιοντική ισχύ, η πρωτεΐνη καθιζάνει σχεδόν εντελώς (εξαλάτωση).

ΕΝΑΛΑΤΩΣΗ (Salting in)

Η εναλάτωση σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος εξηγείται από την θεωρία Debye-Huckel. Σύμφωνα με αυτήν πρωτεΐνες περιβάλλονται με ιόντα άλατος αντίθετου φορτίου από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε μείωση της ηλεκτροστατικής ελεύθερης ενέργειας της πρωτεΐνης, αύξηση της αποτελεσματικότητας του διαλύτη, και κατά συνέπεια σε αύξηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης

ΕΞΑΛΑΤΩΣΗ (Salting out)

Η μείωση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος ερμηνεύεται από τη θεωρία John Gamble Kirkwood. Η αφθονία ιόντων άλατος μειώνει την αποτελεσματικότητα της διαλυτοποίησης της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε κατακρήμνισή της.

Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από **υδρόφιλα** και **υδρόφοβα** αμινοξέα.

Κατά τη διαλυτοποίηση πρωτεϊνών σε υδατικά διαλύματα η διαμόρφωση της πρωτεΐνης είναι τέτοια ώστε τα **υδρόφοβα** αμινοξέα να προστατεύονται από τις **υδρόφοβες περιοχές** ενώ τα **υδρόφιλα** να αλληλεπιδρούν με **μόρια νερού**, ώστε οι πρωτεΐνες να φτιάχνουν δεσμούς υδρογόνου με τα περιβάλλοντα μόρια νερού. Όσο περισσότερο υδρόφιλη είναι η επιφάνεια της πρωτεΐνης, τόσο περισσότερο αυτή είναι διαλυτή.

Όταν η συγκέντρωση του άλατος αυξάνει, μερικά από τα **μόρια νερού** αλληλεπιδρούν με τα **ιόντα άλατος**, περιορίζοντας έτσι τα μόρια του νερού που διατίθενται για την αλληλεπίδρασή τους με τα φορτισμένα τμήματα της πρωτεΐνης.

Ως αποτέλεσμα των αυξημένων απαιτήσεων για μόρια ενυδάτωσης, **οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης καθίστανται μεγαλύτερες από τις αλληλεπιδράσεις διαλυμένης ουσίας διαλύτη**. Το φαινόμενο αυτό γνωστό ως εξαλάτωση οδηγεί στον σχηματισμό υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών

Καταβύθιση πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο

Σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του θειικού αμμωνίου



- Συλλογή κατακρημνισθέντας πρωτεΐνης,
- Προσδιορισμός πρωτεΐνης στο ίζημα
- και έλεγχος ύπαρξης της προς εξέταση πρωτεΐνης στο ίζημα ή στο υπερκείμενο



Η συγκέντρωση θειικού αμμωνίου αυξάνεται σε μια τιμή που καθιζάνει το μεγαλύτερο μέρος της προς εξέταση πρωτεΐνης, ενώ αφήνει το μέγιστο ποσό ανεπιθύμητων πρωτεϊνών σε διάλυμα (ή αντιστρόφως δηλ. το μεγαλύτερο ποσοστό επιθυμητής πρωτεΐνης στο υπερκείμενο).



- Η καταβυθισμένη πρωτεΐνη συλλέγεται με φυγοκέντρηση και
- Επαναδιαλύεται σε φρέσκο ρυθμιστικό διάλυμα για το επόμενο στάδιο του καθαρισμού (Εφόσον η επιθυμητή πρωτεΐνη βρίσκεται στο ίζημα)

Σκοπός είναι να βρεθεί η συγκέντρωση θειικού αμμωνίου στην οποία καθιζάνει το μέγιστο ποσοστό της ανεπιθύμητης πρωτεΐνης, αφήνοντας το μεγαλύτερο μέρος της επιθυμητής πρωτεΐνης ακόμα σε διάλυμα ή αντιστρόφως.

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ

ΕΞΑΛΑΤΩΣΗ

```
graph TD; A[ΕΞΑΛΑΤΩΣΗ] --> B[Χρησιμοποιείται ως μέθοδος κλασμάτωσης πρωτεϊνών]; A --> C[Χρησιμοποιείται ως μέθοδος συμπύκνωσης πρωτεϊνών];
```

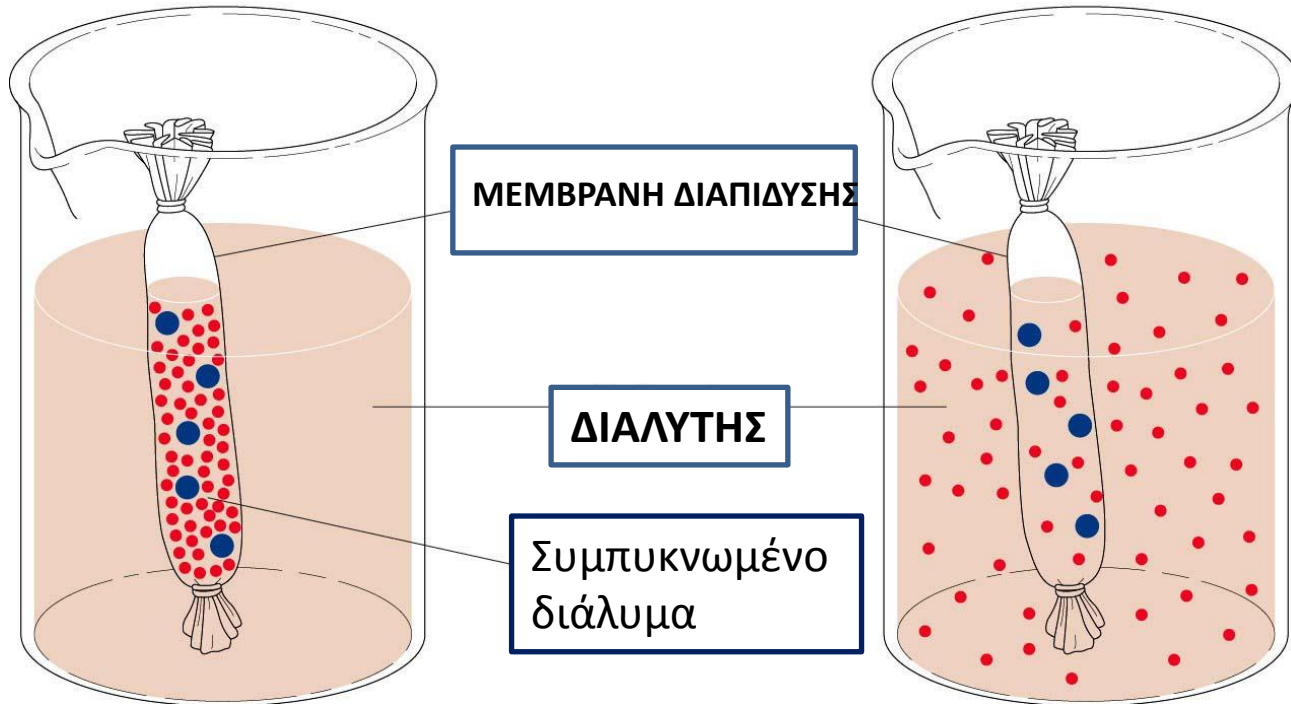
Χρησιμοποιείται ως μέθοδος
κλασμάτωσης πρωτεϊνών

Χρησιμοποιείται ως μέθοδος συμπύκνωσης
πρωτεϊνών

ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

ΣΤΗΝ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΠΙΔΥΣΗΣ

ΣΕ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ



Απομάκρυνση

- Άλατος
- Μικρών μορίων



Αντικατάσταση μέσου διαλυτοποίησης πρωτεΐνης