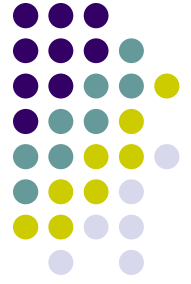


Tehnike razdvajanja i identifikacije proteina

TEZE PREDAVANJA



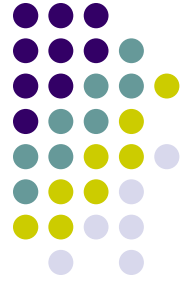
- I. Zašto analiza proteina?**
- II. Tehnike za razdvajanje proteina – opsti koncepti**
- III. Elektroforeza na gelu od poliakrilamida (PAGE)**
- IV. Primena Western Blot-a**
- V. Druge tehnike razdvajanja i identifikacije proteina – proteomika**



l:

Zasto analiza proteina?

Zašto analiza proteina?



DNK - geni



- Oko 20,000 gena + regulatornih elementa
- Šta to govori o funkciji i interakciji
- Kako gen vrši funkciju?

RNK - medijator informacije između gena i proteina

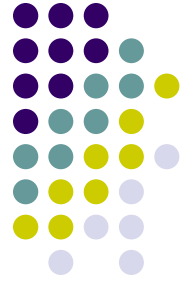


- Broj?
- Šta to govori o funkciji i Interakciji
- Kako taj medijator vrši funkciju?

PROTEIN – krajni proizvod genske ekspresije

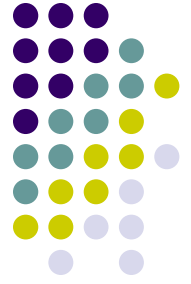
- Broj? → Sigurno preko 100,000 možda i 200,000
- Izoforme, post-translacione modifikacije, kovalentne i nekovalentne, reverzibilne i ireverzibilne (permenantne)

Prednost analize proteina u poredjenju sa analizom DNK ili RNK



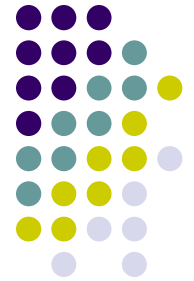
- 1. Manje manipulacije uzorkom pre analize**
- 2. Nema potrebe za amplifikacijom početnog uzorka**
 - Mali rizik od kontaminacije**
- 3. Dobijeni podaci su na nivou supstrata, koji je obično predmet delovanja farmakoloških agenasa**
- 4. U zavisnosti od primenjene tehnike, može se istovremeno analizirati od 1 do 20,000 proteina i njihovih modifikacija**

Uzorci



Uopsteno, za analizu proteina se mogu koristiti tri vrste uzorka:

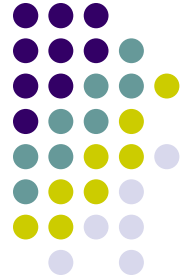
- 1. Eksperimentalni sistem ćelijske kulture**
- 2. Mikrobiološki uzorak**
- 3. Uzorak od pacijenta**



II:

Tehnike za razdvajanje i identifikaciju proteina – opsti koncepti

Elektroforeza na gelu od poliakrilamida



- **Zajedničko ime za niz elektroforetskih procedura koje:**
 - **vrse razdvajanje proteina po veličini**
 - **posle razdvajanje omogućavaju identifikaciju poznatih i nepoznatih proteina od interesa**
 - **omogućavaju kvantifikaciju poznatih proteina**
 - **omogućavaju identifikaciju nepoznatih proteina**

Opšti principi izolacije proteina:



Preparacija Uzorka

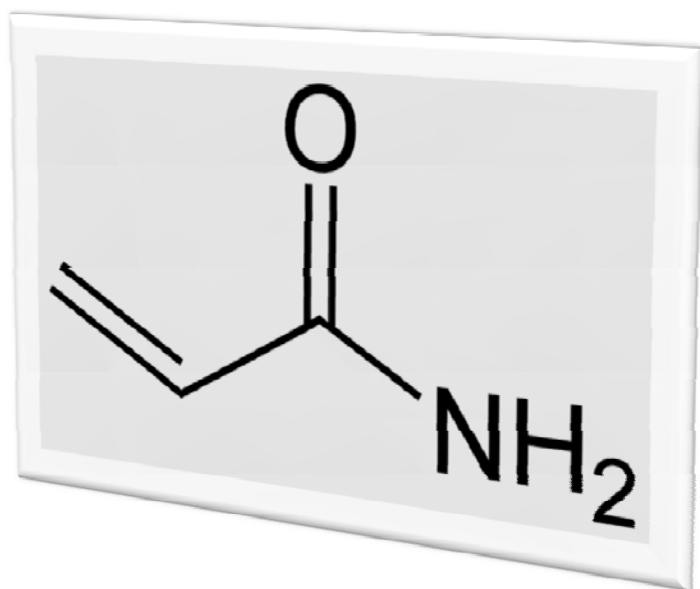
- liziranje celija – hipotoni pufer sa deterdžentom (NP40 ili Triton X-100)
 - izdvajanje citoplazme centrifugiranjem
 - merenje koncentracije proteina (Bradford ili Lowry Assay)
 - rastvaranje proteina u puferu
- **Zatim separacija proteina na akrilamidnom gelu**

Akrilamidni gel 1: Akrilamid



Akrilamid ili 2-propenamid:

- formula: C_3H_5NO



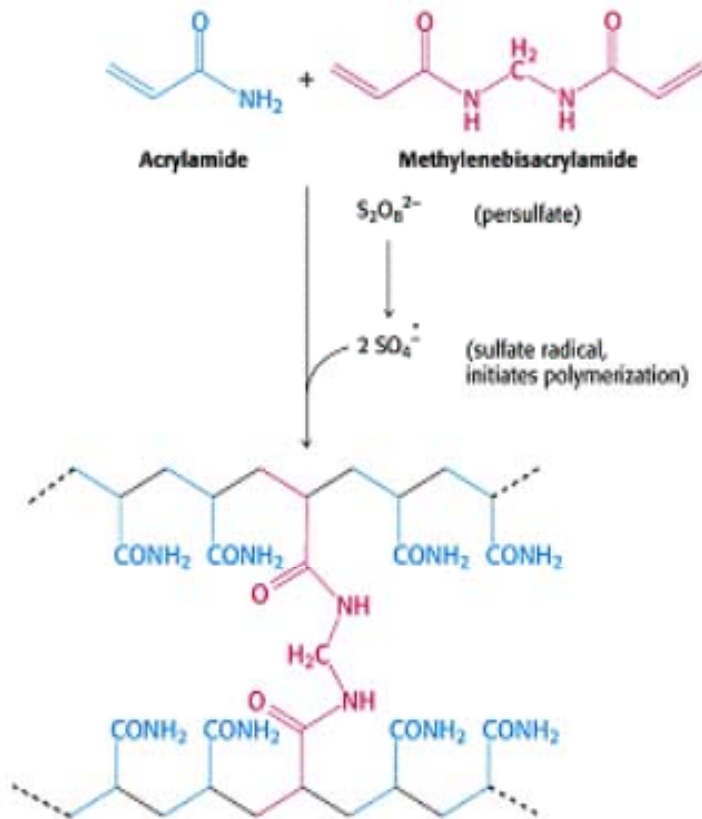
Karakteristike:

- beli kristal
- rastvoran u vodi, etanolu, hloroformu i etru

Opasnost:

- neurotoksin
- kumulativna periferna paraliza
- maska i rukavice kad se radi sa monomerima

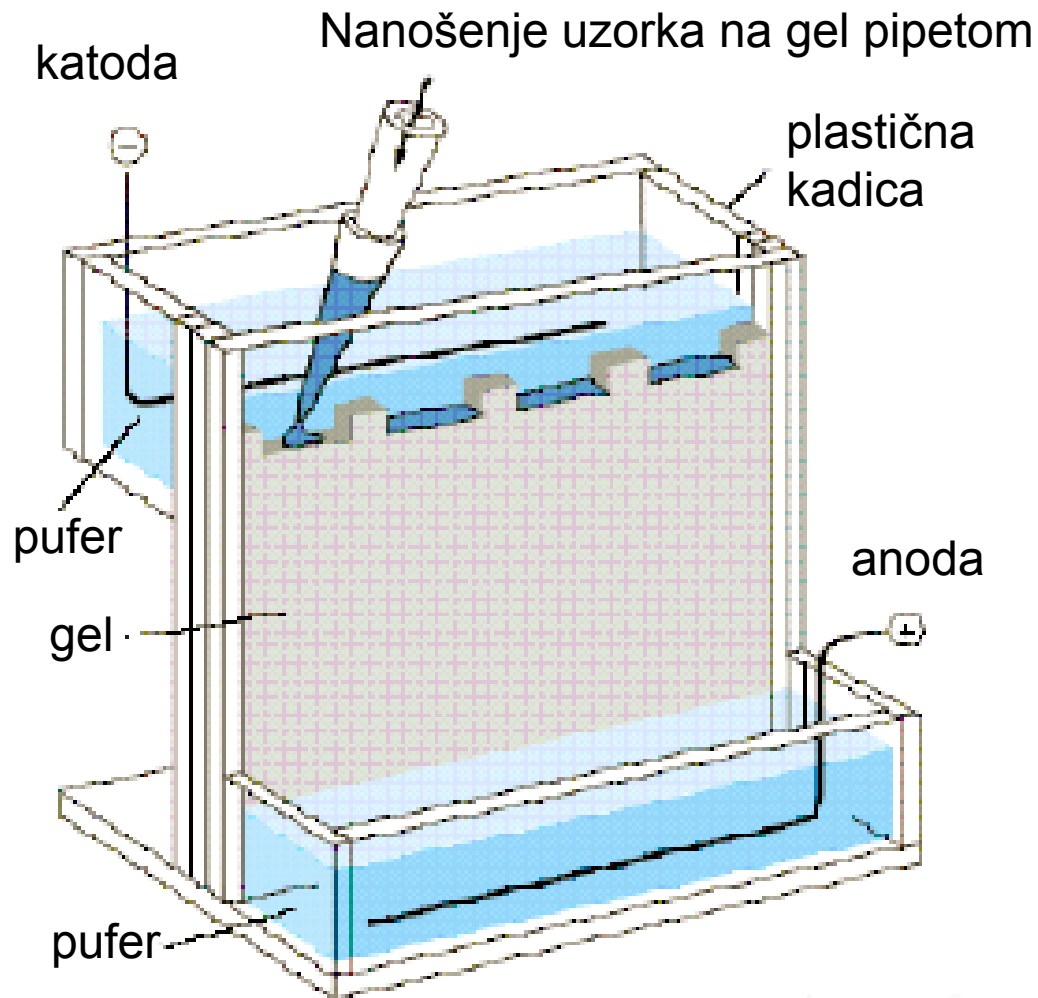
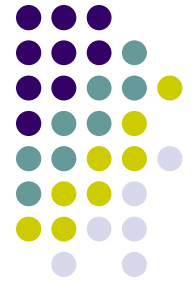
Akrilamidni gel 2: polimerizacija akrilamida



Sastav poliakrilamidnog gela:

1. akrilamid (39) : bisakrilamid (1)
2. Tris-HCl - pH 6.8/8.8
3. Amonijum persulfat
4. TEMED
5. H_2O
6. Natrijum dodecilsulfat (SDS)

Razdvajanje proteina: PoliAkrilamid Gel Elektroforeza (PAGE)



$$\mu = V/E = Z/f$$

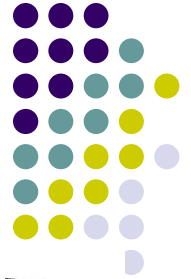
- μ - Mobilnost molekula
- V- Brzina molekula
- E- Jačina električnog polja
- Z- Neto naelektrisanje molekula
- f- Frikcioni koeficijent



III:

Elektroforeza na gelu od poliakrilamida

SDS-PAGE: razdvajanje proteina po molekularnoj masi

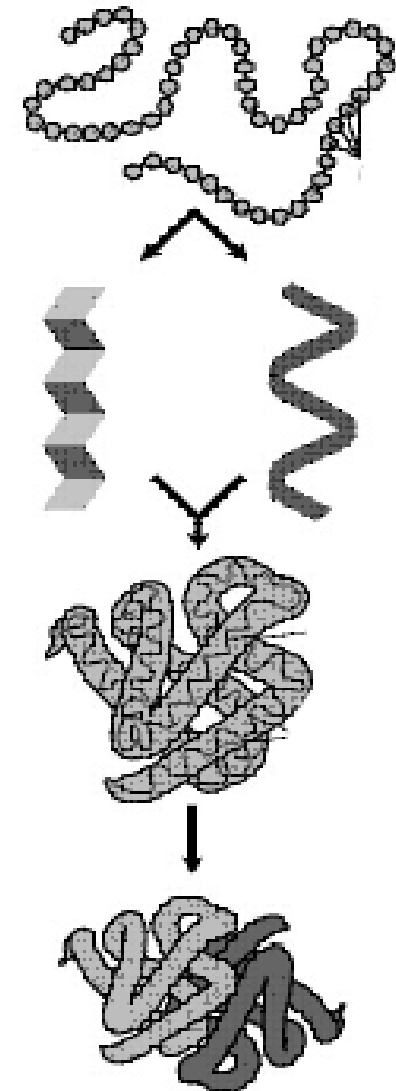


Primarna struktura: Linearni niz amino kiselina koje su međusobno povezane peptidnim vezama.

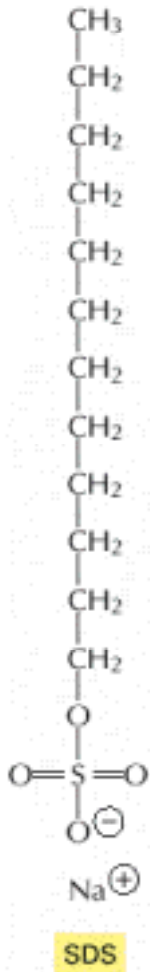
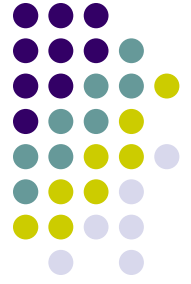
Sekundarna struktura: Ograničena struktura koja nastaje kada se ne-susedne amino kiseline povežu vodoničnim vezama.

Tercijerna struktura: Uvijanje jednog polipeptidnog lanca u globularnu strukturu. Nastalo povezivanjem pojedinačnih udaljenih amino kiselina nekovalentnim vezama .

Kvaterna struktura: Kada je protein izgrađen od više od jednog polipeptidnog lanca.



SDS-PAGE: razdvajanje proteina po molekularnoj masi 1



SDS:

Deterdžent: Natrijum dodecil sulfat (SDS) se koristi da obloži proteine u rastvoru.

Jedan SDS molekul se vezuje za dve AK u rastvoru.

SDS ima negativno naelektrisanje kojim se neutrališe naelektrisanje proteina tako da razdvajanje proteina zavisi isključivo od njihove mase.

SDS-PAGE: razdvajanje proteina po molekularnoj masi 2



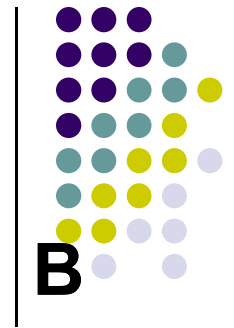
B-Merkaptoetanol



β -mercaptoethanol

- Sluzi kao redukciono sredstvo za disulfidne mostove
- Neophodno sredstvo kad se vrši analiza denaturisanih polipeptida
- Bez β -Merkaptoetanola dimeri spojeni disulfidnim mostovima bi migrirali kao jedan protein čija masa je veća od mase ispitivanog proteina

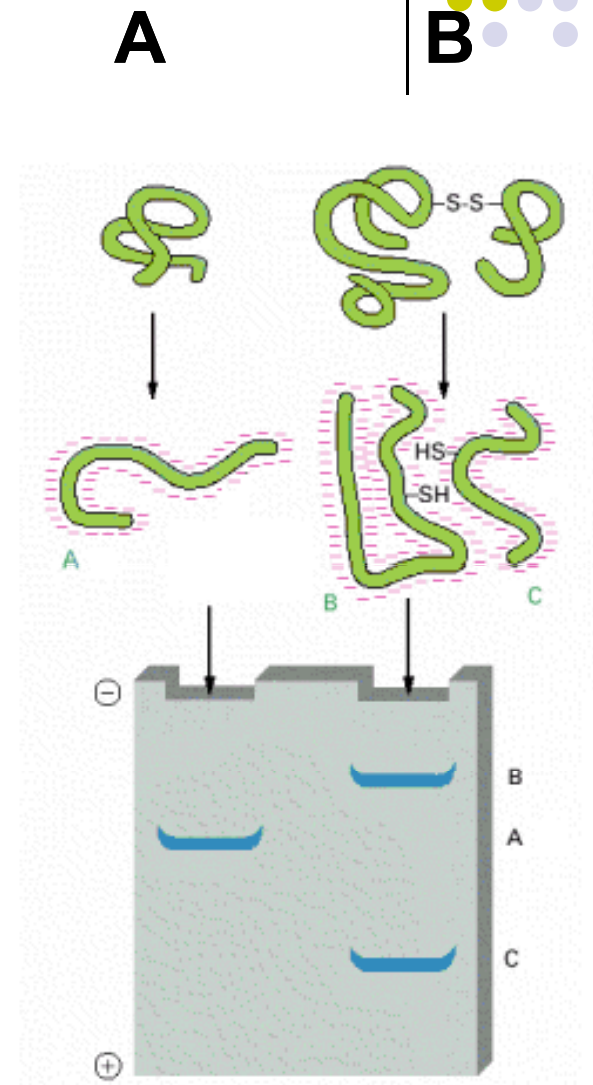
SDS-PAGE: razdvajanje proteina po molekularnoj masi



Efekat SDS i β -merkaptetanola na rezoluciju proteina u gelu

- A. Jednolancani polipeptid
 - Denaturacija lanca SDS-om

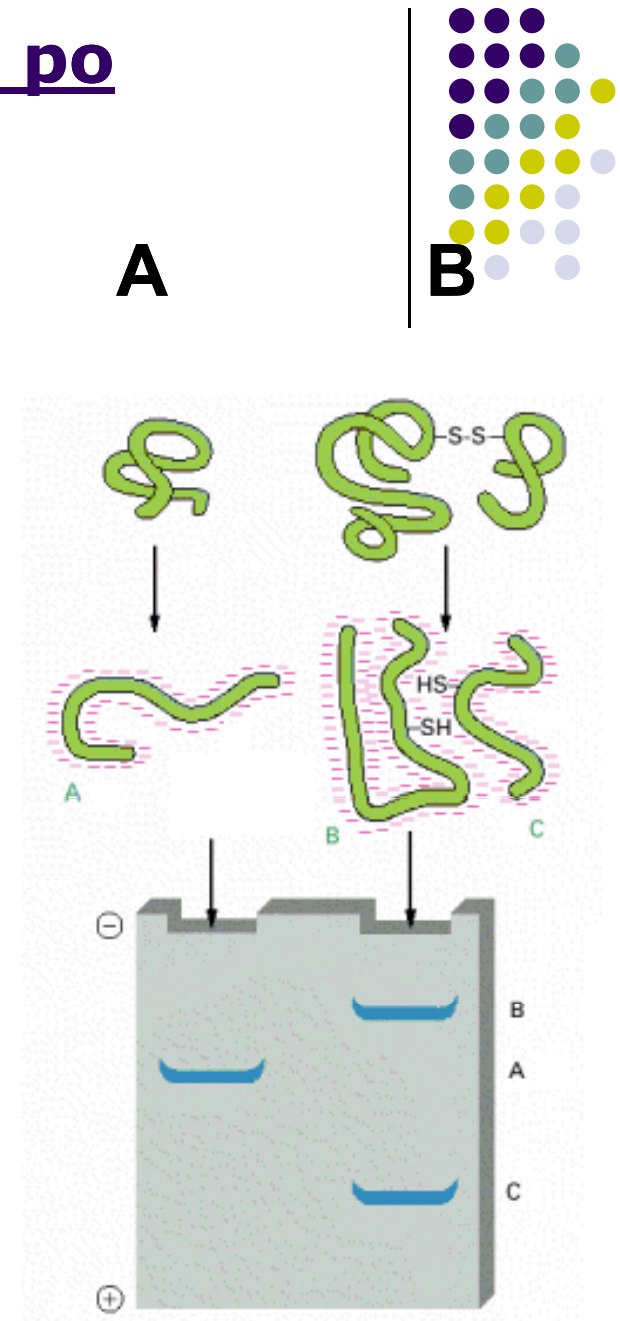
- B. Dvolancani polipeptid spojen disulfidnim mostom
 - Razdvajanje dva polipeptidna lanca β -Merkaptetanolom i denaturacija lanca SDS-om



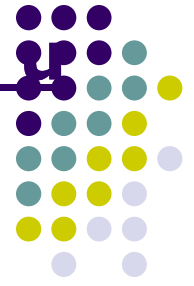
SDS-PAGE: razdvajanje proteina po molekularnoj masi 4

KLJUČNI KONCEPT:

- Zbog SDS-a i β -Merkaptoetanol, SDS-PAGE vrši separaciju proteina isključivo na osnovu **molekularne mase** pojedinačnih polipeptida

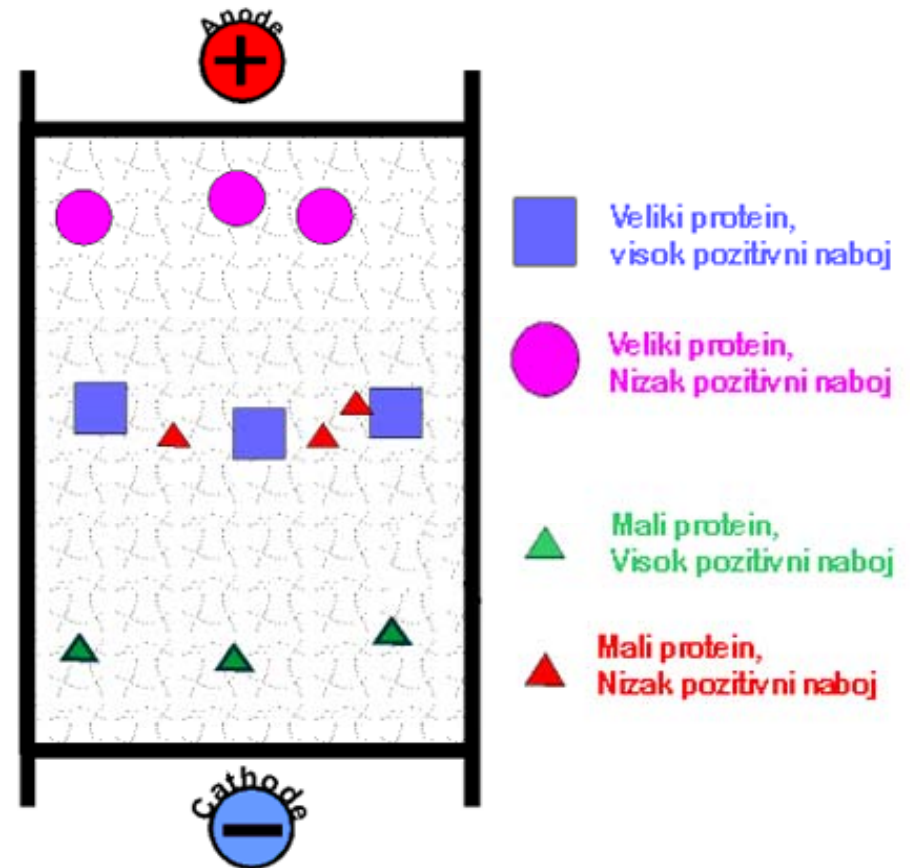


Nativna elektroforeza: razdvajanje proteina u nativnoj konformaciji (Native PAGE) 1

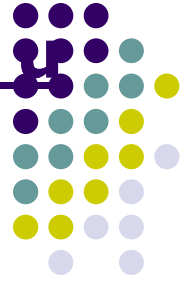


Elektroforeza bez SDS i β -Merkaptoetanol

- Protein je u nativnoj kvaturnoj strukturi
- Separacija proteina po velicini i po kolicini pozitivnog naboja

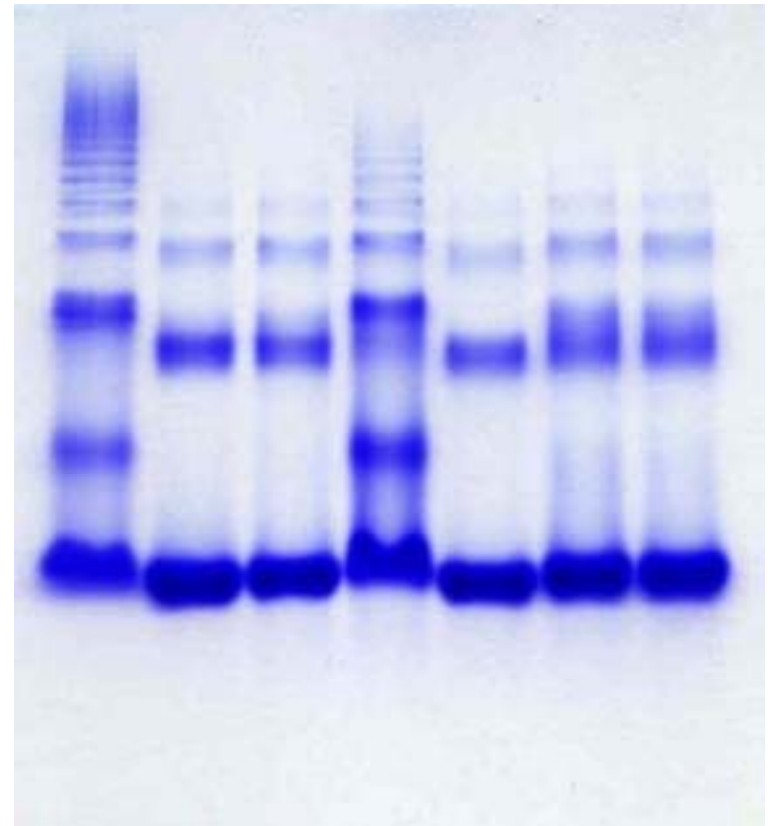


Nativna elektroforeza: razdvajanje proteina u nativnoj konformaciji (Native PAGE)



Elektroforeza bez SDS i β -Merkaptoetanol

- Korist: Detekcija proteinskih oligomera
- Dimerizacija, trimerizacija, itd., proteina



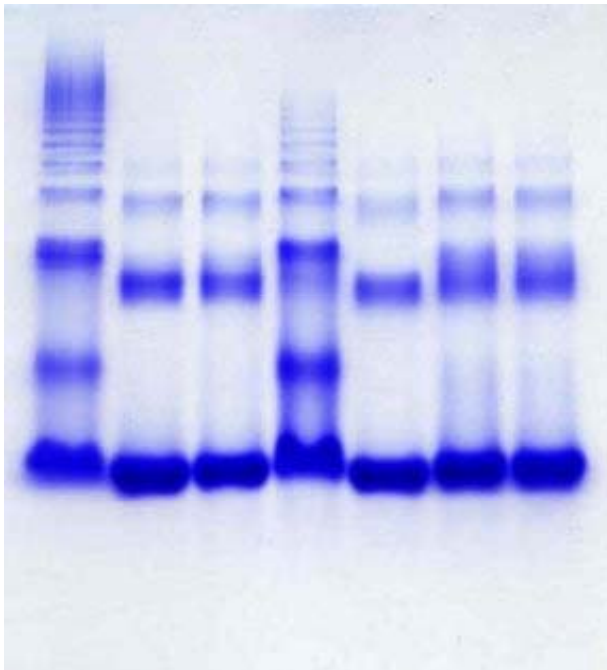
Vizuelizacija proteina posle separacije nativnom PAGE ili SDS-PAGE: 1



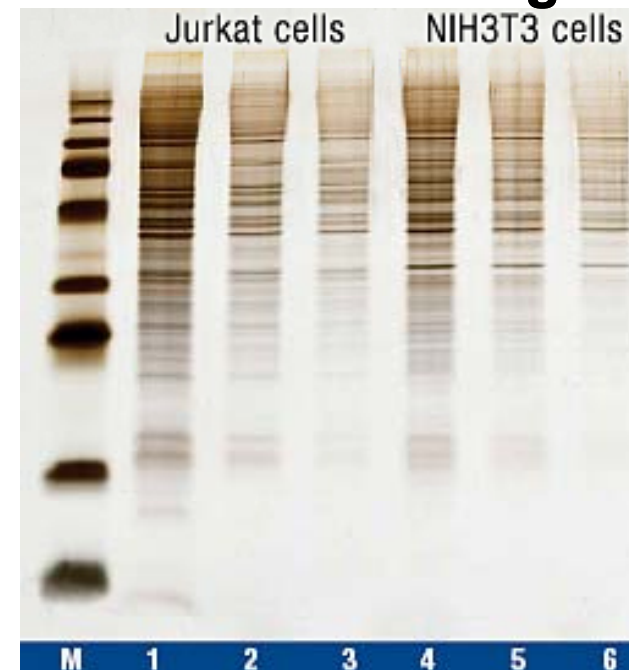
Popularne i jednostavne tehnike za vizuelizaciju proteina u gelu: Detekcija svih proteina u uzorku

- **problem**: nespecifičnost i mala senzitivnost

Coomasie Blue



Silver Staining

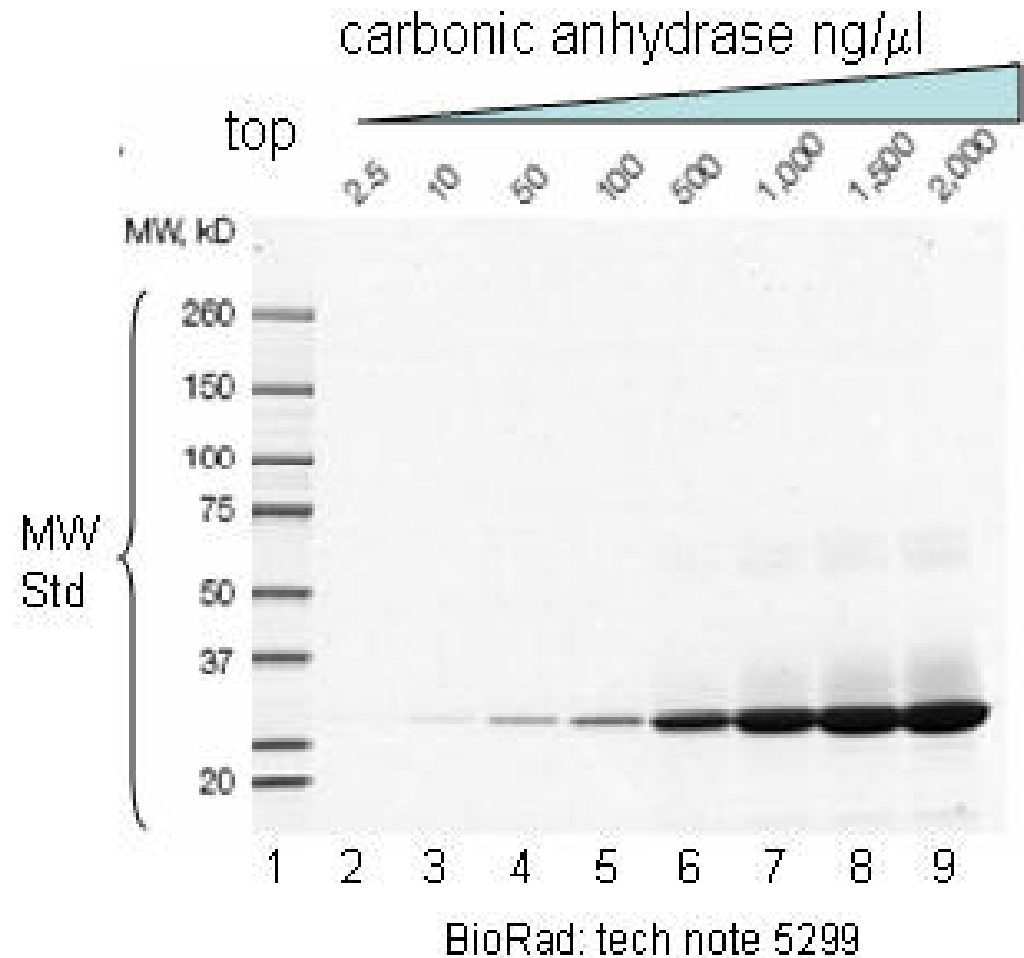


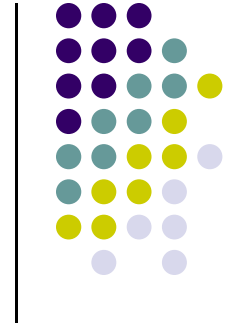
Vizuelizacija proteina posle separacije nativnom PAGE ili SDS-PAGE: 2



Western Blotting (Immunoblotting):

- imunodetekcija individualnih proteina
- najsenzitivnija i najspecifičnija metoda





IV:

Western Blot ili Immunoblot

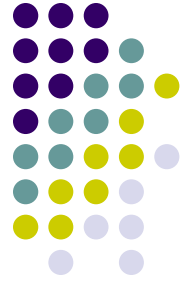
Western Blot ili Imunoblot:



Opšti princip: Imunološka detekcija pojedinih proteina posle separacije uzorka PAGE-om (Nativni PAGE ili SDS-PAGE)

- najčešće upotrebljavana tehnika za detekciju specifičnih proteina u ćeliji
- prednosti i razlozi velike upotrebe Western Blot-a:
 - senzitivnost - 5 pg proteina
 - specifičnost – izoforme proteina, lokalizacija u ćeliji, post-transkripcione modifikacije itd.

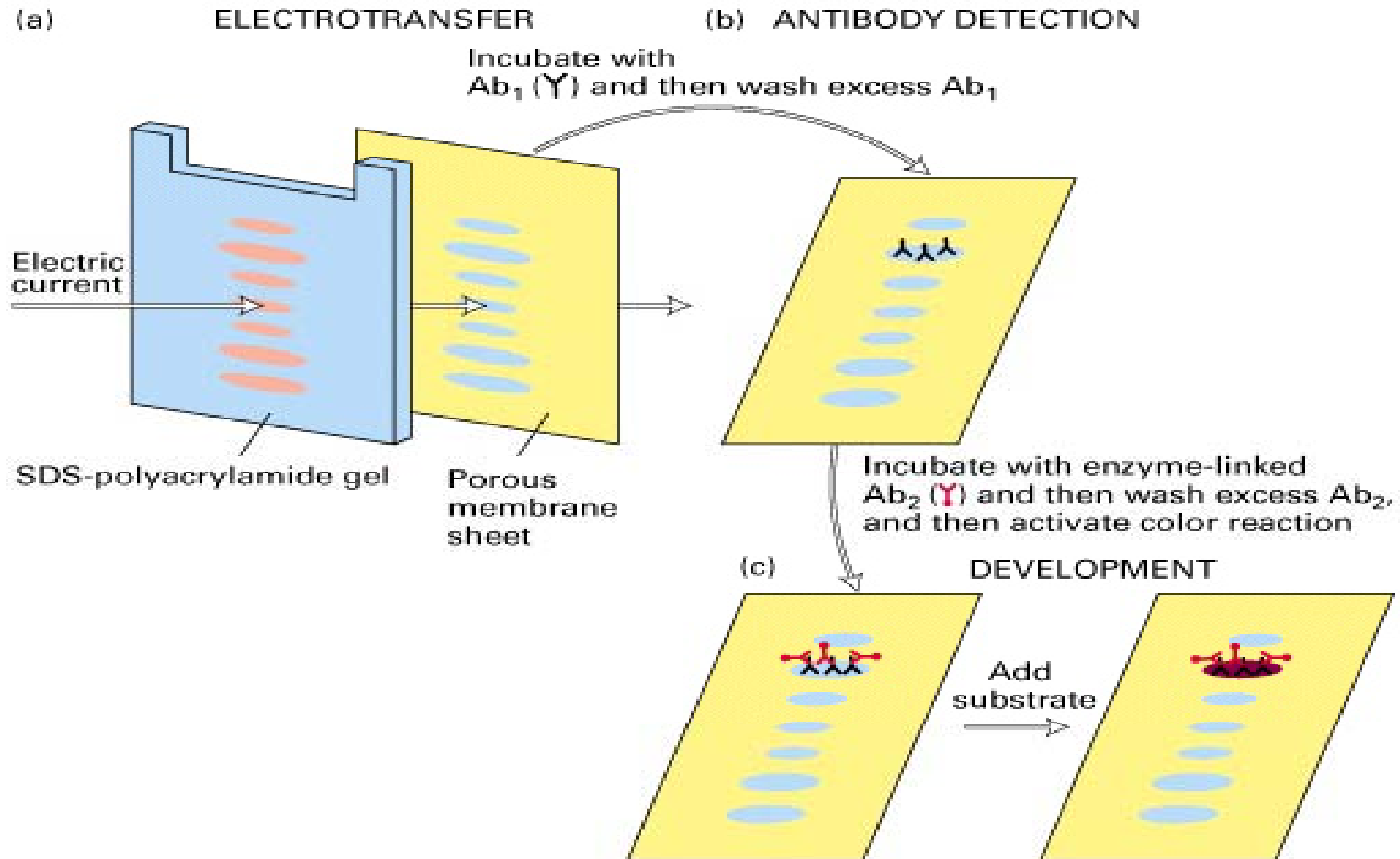
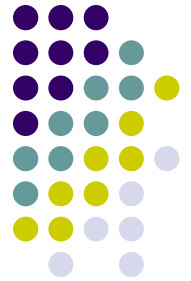
Western Blot ili Imunoblot:



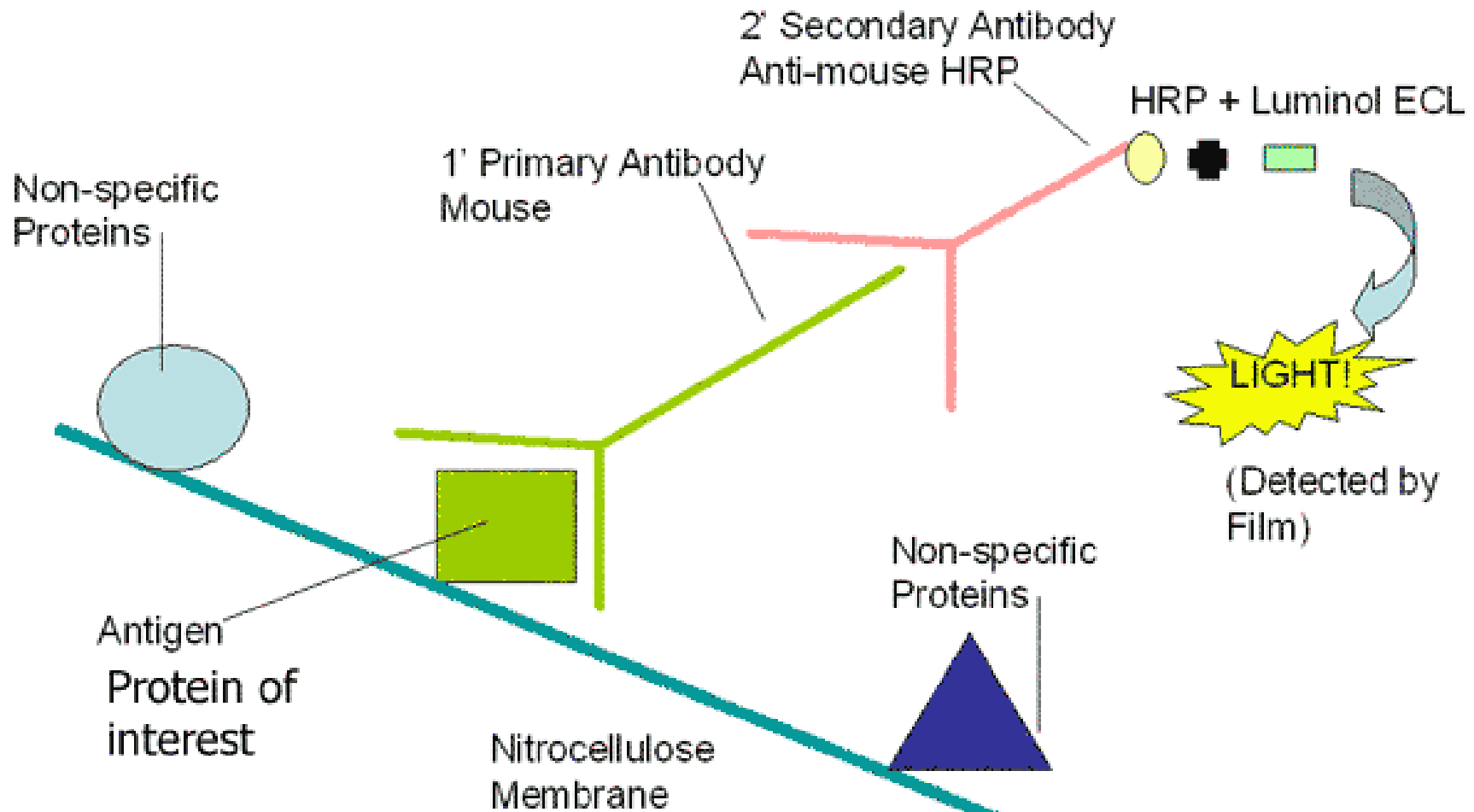
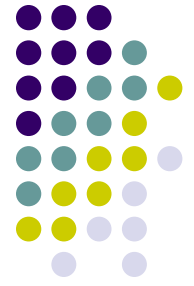
Postupak:

- 1. Nativni PAGE ili SDS-PAGE**
- 2. Elektroforetski transfer proteina na nitroceluloznu membranu**
- 3. Blokiranje nespecifičnih interakcija antitela i membrane mlekom**
- 4. Inkubacija membrane sa primarnim (specifičnim antitelom)**
- 5. Ispiranje viška primarnog antitela sa membrane**
- 6. Inkubacija membrane sa sekundarnim antitelom za koje je “prikačen” enzim koji omogućava vizualizaciju lokacije proteina na membrani**
- 7. Vizuelizacija produkta enzimske reakcije posle dodavanja supstrata za enzim (obično hemiluminiscenca)**

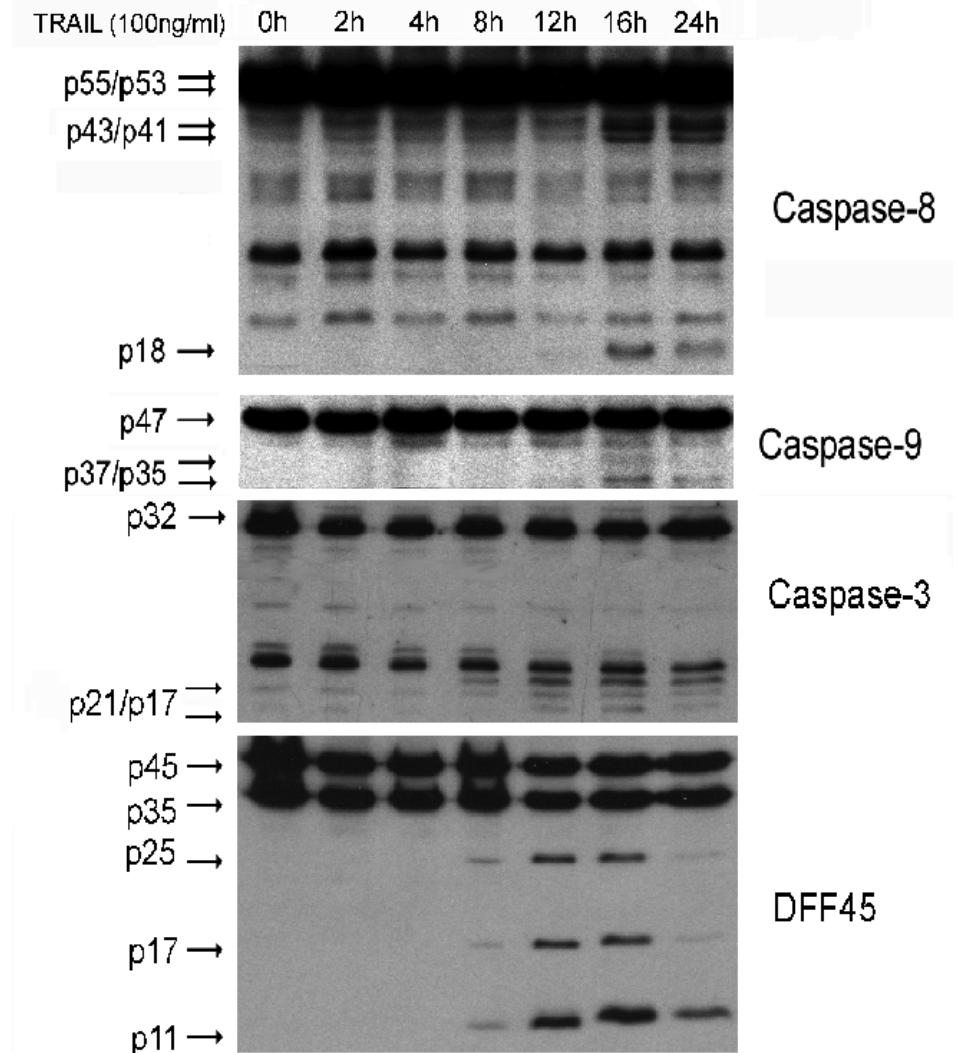
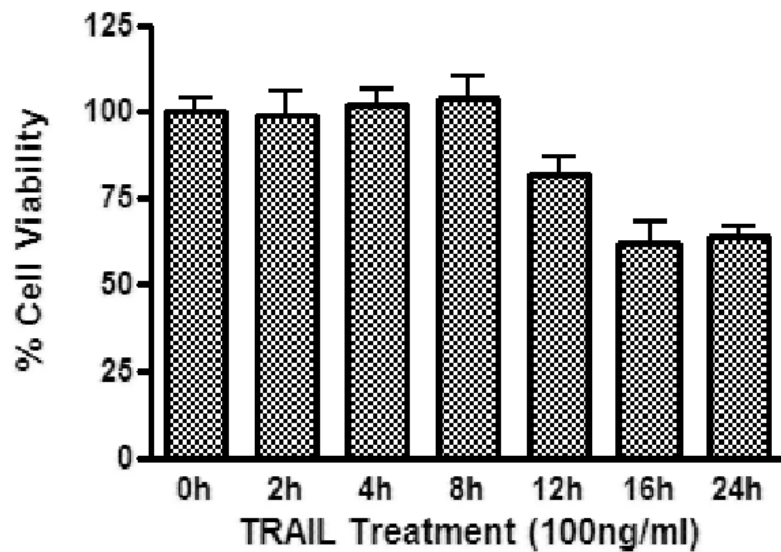
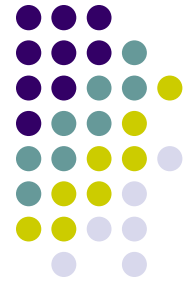
Western Blot ili Immunoblot:

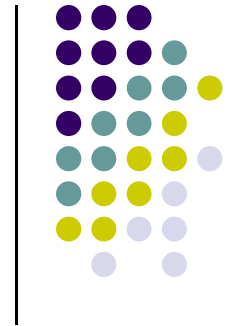


Western Blot ili Immunoblot:



Western Blot ili Immunoblot: Primer Primene

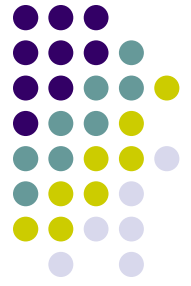




V:

Druge tehnike razdvajanje i identifikacije proteina – proteomika

2D-SDS-PAGE: Razdvajanje proteina po izoelektričnoj tački i molekularnoj masi: 1



Najmoćnija tehnika za razdvajanje proteina zato što:

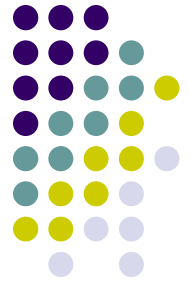
1. Proteini se prvo razdvajaju izoelektričnoj tački (pI)

2. Zatim se proteini razdvajaju pomoću SDS-PAGE po molekularnoj masi

3. Kombinacija te dve tehnike za separaciju proteina daje takvu rezoluciju da može da se simultano vizuelizuje do 20,000 proteina u nekim uzorcima

- **Realno oko 1,000**

2D-SDS-PAGE: Razdvajanje proteina po izoelektričnoj tački i molekulskoj masi: 2



Sta je izoelektrična tacka (pI)?

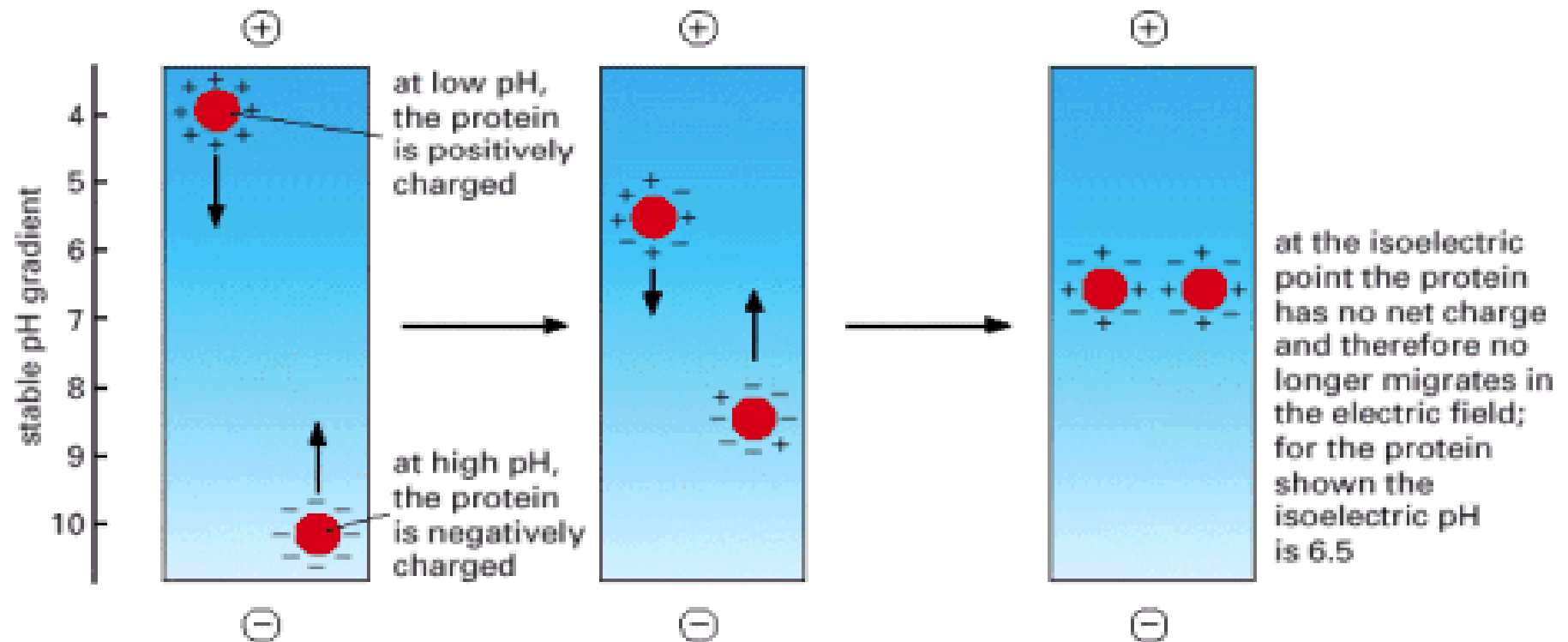
- pH na kojoj je protein 100% neutralan
- proteini su kompleksni molekuli sa pozitivnim i negativnim nabojem na raznim mestima po dužini niza amino kiselina (npr. serini i glutamati)
- proteini se medjusobno razlikuju po broju i rasporedu pozitivnih i negativnih naboja
- pri pH koji odgovara pI ukupan zbir negativnih i pozitivnih naboja na proteinu je nula
- naboj specifičnih amino kiselina zavisi donekle od pH uslova

2D-SDS-PAGE: Razdvajanje proteina po izoelektričnoj tački i molekulskoj masi: 2



pl u separaciji proteina: imobilizovani pH gradijenti

- npr. Immobilon gel membrane i izoelektricno fokusiranje
- primer je samo jedan protein, ali naravno u uzorku su 1000-a
- svaki sa drugacijem pl i masom



Klinička primena Western blot-a



U dijagnostici:

- **Detekcija prisustva C6 peptida *Boreliae burgdorferi* – Lajmska bolest**
- **Detekcija oligoklonalnih traka porekla imunoglobulina u likvoru (multipla skleroza)**
- **Definitivna potvrda dijagnoze za prionske bolesti kao što je spongiformna encefalopatija (BSE, 'bolest ludih krava').**

Klinička primena Western blot-a



U dijagnostici:

- **Potvrda prisustva anti-HIV antitela u serumu**
(proteini iz ćelija inficiranih HIV-virusom se razdvoje elektroforezom i prenesu na membranu. Ispitivani serum se zatim nanese analogno kao što se na membranu stavlja primarno antitelo; ne-vezano antitelo će se isprati, i dodaje se sekundarno antitelo na humani IgG, za koje je vezan enzim. Trake koje su se obojile pokazuju u kojem od ispitivanih seruma se nalaze antitela na HIV)
- **U dijagnostici sepse (prokalcitonin i njegovi razgradni proizvodi)** – mada postoje i komercijalni kitovi (enzimski)