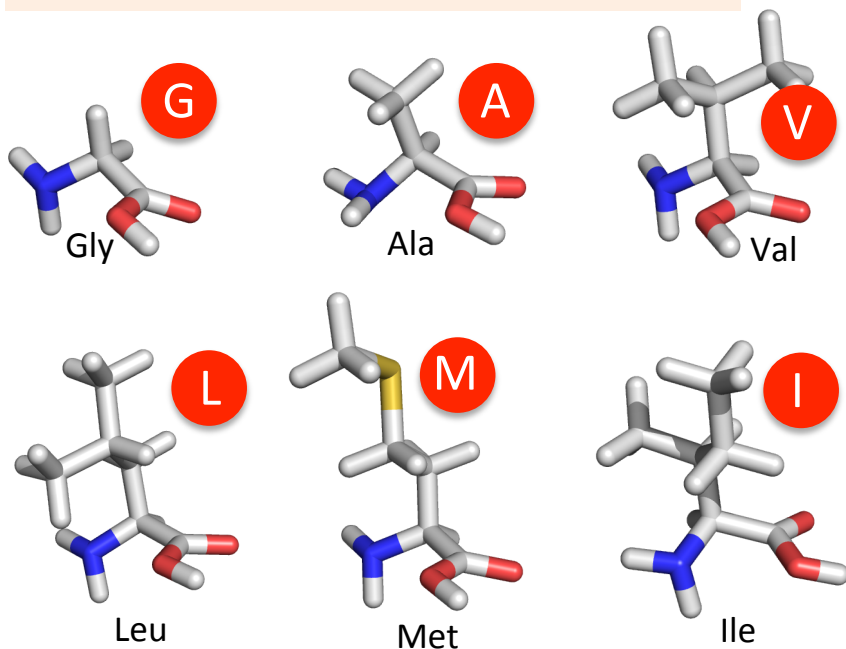


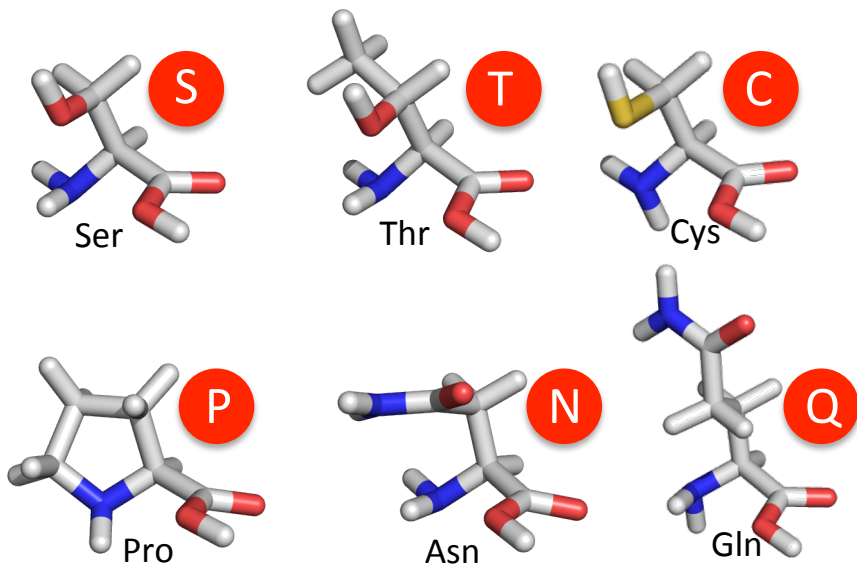
## 2. vaja – Homogenizacija tkiva in frakcionirano obarjanje z amonijevim sulfatom

- metode homogenizacije smo spoznali pri prejšnji vaji
- pregledali izolacijske postopke proteinov
- za razumevanje izolacijskih postopkov je potrebno razumeti zgradbo in lastnosti proteinov

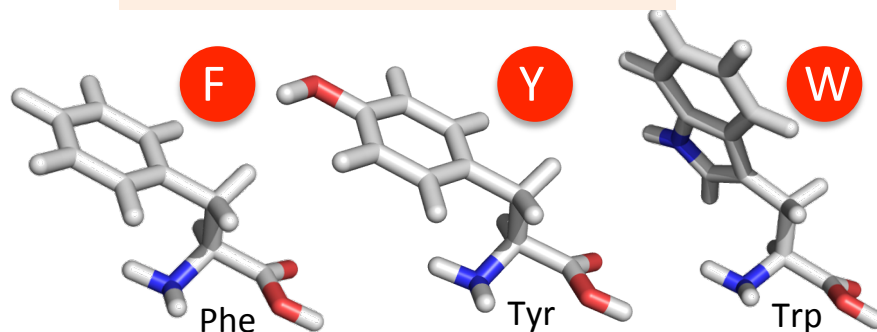
## nepolarne, alifatske stranske verige



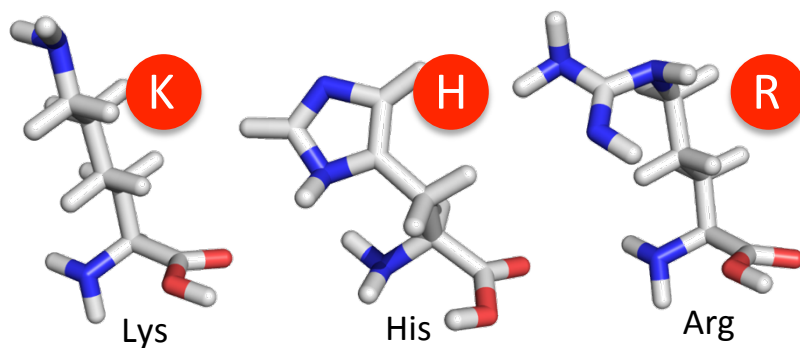
## polarne, nenabite stranske verige



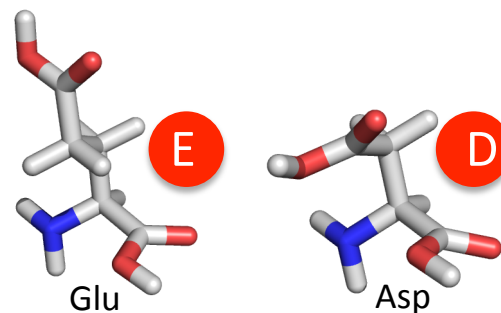
## aromske stranske verige



## pozitivno nabite stranske verige



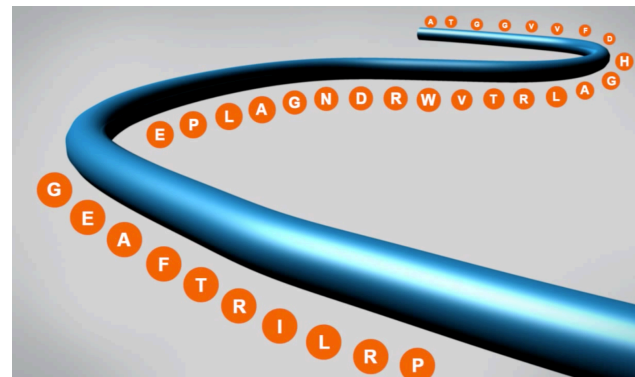
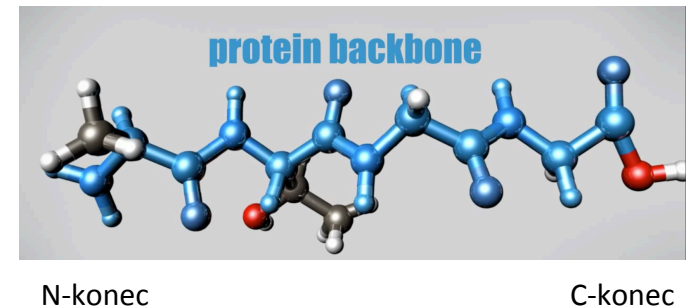
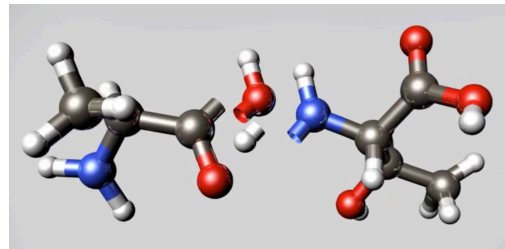
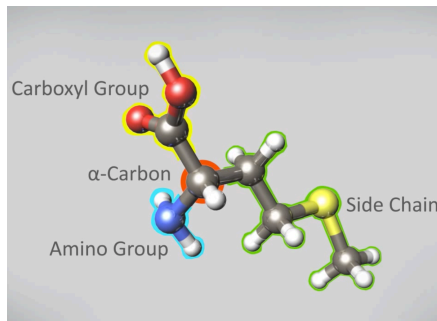
## negativno nabite stranske verige



# Nivoji zgradbe proteinov

## I. Primarna struktura

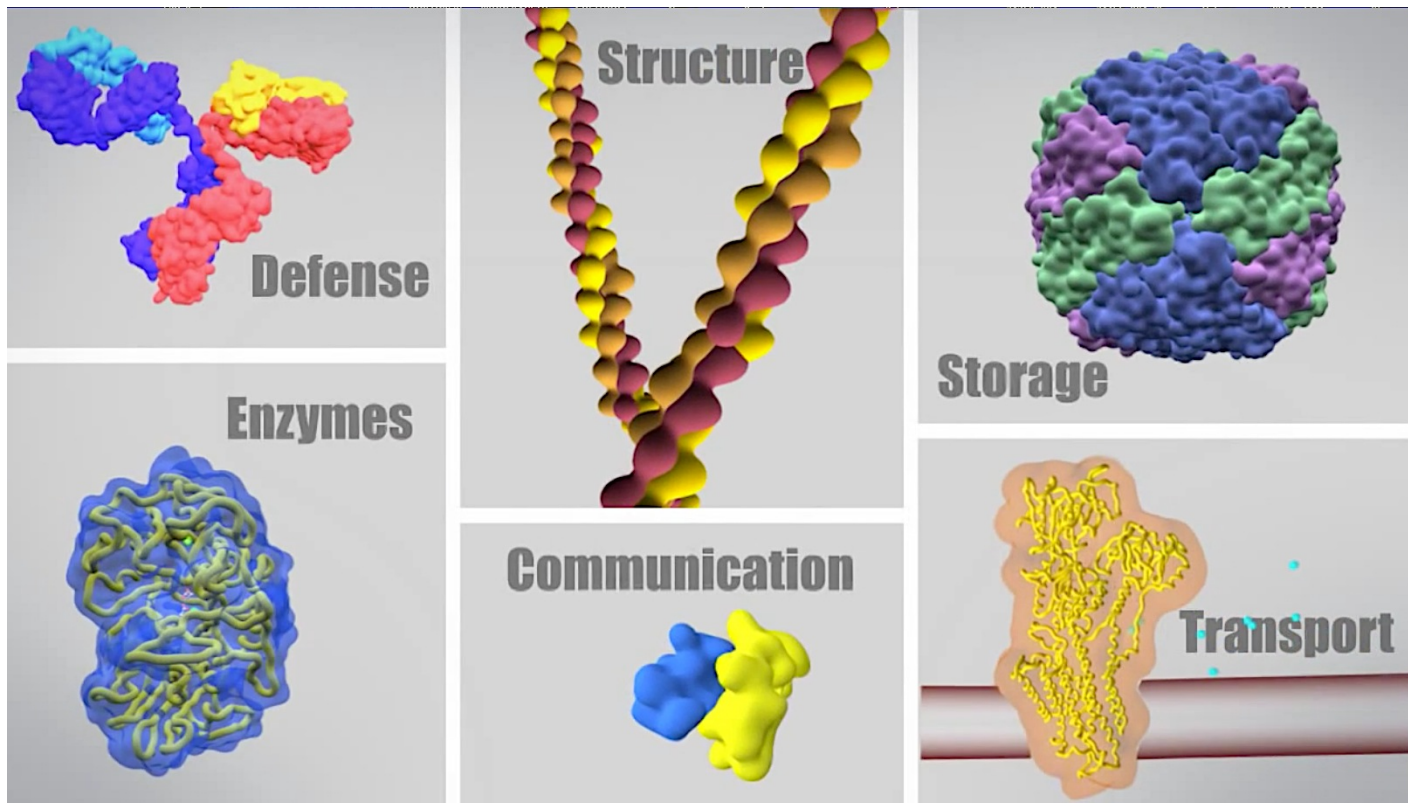
- zaporedje aminokislin v polipeptidni verigi
- položaj disulfidnih vezi



# Nivoji zgradbe proteinov

## I. Primarna struktura

- zaporedje aminokislin v polipeptidni verigi določa strukturo proteina in posledično njegovo funkcijo!

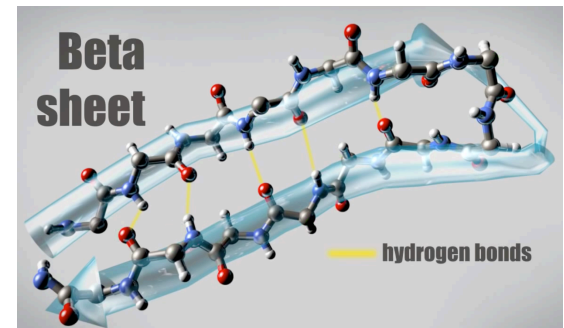
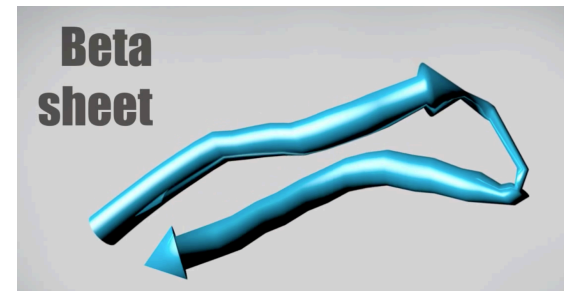
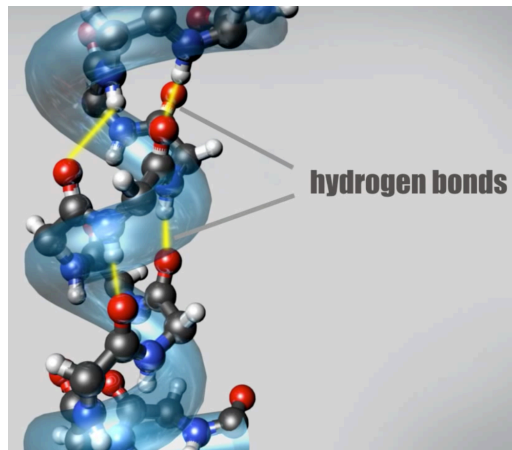
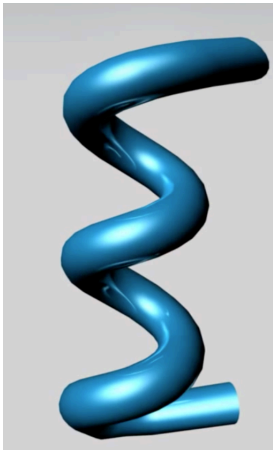




# Nivoji zgradbe proteinov

## II. Sekundarna struktura

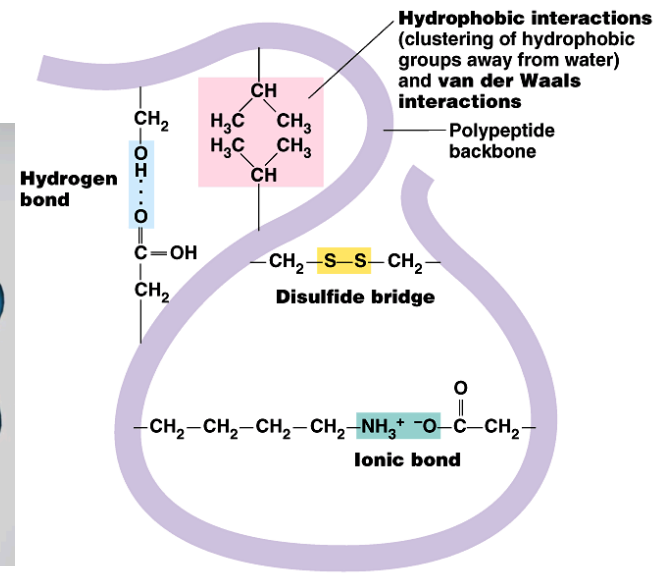
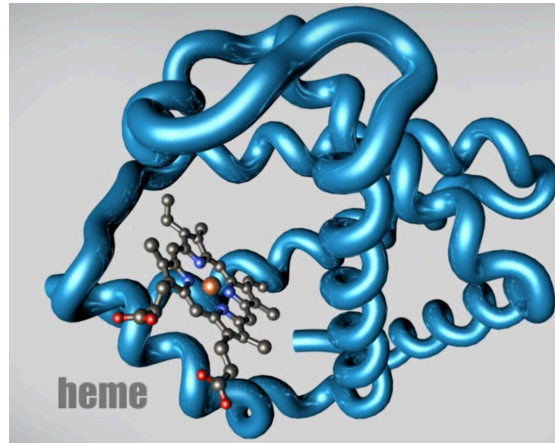
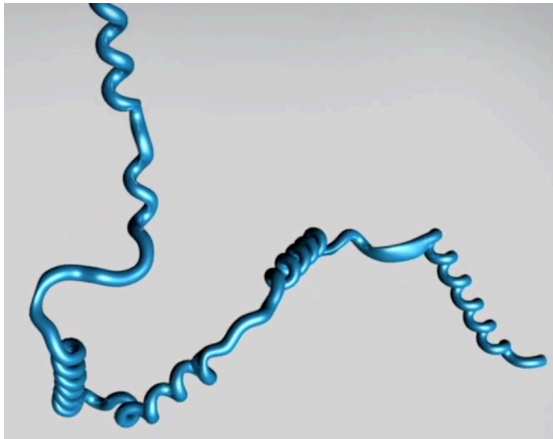
- urejene strukture
- H-vezi med karboksilnimi in aminskimi skupinami polipeptidnega ogrodja
- $\alpha$ - vijačnica,  $\beta$ -ploskev



# Nivoji zgradbe proteinov

## III. Terciarna struktura

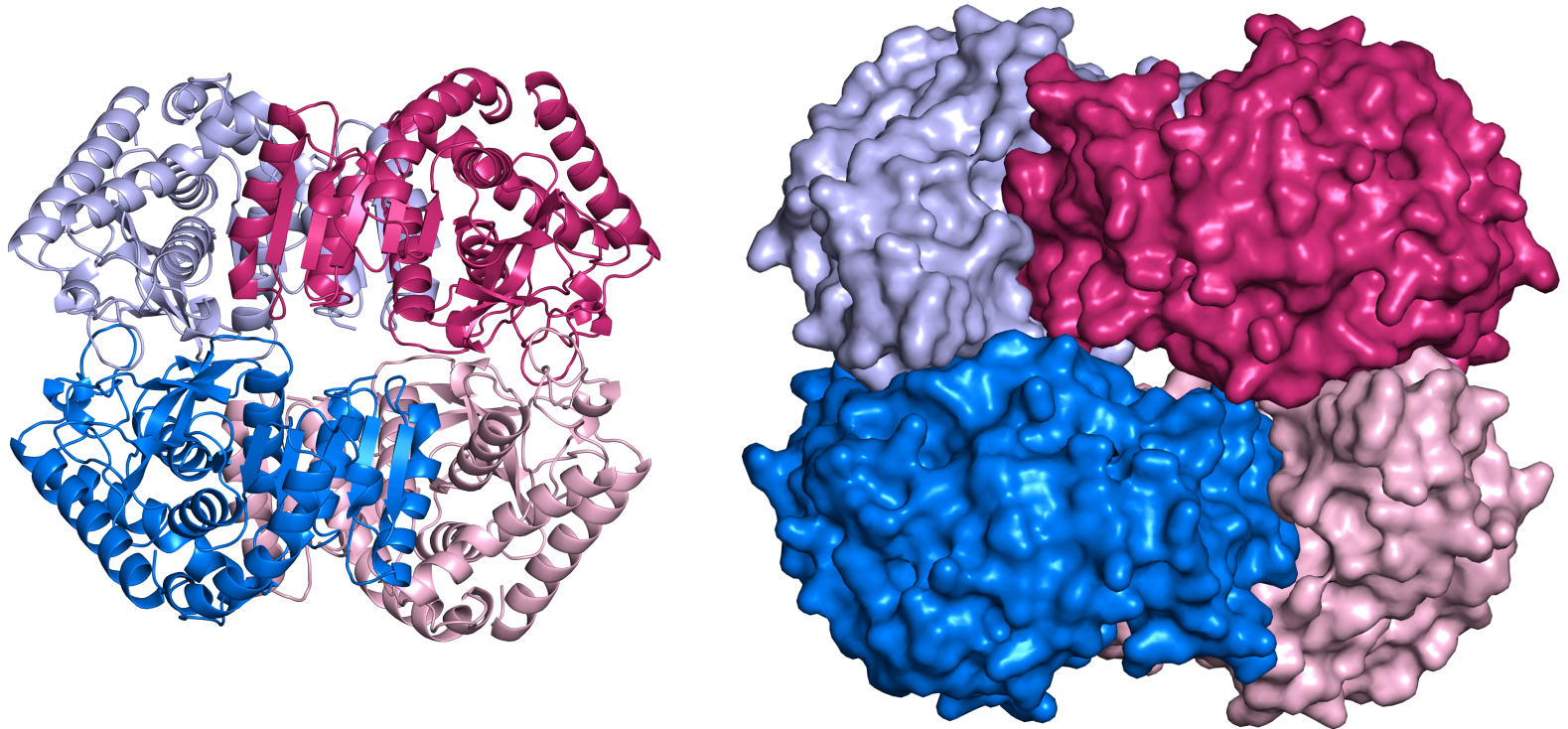
- položaj polipeptidne verige v prostoru
- stabilizacija strukture preko vezi, ki se tvorijo med stranskimi skupinami



# Nivoji zgradbe proteinov

## IV. Kvantarna struktura

- povezovanje več polipeptidnih verig v funkcionalni protein



laktat dehidrogenaza: tetramer

# Skupine na proteinu, ki ionizirajo

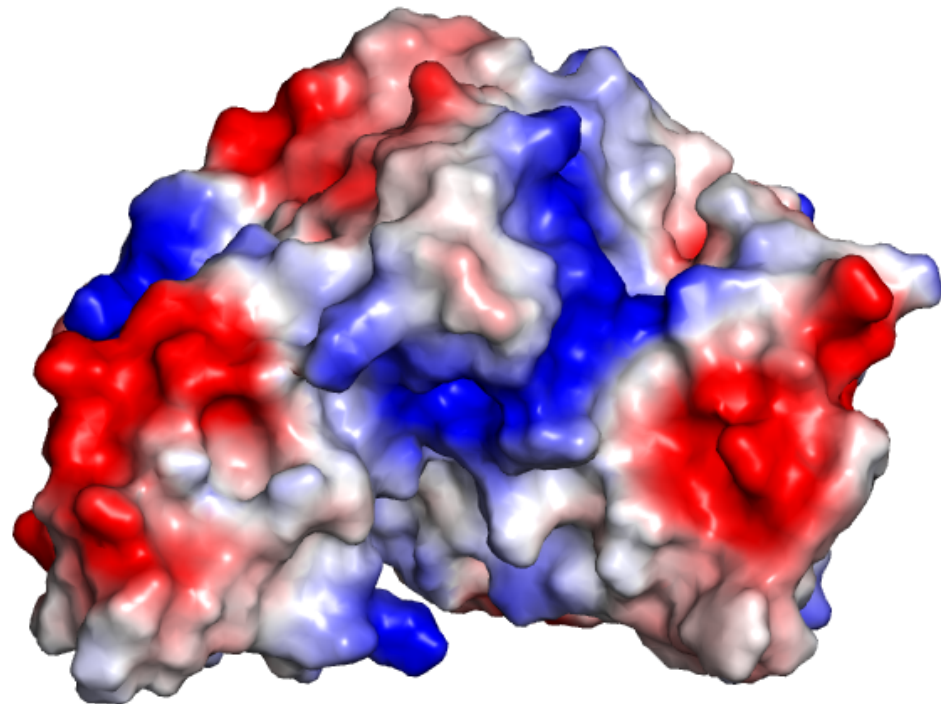
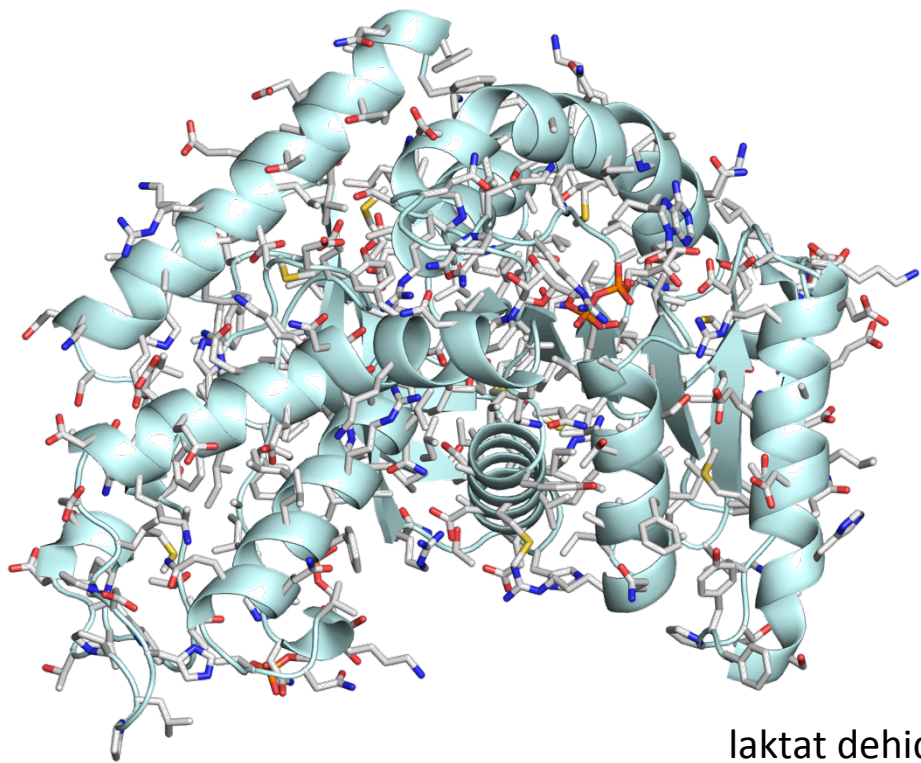
Table 8.2 **Ionisable groups found in proteins**

Amino acid group	pH-dependent ionisation	Approx. $pK_a$
N-terminal $\alpha$ -amino	$-\text{NH}_3 \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$	8.0
C-terminal $\alpha$ -carboxyl	$-\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^- + \text{H}^+$	3.0
Asp- $\beta$ -carboxyl	$-\text{CH}_2\text{COOH} \rightleftharpoons \text{CH}_2\text{COO}^- + \text{H}^+$	3.9
Glu- $\gamma$ -carboxyl	$-(\text{CH}_2)_2\text{COOH} \rightleftharpoons (\text{CH}_2)_2\text{COO}^- + \text{H}^+$	4.1
His-imidazolyl	$-\text{CH}_2 \begin{array}{c}   \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{HN}^+ \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N} \quad \text{NH} \end{array} \rightleftharpoons -\text{CH}_2 \begin{array}{c}   \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N} \quad \text{NH} \end{array} + \text{H}^+$	6.0
Cys-sulphydryl	$-\text{CH}_2\text{SH} \rightleftharpoons -\text{CH}_2\text{S}^- + \text{H}^+$	8.4
Tyr-phenolic	$\text{C}_6\text{H}_4\text{OH} \rightleftharpoons \text{C}_6\text{H}_4\text{O}^- + \text{H}^+$	10.1
Lys- $\epsilon$ -amino	$-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2 + \text{H}^+$	10.3
Arg-guanidino	$-\text{NH}-\text{C} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH}_2 \end{array} \rightleftharpoons -\text{NH}-\text{C} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH} \quad \text{NH}_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \end{array} + \text{H}^+$	12.5



# Naboj na površini proteina

- izoelektrična točka proteina (pI)
- neto naboj proteina = 0



laktat dehidrogenaza

# Postopki izolacije proteina

## izhodni material

- ☞ homogenizacija
- ☞ centrifugiranje

## proteini v raztopini

- ☞ obarjanje

## kromatografske metode

- ☞ gelska kromatografija
- ☞ ionska kromatografija
- ☞ afinitetna kromatografija

## koncentriranje

- ☞ ultrafiltracija
- ☞ liofilizacija

## ostale metode

- ☞ dializa
- ☞ elektroforeza

# Postopki izolacije proteina

## izhodni material

- ☞ homogenizacija
- ☞ centrifugiranje

## proteini v raztopini

- ☞ obarjanje

## kromatografske metode

- ☞ gelska kromatografija
- ☞ ionska kromatografija
- ☞ afinitetna kromatografija

## koncentriranje

- ☞ ultrafiltracija
- ☞ liofilizacija

## ostale metode

- ☞ dializa
- ☞ elektroforeza

- pri vseh stopnjah dela moramo biti pozorni na pogoje dela, da se ohrani biološka aktivnost proteina

- stabilnost proteinov

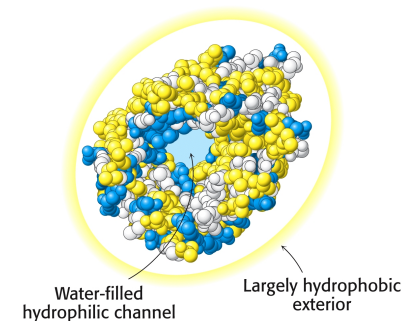
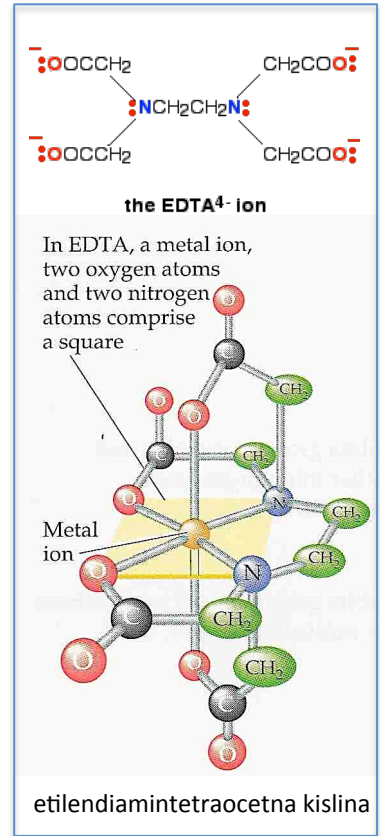
- pH
- T
- puferna raztopina
- ionska moč

- proteaze, nukleaze

- inhibitorji
- EDTA
- citrat

- membranski proteini

- detergenti





# Postopki izolacije proteina

## izhodni material

- ☞ homogenizacija
- ☞ centrifugiranje

## proteini v raztopini

- ☞ obarjanje

## kromatografske metode

- ☞ gelska kromatografija
- ☞ ionska kromatografija
- ☞ afinitetna kromatografija

## koncentriranje

- ☞ ultrafiltracija
- ☞ liofilizacija

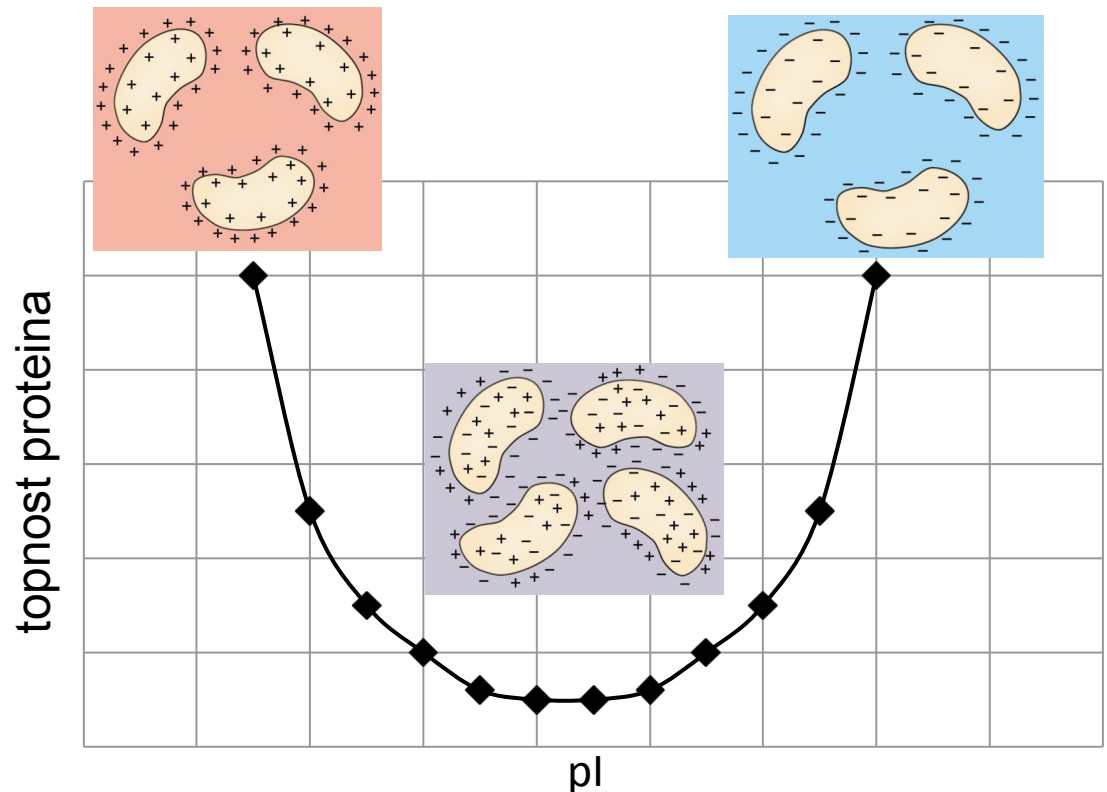
## ostale metode

- ☞ dializa
- ☞ elektroforeza

- proteini se razlikujejo glede na količino nabitih, polarnih in hidrofobnih ak
- nabite in polarne ak se na površini solvatirajo z vodnimi molekulami → protein je topen
- izoelektrično obarjanje
  - protein je najmanj topen v svoji pl
- s posebnimi pogoji lahko vplivamo na topnost proteina (protein oborimo, ga ne denaturiramo)
  - nevtralne soli
  - organskega topila
  - organski polimeri

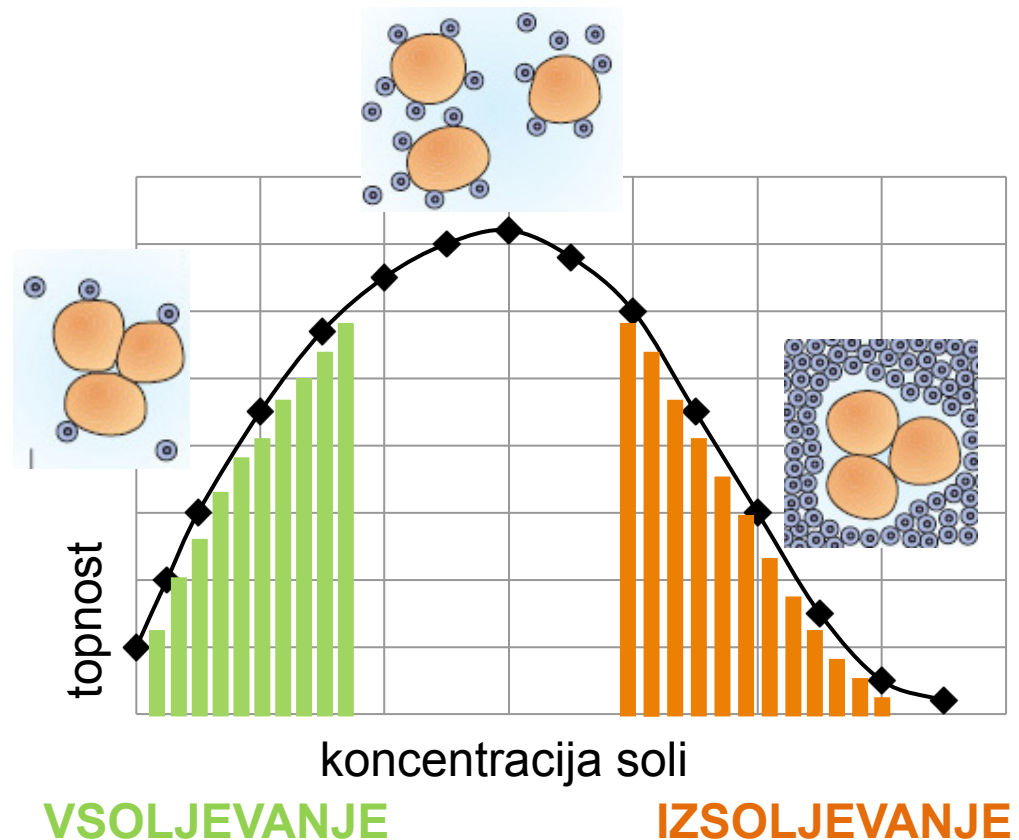
# Izoelektrično obarjanje

- izoelektrično obarjanje
  - protein je najmanj topen v svoji pl
  - pri enakem št. + in – nabojev so intermolekularni odboji med proteini minimalni
  - proteinom dovoljujejo interakcije med seboj tako, da se nasprotno nabiti deli povezujejo in tvorijo netopne agregate



# Obarjanje s soljo

- najpogosteje se uporablja amonijev sulfat
- izvaja se frakcionirano obarjanje
- tri faze:
  - vsoljevanje
    - sol je popolnoma solvatirana
  - topnost proteina
    - optimalno hidratacija soli in proteina
  - izsoljevanje
    - z naraščanjem konc. soli se hidrofobne površine na proteinu izpostavijo
    - ni proste vode, ki bi solvatirala sol
    - težnja po agregaciji se poveča, kar vodi do obarjanja
    - najprej se oborijo proteini, z veliko hidrofobne površine (večji proteini se oborijo pri nižjih konc. soli)



# Obarjanje z organskim topilom

- obarjanje temelji na različni topnosti proteinov v vodnih raztopinah organskih topil
  - etanol
  - aceton
  - butanol
- dodatek org. topila zmanjša dielektrično konstanto topila
  - vode za solvatacijo nabitih in polarnih skupin na površini proteina ni na razpolago
  - agregacija proteinov nastopi kot posledica ionskih interakcij
- obarjanje z organskimi polimeri PEG 6000-20000
- Ali z organskimi topili lahko na enak način oborimo membranske proteine? Zakaj?

# Postopki izolacije proteina

## izhodni material

- ☞ homogenizacija
- ☞ centrifugiranje

## proteini v raztopini

- ☞ obarjanje

## kromatografske metode

- ☞ gelska kromatografija
- ☞ ionska kromatografija
- ☞ afinitetna kromatografija

## koncentriranje

- ☞ ultrafiltracija
- ☞ liofilizacija

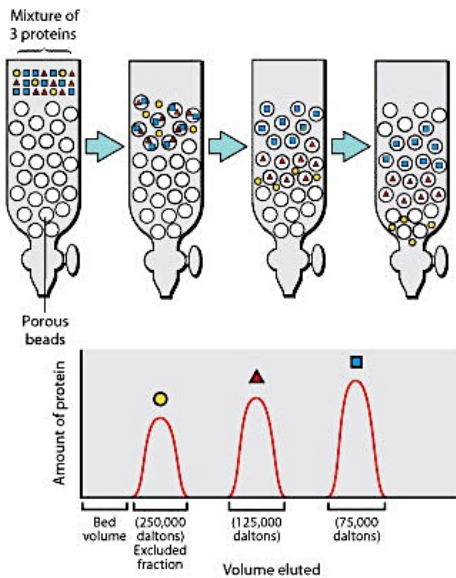
## ostale metode

- ☞ dializa
- ☞ elektroforeza

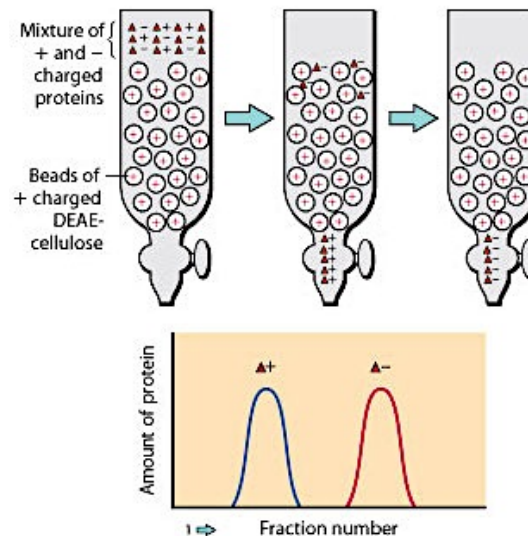
# Kromatografije

- Osnova vseh kromatografij je porazdelitev analita znotraj dveh različnih faz.
- Kolonska kromatografija se običajno sestoji iz
  - stacionarne faze (v stekleni/kovinski koloni)
  - mobilne faze (mešanica analitov, ki potuje skozi stacionarno fazo)
  - zbiranje posameznih frakcij tekom ločbe
  - detekcija vsebine frakcij
    - merjenje absorbance A280
    - encimski testi
    - elektroforetsko

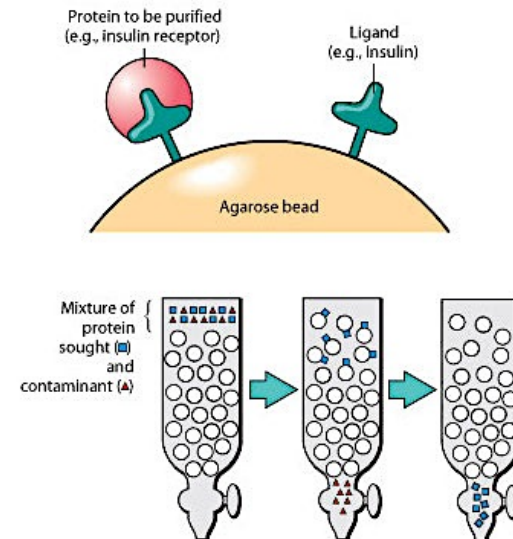
## gelska kromatografija



## ionska kromatografija



## afinitetna kromatografija



# Postopki izolacije proteina

## izhodni material

- ☞ homogenizacija
- ☞ centrifugiranje

## proteini v raztopini

- ☞ obarjanje

## kromatografske metode

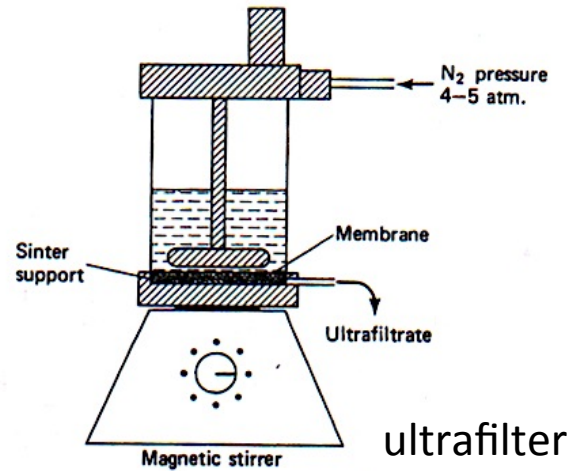
- ☞ gelska kromatografija
- ☞ ionska kromatografija
- ☞ afinitetna kromatografija

## koncentriranje

- ☞ ultrafiltracija
- ☞ liofilizacija

## ostale metode

- ☞ dializa
- ☞ elektroforeza



ultrafilter



liofilizator



# Postopki izolacije proteina

## izhodni material

- ☞ homogenizacija
- ☞ centrifugiranje

## proteini v raztopini

- ☞ obarjanje

## kromatografske metode

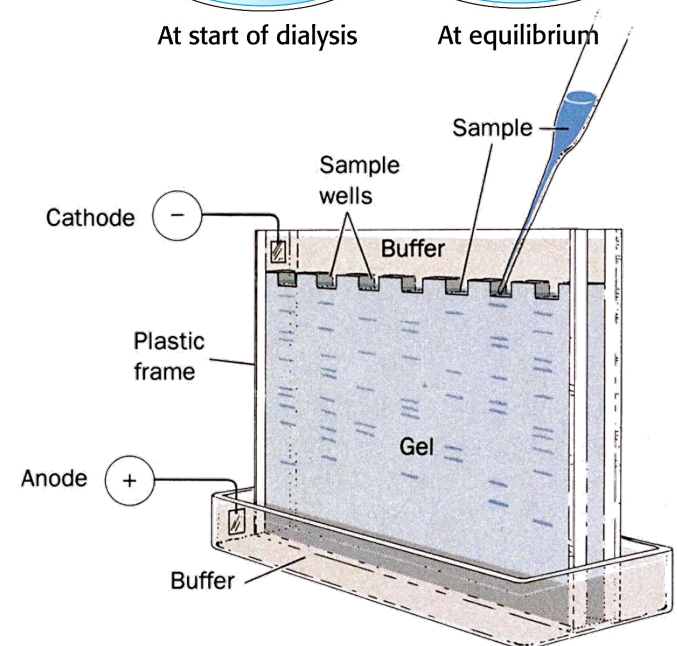
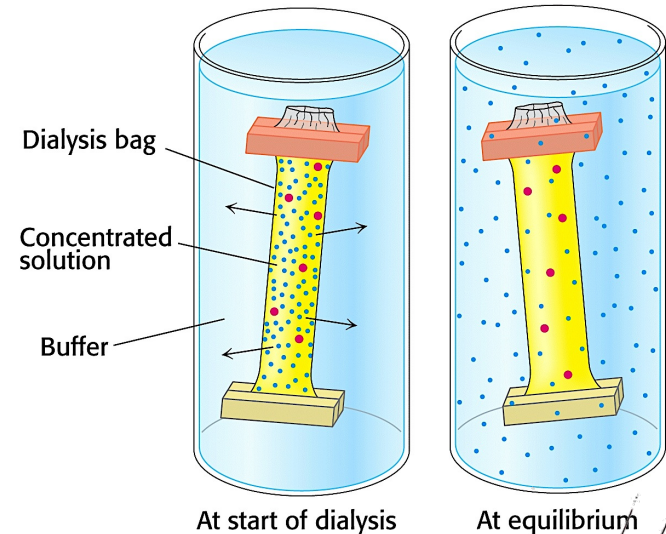
- ☞ gelska kromatografija
- ☞ ionska kromatografija
- ☞ afinitetna kromatografija

## koncentriranje

- ☞ ultrafiltracija
- ☞ liofilizacija

## ostale metode

- ☞ dializa
- ☞ elektroforeza



## 2. vaja

- homogenizacija goveje vranice
- centrifugiranje
- prva stopnja čiščenja želenega proteina s frakcioniranim obarjanjem z amonijevim sulfatom
- dializa