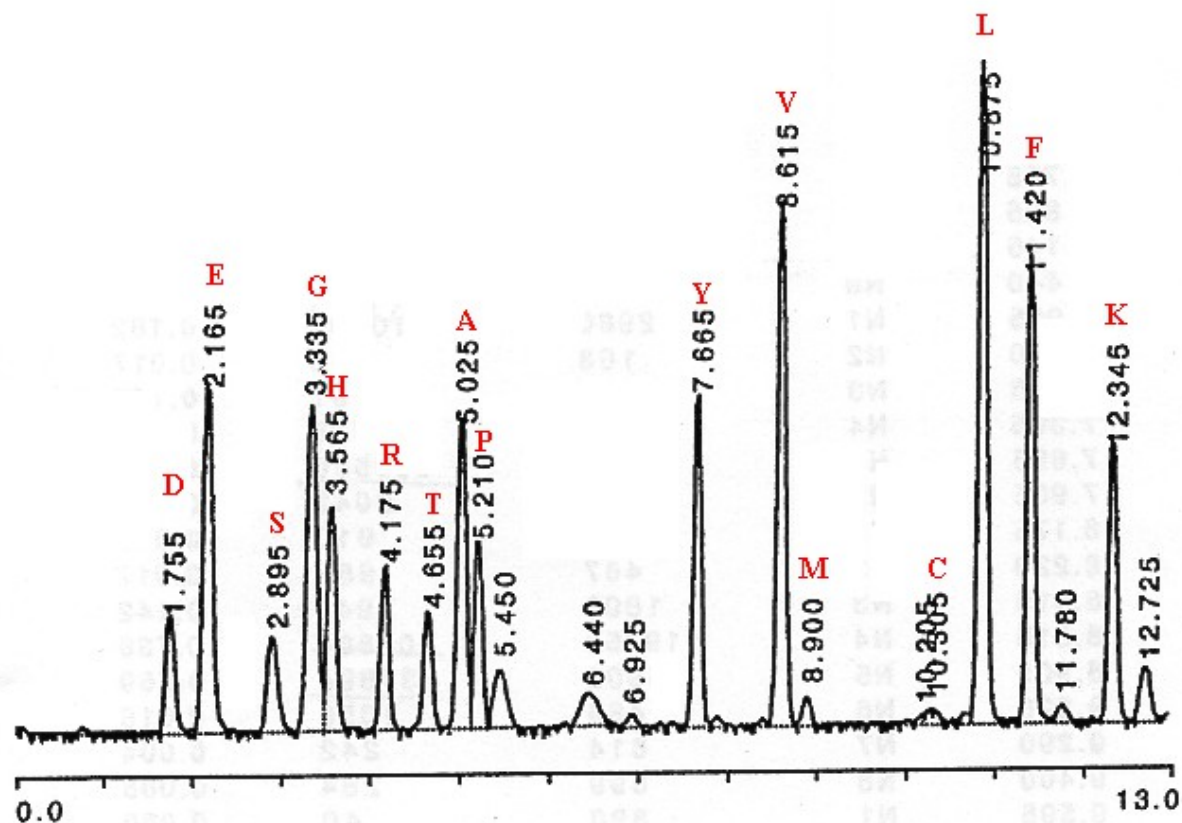


AK	površina	površina st	p mol AK	Mr(prot)	m(AK)[g]		
D	158283	171003	2,3140E-10	115,1	2,66E-08	1,2	1
E	473816	167247	7,0826E-10	129,1	9,14E-08	3,5	3
S	159654	177814	2,2447E-10	87,1	1,96E-08	1,1	1
G	527553	178308	7,3967E-10	57,1	4,22E-08	3,7	4
H	298730	157400	4,7448E-10	137,1	6,51E-08	2,4	3
R	185454	187881	2,4677E-10	156,2	3,85E-08	1,2	1
T	146704	143088	2,5632E-10	101,1	2,59E-08	1,3	1
A	377655	178154	5,2996E-10	71,1	3,77E-08	2,6	3
P	230394	199425	2,8882E-10	97,1	2,80E-08	1,4	1
Y	353566	195864	4,5129E-10	163,2	7,37E-08	2,3	2
V	600824	196431	7,6468E-10	99,1	7,58E-08	3,8	4
M	31894	209023	3,8147E-11	131,2	5,00E-09	0,2	0
C	27449	141375	4,8539E-11	103,1	5,00E-09	0,2	0
I	0	188997	0,0000E+00	0	0,00E+00	0,0	0
L	792113	188593	1,0500E-09	113,2	1,19E-07	5,2	5
F	528429	170978	7,7266E-10	147,2	1,14E-07	3,9	4
K	309774	295785	2,6182E-10	128,2	3,36E-08	1,3	1
				m(prot)	8,00695E-07 g		
c(st) 2,50E-10 mol/L				n(prot)	2,00174E-10 mol		



POROČILO: 3 in 4. vaja – Priprava proteinskega vzorca za sekvenčno analizo in aminokislinska analiza – Fragmentacija proteinov in analiza nastalih produktov

Vaje iz predmeta: Struktura proteinov

Namen dela:

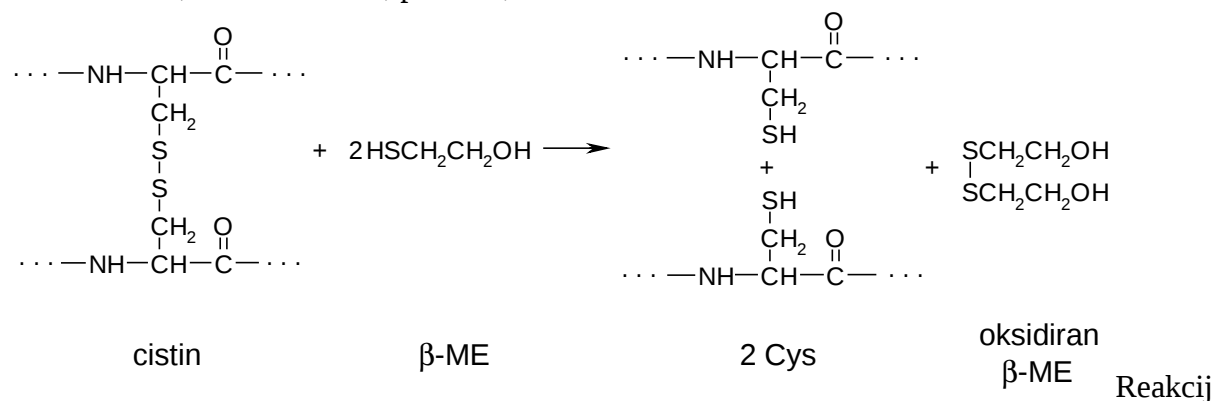
- denaturacija in redukcija ter alkiliranje proteina z natrijevim jodacetatom
- ločitev s RF-HPLC
- cepitev s tripsinom
- cepitev z proteinazo *Staphylococcus aureus* V-8
- cepitev CNBr
- analiza s RF-HPLC

Metode in delo:

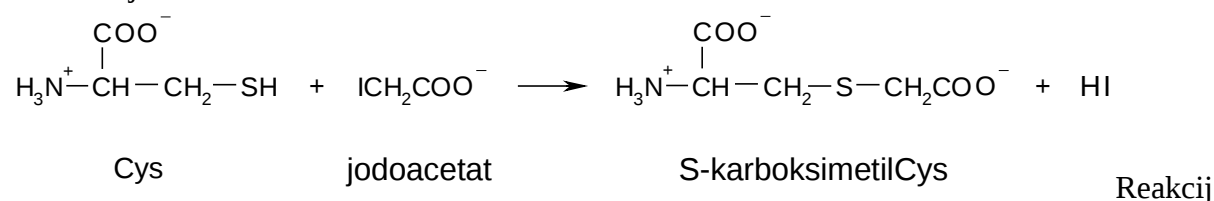
- denaturacija, redukcija in alkiliranje proteina z natrijevim jodacetatom
 - Raztopi protein v 600L v denaturacijskem pufru*
 - Dodaj 20L β -ME
 - Premešaj, prepričaj z Ar in inkubiraj 60min pri 37 °C
 - Ohladimo na sobno T in centrifugiraj 2min (14000rpm)
 - Dodamo v temi 100L Na jodoacetata v 0.5M Tris/HCl, pH 8.25
 - Prepričamo z Ar in inkubiramo 30 min
 - Reakcijo prekinemo z 20L β -ME

Protein liofiliziramo

* 6M GvHCl, 0.5M Tris/HCl, pH 8.25, 2mM EDTA



a redukcije:



a alikiliranja:

- razgradnja s tripsinom

Protein raztopimo v 2000L 0.1M N-metil morfolin acetatnega pufru pH 8,1.
 Raztopini dodaj 10L tripsina in inkubiraj pri 37 °C

Inkubacija 30 min prekinitev
 reakcije z 5000L 0,1% TFA
 Inkubacija 10 min prekinitev
 reakcije z 5000L 0,1% TFA
 Ločitev z RF-HPLC

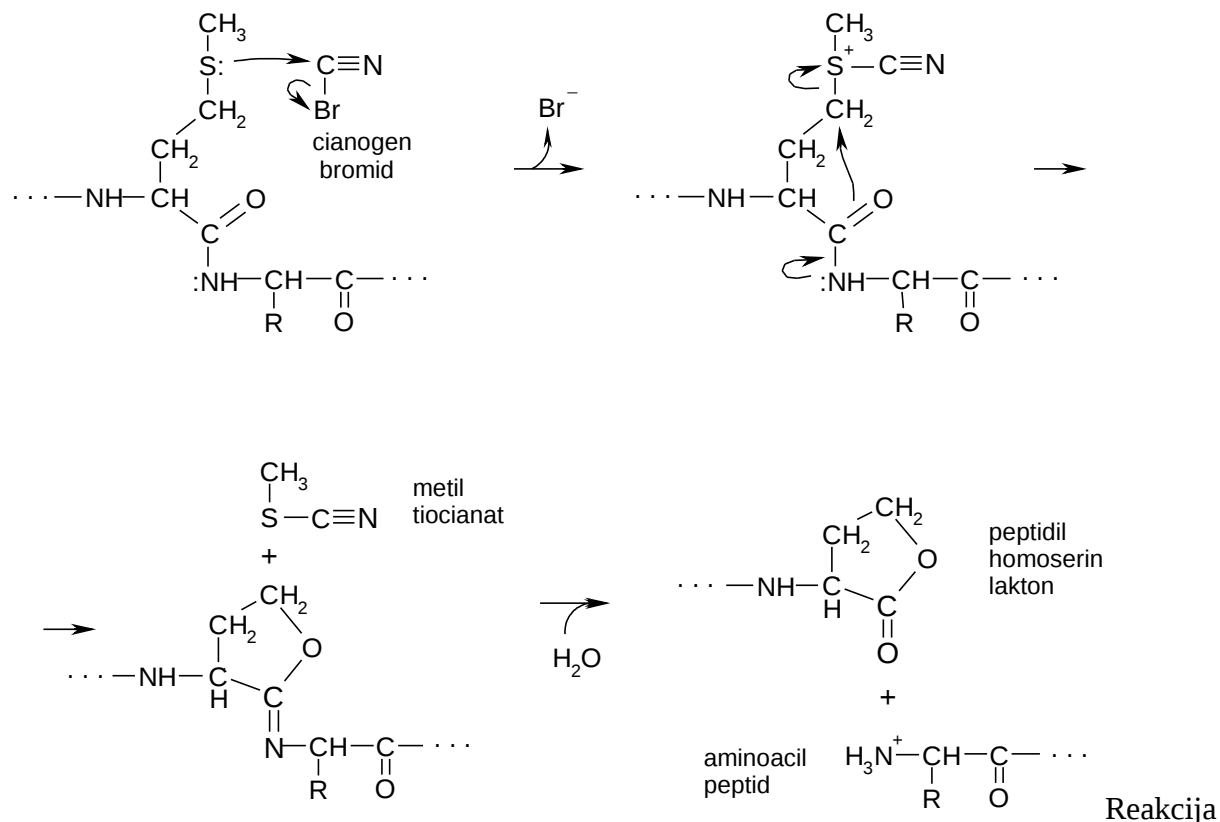
- razgradnja s proteinazo *Staphylococcus aureus* V-8

Protein raztopimo v 2000L 0.1M amon acetatnega pufru pH 4,0.
 Raztopini dodaj 20L proteinaze *S.aureus* V-8 in inkubiraj pri 37 °C 90 min

Prekinitvev reakcije z 500 μ L 0,1% TFA in ločitev fragmentov s RF-HPLC

- razgradnja s CNBr

Raztopi protein v 100 μ L 80% metanojske kisline
 Dodaj 1 μ L β -ME in 1mg CNBr
 Premešaj in centrifugiraj
 Inkubiraj v temi 24h pri 37 $^{\circ}$ C
 Prekini reakcijo z 500 μ L vode
 Protein liofiliziraj



CNBr cepitve:

- HPLC

HPLC pripravimo že ko nastavimo cepitev
 Naravnati pretok, A(215), gradient
 Proteinu dodaj 500 μ L topila A, centrifugiraj
 Nanesi vzorec, spiraj nečistoče
 Prični z elucijo in zbiraj frakcije

Rezultati in diskusija:

Pri naslednjem poročilu, ko bomo imeli rezultate iz gelov. Do sedaj imamo samo razgrajen protein in liofiliziran v epicah. Edino, kar bi se dalo komentirati je koliko vrhov je bilo pri HPLC, kar pa ne vemo natančno za vsak način razgradnje, ker nimamo izpisa od HPLC-ja.

Odgovori na vprašanja:

13.

$$\rho = 1,115 \text{ g / mL}$$

$$M_r = 78,13 \text{ g / mol}$$

$$V = 2,0 \mu\text{L}$$

$$m = \rho \cdot V = 1,115 \text{ g / mL} \cdot 0,002 \text{ mL}$$

$$m = 0,00223 \text{ g}$$

$$n = m / M = 0,00223 \text{ g} / 78,13 \text{ g / mol} = 2,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$$

16.

17. Za določitev Trp v proteinu lahko uporabimo 6M HCl in 0.5-6% tioglikolično kislino ali 3M p-toluen-sulfonsko kislino ali 3M merkaptotansulfonska kislino. Vse inkubiramo pri 110 °C v vakuumu vsaj 24h.

18. Za sekvenčno analizo je bolj primeren derivat s 4-vinil piridinom, ker je modifikacija s tem reagentom kvantitativna in specifična. Derivat je stabilen pri sekvenčni analizi in skupina ki jo uvedemo absorbira pri 254 nm.

19. Cys bi modificiral z aziridinom (etileniminom).

20. Ker ima naš protein pI 9, bi če bi želeli dobiti več peptidov izbrali bolj bazično proteinazo (tripsin), če pa bi želeli manj peptidov, bi izbrali kislno proteinazo (*S.aureus* V-8).