

Osnove biokemije

Seminar 4.

Točni odgovori zadaće 3. (11.3.2014.)

1.	D	11.	D
2.	B	12.	C
3.	C	13.	C
4.	C	14.	D
5.	A	15.	B
6.	D	16.	A
7.	C	17.	B
8.	A	18.	D
9.	B	19.	B
10.	C	20.	D

1. Proteini topljivi u vodi, kao što je to mioglobin:
 - a) Imati će hidrofobne bočne aminokiselinske ostatke u unutrašnjosti proteina, a hidrofilne bočne aminokiselinske ostatke na vanjskoj strani molekule;
 - b) Imati će hidrofilne bočne aminokiselinske ostatke u unutrašnjosti, a hidrofobne aminokiselinske ostatke na vanjskoj strani molekule;
 - c) Protein će se nabrati na taj način da sve njegove peptidne veze stvaraju vodikove veze s vodom.

2. U proteinima, α -uzvojnice i β -nabrane ploče često su amfipatične strukture. To znači:
 - a) Ove strukture imaju pozitivne naboje na jednoj strani, a negativne naboje na suprotnoj strani.
 - b) Ove strukture imaju velike bočne aminokiselinske skupine na jednoj strani, a male bočne aminokiselinske skupine na suprotnoj strani kako bi se lakše nabirale u unutrašnjost proteina.
 - c) Ove strukture imaju jednu stranu koja je pretežno polarna i suprotnu stranu koja je pretežno hidrofobna.

3. Bitan zaključak iz C. Anfinsenovog pokusa s ribonukleazom je:
 - a) Informacija na koji će se način protein nabrati (strukturirati) sadržana je u aminokiselinskom slijedu proteina.
 - b) Denaturacijom protein gubi enzimsku aktivnost.
 - c) Protein se može ponovno ispravno nabrati u nativnu strukturu ukoliko mu nisu razorene disulfidne veze.

4. Nabiranje proteina često se opisuje kao kooperativan proces. To znači:
 - a) Za nabiranje proteina potrebna je kooperacija drugih proteina.
 - b) Nabiranje proteina je vrlo specifičan proces (sve ili ništa).
 - c) Protein se ispravno nabire samo ako je u okolišu koji je identičan ekstracelularnom okolišu.

5. Protein ste eluirali sa stupca anionskog, DEAE (dietilaminoetil-), izmjenjivača pomoću pufera koji je sadržavao sol (NaCl). Prije nego što odredite aktivnost proteina, sol se mora ukloniti iz uzorka budući da interferira s Vašim testom. Kojom metodom nećete ukloniti sol iz uzorka?

- a) Propuštanjem uzorka kroz stupac karboksimetil celuloze;
- b) Propuštanjem uzorka kroz gel-filtracijsku kolonu;
- c) Dijaliziranjem uzorka.

6. SDS poliakrilamidna elektroforeza (s puferom koji sadrži merkaptoetanol) može se koristiti za sljedeće:

- a) Određivanje molekulske mase oligomernog proteina (proteina s više podjedinica)
- b) Određivanje molekulskih masa podjedinica nekog oligomernog proteina.
- c) Pročistiti monomerni protein a da se pri tome zadrži njegova enzimaska aktivnost.

7. Kojom se od navedenih metoda ne može odrediti trodimenzionalna struktura proteina?

- a) Analitičkim centrifugiranjem;
- b) Nuklearnom magnetnom rezonancijom (NMR);
- c) Rendgenskom strukturnom analizom.

8. Što je točno o masenoj spektrometriji?

- a) Uzorci moraju biti vrlo čisti;
- b) Proteini moraju biti obilježeni radiaktivnim izotopima;
- c) Ova se metoda koristi za određivanje proteoma.

9. Prilikom sekvenciranja proteina potrebno je raskinuti disulfidne veze. Reagens pomoću kojeg se to postiže je:

- a) Gvanidin-hidroklorid;
- b) Jodoacetat;
- c) Merkaptoetanol.

10. Koji je točan navod za određivanje trodimenzionalne strukture proteina?
- a) Rendgenskom strukturnom analizom dobiva se precizni (dobra rezolucija) raspored atoma u proteinu.
 - b) NMR je pogodniji od rendgenske strukturne analize budući da se ovom metodom mogu odrediti strukture proteina šireg raspona molekulskih masa.
 - c) Ograničenja obih tehnika su identična.
11. Pomoću fenilzotiocijanata, ključnog reagensa u Edmanovoj razgradnji, moguće je:
- a) Samo (isključivo) identificirati N-krajeve aminokiselina.
 - b) Uklanjati i identificirati po jednu aminokiselinu u svakom koraku.
 - c) Održavati protein u ne-nabranom (denaturiranom) stanju tijekom sekvenciranja.

12. Ispitivanjem aminokiselinskog sastava peptida dokazano je da peptid sadrži 10 Lys, 5 Arg i 3 Met. Kada je peptid tretiran s CNBr, izolirana su 4 peptida. Kada je tretiran s tripsinom, izolirano je 15 peptida. Što nam to sugerira o strukturi peptida?
- a) Peptid ima Lys ili Arg na C-kraju.
 - b) Peptid ima Lys ili Met na C-kraju
 - c) Peptid ima cikličku strukturu te nema slobodne niti N- niti C-krajeve.
13. Koja je razlika između monoklonskih i poliklonskih protutijela?
- a) Monoklonska protutijela dobivaju se cijepjenjem životinja samo s jednim antigenom, dok se poliklonska protutijela dobivaju cijepjenjem životinja sa smjesom antigena.
 - b) Monoklonska protutijela raspoznavaju samo dio molekule antigena (jedan epitop), dok poliklonska protutijela raspoznavaju različite dijelove molekule antigena (nekoliko epitopa).
 - c) Monoklonska protutijela neznatno se razlikuju po slijedu aminokiselina, dok je slijed aminokiselina u poliklonskim protutijelima identičan.

14. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) enzimski imunokemijski testovi koriste se u biokemiji budući da:
- a) Zasnivaju se na specifičnom vezanju supstrata za enzim.
 - b) Koriste se za detekciju vrlo malih količina specifičnog analita (antigena).
 - c) Koriste se za raspoznavanje protutijela i enzima pri čemu nastaje obojenje.

Zadatak 1.

Proteini su stabilne molekule. Životni vijek peptidne veze u vodenoj otopini stabilan je gotovo tisuću godina. Međutim, slobodna energija hidrolize proteina je negativna i relativno velika vrijednost. Kako možete objasniti stabilnost peptidne veze budući da se njezinom hidrolizom oslobađa velika količina energije?

Rješenje zadatka 1.

- Energetska barijera koja se mora prijeći, kako bi protein iz polimeriziranog stanja prešao u hidrolizirano stanje (smjesu aminokiselina) je velika, iako je sama reakcija energetski povoljna.

Zadatak 2.

Poli L-leucin u organskom otapalu je α -uzvojnica, dok poli-L-izoleucin to nije. Zbog čega aminokiseline koje su izgrađene od jednakog broja C-atoma i jednakih funkcionalnih skupina imaju tendencije stvaranja različitih konformacija?

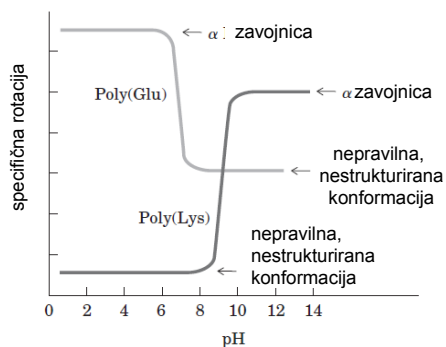
Rješenje zadatka 2.

Metilna skupina na β -C atomu Ile sterički interferira s nastajanjem α -uzvojnice. U leucinu, metilna skupina vezana je za γ -C atom, što je na većoj udaljenosti od osnovnog (peptidnog) lanca pa time sterički ne sputava nastajanje α -uzvojnice.

Zadatak 3.

Razaranje strukture α -uzvojnice, tj. prijelazom iz konformacije α -uzvojnice u nepravilnu, nestrukturiranu konformaciju, dovodi do smanjenja specifične rotacije, mjere kojom se u otopini mjeri sposobnost otopljene tvari da zakreće ravninu polarizirane svjetlosti. Poli-Glu, peptid izgrađen od L-Glu, ima strukturu α -uzvojnice pri pH 3. Kada se pH poveća na pH 7, dolazi do smanjenja specifične rotacije. Slično, poli-Lys (polimer L-Lys) ima konformaciju α -uzvojnice pri pH=10, ali snižavanjem pH na pH 7, specifična rotacija se također smanjuje.

Zadatak 3 nastavak



Koje je objašnjenje da promjenom pH dolazi do promjena konformacija poli-Glu i poli-Lys? Zbog čega dolazi do ove promjene u tako uskom pH području?

Rješenje zadatka 3.

Kod pH većeg od pH 6, deprotoniraju se bočne aminokiselinske skupine u poli-Glu te sve karboksilne skupine postaju jako negativne i dolazi do međusobnog odbijanja ovih skupina, a time se narušava i konformacija α -uzvojnice. Slično je i s poli-Lys, budući da snižavanjem pH dolazi do protoniranja bočnih skupina aminokiselina, te one postaju pozitivno nabijene što uzrokuje da se pozitivno nabijene skupine međusobno odbijaju.

Zadatak 4.

Oblik kose (kovrče ili ravna kosa) određen je rasporedom disulfidnih skupina u keratinu, glavnom proteinu iz kojeg je izgrađena kosa. Na koji se način kovrče mogu izgubiti ili se mogu dodatno stvarati?

Rješenje zadatka 4.

Disulfidne veze u kosi reduciraju se dodavanjem reagensa koji sadrže tiolne skupine a procesu pomaže i toplina. Kosa se kovrča stvaranjem disulfidnih veza, a to znači dodatkom oksidansa dolazi do ponovnog stvaranja disulfidnih veza, a time i kovrča.

Zadatak 5.

Znanje kako se nabiru proteini omogućuje nam da predviđamo strukturu proteina iz njegovog aminokiselinskog slijeda. Iz strukture:

Ile-Ala-His-Thr-Tyr-Gly-Pro-Phe-Glu-Ala-Ala-Met-Cys-Lys-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
-Trp-Glu-Ala-Gln-Pro-Asp-Gly-Met-Glu-Cys-Ala-Phe-His-Arg
15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Što možete zaključiti?

- Gdje dolaze β -okreti (zavoji)?
- Gdje su moguće disulfidne veze?
- Uz pretpostavku da je ova sekvenca dio većeg globularnog proteina pretpostavite lokacije (vanjski dio ili unutrašnjost proteina) sljedećih aminokiselina: Asp, Ile, Ala, Thr, Glu, Lys. Obrazložite!

Rješenje zadatka 5.

- Okreti i petlje vjerojatno bi nastali kod a.k. 6, 7, te 19,21 budući da su Pro i Gly često nađeni u okretima globularnih proteina. Okret može nastati i kod Thr (4) a uz pretpostavku da je to dio većeg proteina okret može nastati i kod Ile ostatka (1).
- Disulfidni mostovi unutar strukture mogu nastati samo između ostataka 13 i 24.
- Aminokiseline s ionskim (nabijenim) ili jako polarnim neutralnim skupinama (Asp, Glu i Lys,) biti će smještene na vanjskoj strani proteina, dok će bočne skupine nepolarnih aminokiselina (Ala, Ile) biti smještene u hidrofobnu unutrašnjost proteina. Thr, aminokiselina koja ima srednju vrijednost polarnosti, može se naći ili na vanjskoj strani strukture proteina ili pak u njegovoj unutrašnjosti.

Zadatak 6.

- a) Zbog čega se proteini precipitiraju (talože) kod visokih koncentracija soli?
- b) Iako mnogi proteini precipitiraju kod visokih koncentracija soli, nekim proteinima potrebna je sol kako bi se otopili u vodi. Objasnite zašto je proteinima potrebna sol kako bi se otopili.
- c) Koje će vrste bočnih skupina (R) kompetirati s ionima soli za molekule vode tijekom otapanja?

Zadatak 6.-rješenje

- a) Ioni soli reagiraju s molekulama vode (plašt molekula vode oko svakog iona). Na kraju nema dovoljno molekula vode koje će stvarati plašt vode oko proteina, te protein precipitira.
- b) Ukoliko nema dovoljno soli u otopini proteina, proteinski lanci mogu međusobno reagirati – pozitivni ioni na jednom proteinu reagirat će s negativnim nabojima drugog (ili drugih) proteina te ovi agregati postaju prevelikima da bi se otopili u čistoj vodi. Ako se doda sol, sol će neutralizirati naboje na proteinu te će biti sprječena interakcija protein-protein.
- c) S ionima soli kompetirat će nabijene i polarne R skupine koje se nalaze na površini proteina.

Zadatak 7.

Detergent natrijev dodecilsulfat (SDS) denaturira proteine.
Obrazložite kako SDS razara strukturu proteina.

Zadatak 7.-rješenje

Dugački hidrofobni krajevi molekule SDS raskidaju hidrofobne interakcije u unutrašnjosti proteina. Zbog toga se protein odmata te hidrofobne R skupine reagiraju s SDS a ne međusobno.

Zadatak 8.
(dovršite tablicu!) -

postupak	Ukupni proteini (mg)	Ukupna aktivnost (jedinice)	Specifična aktivnost (jedinica x mg ⁻¹)	Faktor purifikacije	Iskorištenje (%)
Homogenat stanice	20 000	4 000 000		1	100
Taloženje s (NH ₄) ₂ SO ₄	5000	3 000 000			
DEAE-celuloza	1500	1 000 000			
Gel filtracija	500	750 000			
Afinitetna kromatografija	45	675 000			

Zadatak 8.-rješenje

postupak	Ukupni proteini (mg)	Ukupna aktivnost (jedinice)	Specifična aktivnost (jedinica x mg ⁻¹)	Faktor purifikacije	Iskorištenje (%)
Homogenat stanice	20 000	4 000 000	200	1	100
Taloženje s (NH ₄) ₂ SO ₄	5000	3 000 000	600	3	75
DEAE-celuloza	1500	1 000 000	667	3,3	25
Gel filtracija	500	750 000	1500	7,5	19
Afinitetna kromatografija	45	675 000	15000	75	17

Zadatak 9.

Proteini koji su tretirani sa sulfhidrilnim reagensom, kao što je npr. β -merkaptoetanol, te otopljeni u natrijevom dodecilsulfatu imaju jednaki omjer naboj/masa. Objasnite!

Zadatak 9.-rješenje

U prosjeku, molekula SDS se veže na po dvije aminokiseline u proteinu te zbog toga proteini u osnovi imaju jednaki omjer naboj/masa. Npr. protein s 200 aminokiselinskih ostataka vezat će 100 molekula SDS, dok će protein izgrađen od 400 aminokiselina vezati 200 molekula SDS. Kako je prosječna masa aminokiselina u proteinu 110, a molekula SDS ima jedan negativan naboj, to će omjer naboj/masa u oba proteina biti jednak, tj. 0,0045.

Ovo objašnjenje može biti netočno za protein koji je izgrađen od mnogobrojnih negativno nabijenih aminokiselina ili ukoliko protein ima mnogobrojne npr. fosforilirane aminokiseline.

Zadatak 10.

Nakon taloženja proteina, 1 mL vašeg uzorka sadži 1 mol dm^{-3} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kako bi djelomično uklonili amonijev sulfat, 1 mL uzorka dijalizirate u 1 dm^{-3} pufera. Na kraju dijalize, kolika je koncentracija $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u uzorku. Kako bi mogli dodatno umanjiti koncentraciju amonijevog sulfata u uzorku?

Zadatak 10.-rješenje

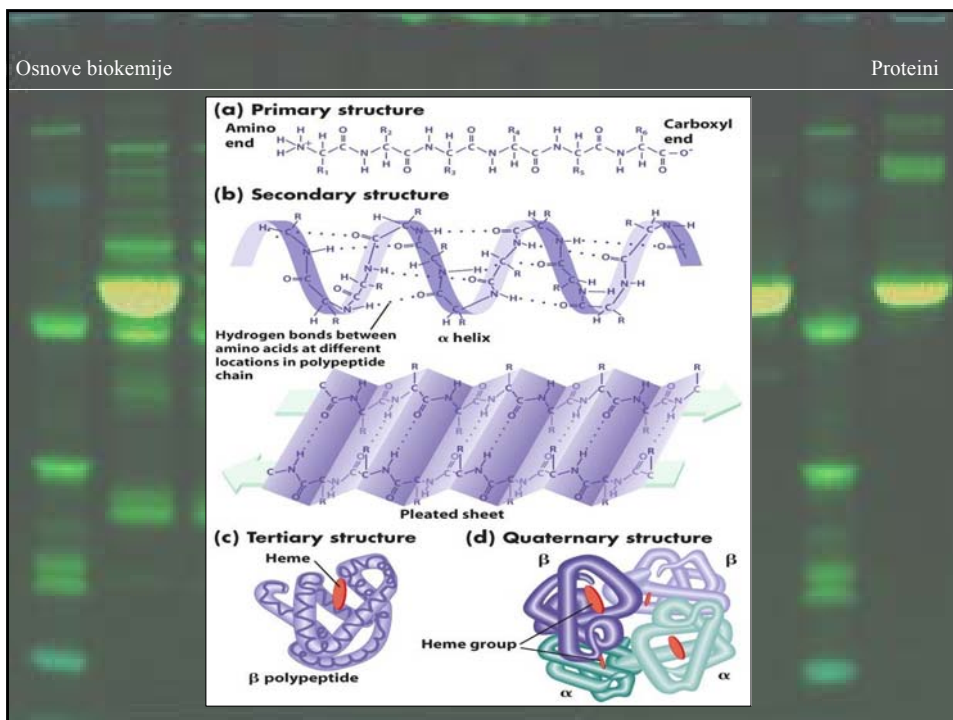
Na kraju dijalize, koncentracija amonijevog sulfata i u puferu u kojem je uzorak i u uzorku koncentracija mora biti identična, tj.

$c_1V_1 = c_2V_2$ pa je koncentracija amonijevog sulfata $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$.

Koncentracija amonijevog sulfata dodatno bi se smanjila ukoliko se ponovi postupak dijalize.

Osnove biokemije

PROTEINI



Analiza primarne strukture proteina

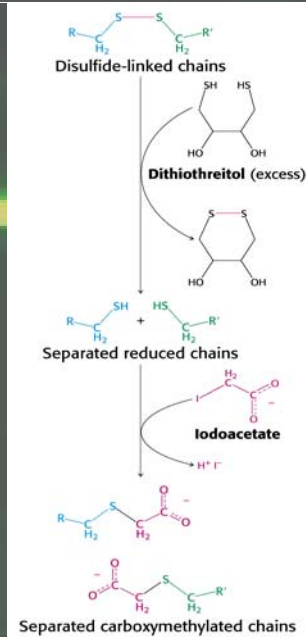
Određivanje
aminokiselinskog
sastava proteina

Određivanje
slijeda
aminokiselina proteina

Analiza primarne strukture proteina

Raskidanje disulfidnih veza- ukoliko su proteinski lanci povezani disulfidnim vezama potrebno ih je raskinuti, što se postiže tretiranjem proteina s reducirajućim agensom 2-merkaptoetanolom ili ditioreitolom (DTT).

Nastali cisteinski bočni ogranci tretiraju se jodoacetatom kako bi se spriječilo ponovno nastajanje disulfidnog mosta.

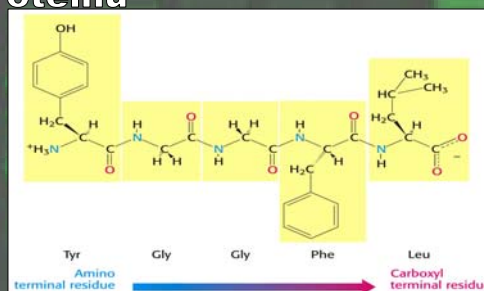


Određivanje aminokiselinskog sastava proteina

- 1) **kisela hidroliza** (zagrijavanje u 6 mol/dm³ HCl pri 120 °C 10– 24 sati dovodi do potpune hidrolize polipeptida)
- 2) **separacija** - smjesa dobivenih aminokiselina se razdvoji na ionskom izmjenjivaču
- 3) **kvantifikacija** pojedinih aminokiselina (u reakciji s ninhidrinom sve α-aminokiseline daju plavo obojenje, dok iminokiseline (Pro) daju žuto obojenje; spektrometrijska analiza..)

Određivanje slijeda aminokiselina u proteinu

- 1) Određivanje N-terminalne aminokiseline metodom po Sangeru.
- 2) Određivanje N-terminalne aminokiseline metodom po Edmanu.
- 3) Određivanje C-kraja peptida

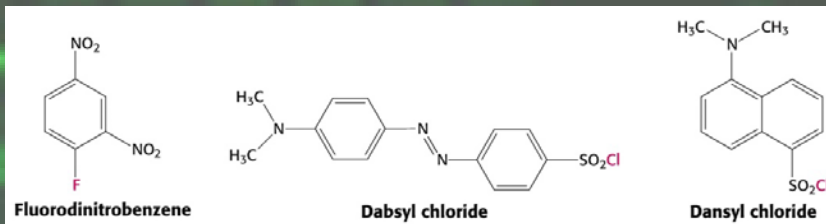


Određivanje slijeda aminokiselina u proteinu
-određivanje N-terminalne aminokiseline metodom po Sangeru

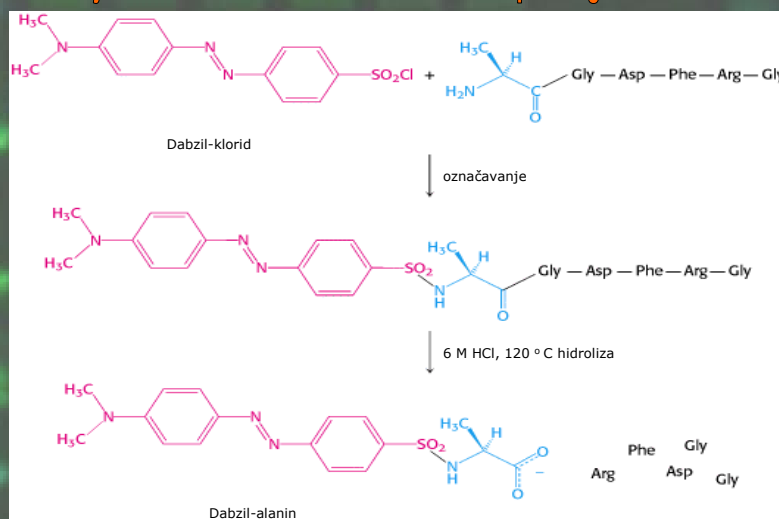


Reagensi:

- DNFB (2,4-dinitro-1-fluorbenzen, Sangerov reagens)
- Dabzil-klorid
- Dansyl-klorid

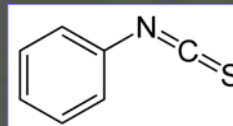


Određivanje slijeda aminokiselina u proteinu
-određivanje N-terminalne aminokiseline metodom po Sangeru



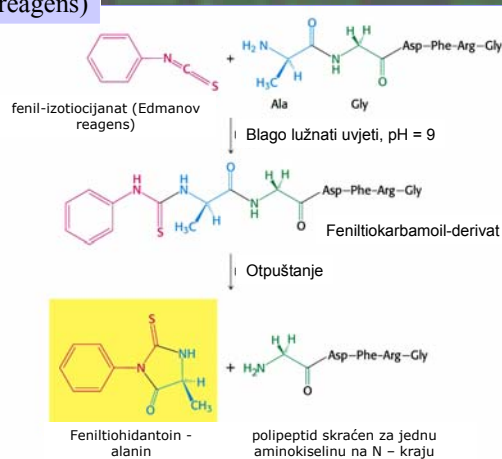
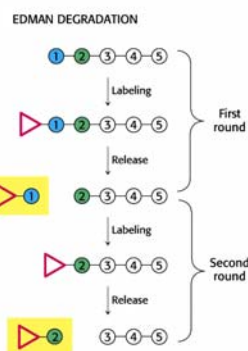
Određivanje slijeda aminokiselina u proteinu

-određivanje N-terminalne aminokiseline metodom po Edmanu



Reagens:

- Fenil-izotiocijanat (Edmanov reagens)



Određivanje C-kraja peptida

Provodi se enzimatski pomoću enzima egzopeptidaza (karboksipeptidaza) i kemijski (kemijski agensi).

Ovi enzimi specifično cijepaju peptidnu vezu iza određenih aminokiselina, na C-kraju, time razbijaju polipeptid u manje dijelove.

Enzimatski:

TRIPSIN- cijepa peptidnu vezu iza arginina i lizina (Arg, Lys)

KIMOTRIPSIN-cijepa peptidnu vezu iza aromatskih aminokiselina (fenilalanin, tirozin, triptofan (Phe, Tyr, Trp))

PEPSIN- cijepa peptidnu vezu iza leucina i aromatskih aminokiselina (Leu, Phe, Trp, Tyr)

Kemijski:

CIJANOGENBROMID (CNBr)- cijepa peptidnu vezu iza metionina (Met)

Zadatak 1.

Napišite produkte koji nastaju kada se sljedeći polipeptid hidrolizira kimotripsinom, a zatim se svaki nasali peptid izloži djelovanju CNBr:

Val-Ala-Lys-Glu-Glu-Phe-Val-Met-Tyr-Cys-Glu-Trp-Met-Gly-Gly-Phe

Rješenje:

a) Kimotripsin hidrolizira peptidnu vezu iza aromatskih aminokiselinskih ostataka: Phe, Trp, Tyr

Val-Ala-Lys-Glu-Glu-**Phe** + Val-Met-**Tyr** + Cys-Glu-**Trp** + Met-Gly-Gly-Phe

b) CNBr kemijski kida peptidnu vezu iza Met

Val-Ala-Lys-Glu-Glu-Phe + CNBr #

Val-Met-Tyr + CNBr Val-Met + Tyr

Cys-Glu-Trp + CNBr #

Met-Gly-Gly-Phe + CNBr Met + Gly-Gly-Phe

Zadatak 2.

Zadan je peptid: **AGFTSKMWARGI**
(Ala-Gly-Phe-Thr-Ser-Lys-Met-Trp-Ala-Arg-Gly-Ile)

Koji je glavni produkt (ili produkti) koji će iz njega nastati djelovanjem:
a) tripsina, b) kimotripsina, c) CNBr, d) DNFB i kiselom hidrolizom (struktura), e) u četvrtom ciklusu Edmanove odgradnje (struktura)?

Rješenje:

a) Tripsin hidrolizira peptidnu vezu iza (tj. s C-strane) Arg (R) i Lys (K), te se njegovim djelovanjem dobivaju tri peptida:

AGFTSK + MWAR + GI

b) Kimotripsin hidrolizira peptidnu vezu iza aromatskih aminokiselinskih ostataka - Phe (F), Tyr (Y) i Trp (W):

AGF + TSKMW + ARG I

c) CNBr kemijski kida peptidnu vezu iza Met (M):

AGFTSKM + WARG I

Zadatak 2.

Zadan je peptid: **AGFTSKMWARGI**
(Ala-Gly-Phe-Thr-Ser-Lys-Met-Trp-Ala-Arg-Gly-Ile)

Koji je glavni produkt (ili produkti) koji će iz njega nastati djelovanjem:
a) tripsina, b) kimotripsina, c) CNBr, d) DNFB i kiselom hidrolizom (struktura), e) u četvrtom ciklusu Edmanove odgradnje (struktura)?

Rješenje:

d) DNFB (2,4-dinitro-1-fluorbenzen, Sangerov reagens) reagira sa slobodnom amino-skupinom na N-kraju proteina kao i s ϵ -amino skupinom lizina. Nakon kisele hidrolize dobije se dinitrofenilni derivat aminokiseline koja se nalazila na N-kraju peptida, kao i derivat koji je vezan za ϵ -amino skupinu lizina.

DNP-alanin, DNP- ϵ -lizin

e) U četvrtom ciklusu Edmanove odgradnje amino-skupina četvrte aminokiseline s N-kraja peptida reagirat će s fenil-izotiocijanatom. Hidrolizom u blago kiselim uvjetima oslobodit će se fenilthiohidantoinski derivat četvrte aminokiseline s N- kraja

PTH-derivat treonina

Zadatak 3.

Analizom oktapeptida prikupljeni su sljedeći podaci:

Sastav: (Ala, Gly₂, Lys, Met, Ser; Thr, Tyr)

CNBr: (1) (Ala, Gly, Lys, Thr)
(2) (Gly, Met, Ser, Tyr)

Tripsin: (1) (Ala, Gly)
(2) (Gly, Lys, Met, Ser, Thr, Tyr)

Kimotripsin: (1) (Gly, Tyr)
(2) (Ala, Gly, Lys, Met, Ser, Thr)

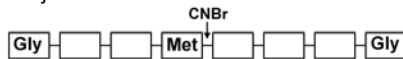
Analizom N- i C-kraja peptida dobivena je ista aminokiselina.

Odredite primarnu strukturu ovog peptida.

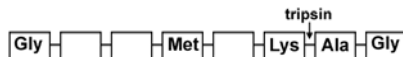
Počnimo od najočitijeg: budući da je analizom **N- i C- kraja** dobivena ista aminokiselina, a Gly je jedina aminokiselina koja u peptidu dolazi dvaput, Gly se nalazi na početku i na kraju peptida.



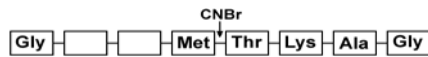
Djelovanjem **CNBr** dobivaju se dva tetrapeptida, a **CNBr** kida peptidnu vezu iza Met, Met se mora nalaziti na položaju broj 4:



Djelovanjem **tripsina** dobivaju se dipeptid i heksapeptid. Kako tripsin hidrolizira peptidnu vezu iza Lys ili Arg, a jedini Lys se nalazi u heksapeptidu, heksapeptid mora biti ispred dipeptida, a Lys na položaju 6. Iz sastava dipeptida (Gly, Ala) zaključujemo da se Ala mora nalaziti na položaju 7:



Vratimo li se sad na rezultat djelovanja CNBr, iz sastava dvaju tetrapeptida zaključujemo da se na položaju 5 mora nalaziti Thr:



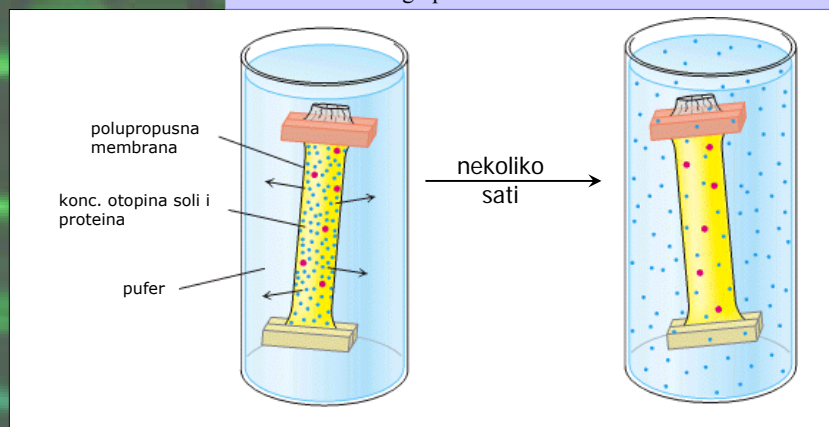
I konačno, djelovanjem **kimotripsina** dobivaju se također dipeptid i heksapeptid. Tyr (iza kojeg kimotripsin hidrolizira) nalazi se na kraju dipeptida, a na jedinom preostalom položaju unutar oktapeptida nalazi se preostala aminokiselina, Ser.

Metode purifikacije proteina

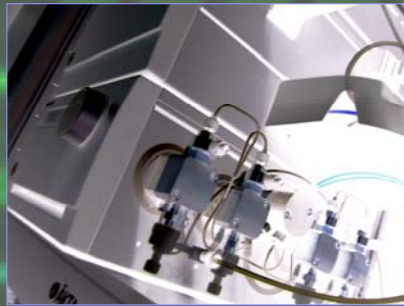
SVOJSTVA	METODE:
Topljivost	Isoljavanje
Naboj	Kromatografija na ionskom izmjenjivaču Gel-elektroforeza Izoelektrično fokusiranje
Polarnost	Adsorpcijska kromatografija Papirna kromatografija
Veličina	Dijaliza Gel-elektroforeza Gel filtracijska kromatografija Ultracentrifugiranje
Specifičnost	Afinitetna kromatografija

Dijaliza

Postupak razdvajanja tvari iz otopine na temelju razlika u sposobnosti difuzije kroz polupropusne membrane. Kroz takve membrane prolaze otopljene tvari a zaostaju čestice koloidnih dimenzija. Na taj se način iz otopine mogu odijeliti niskomolekularni od visikomolekularnih spojeva koji kroz pore membrane ne mogu proći.

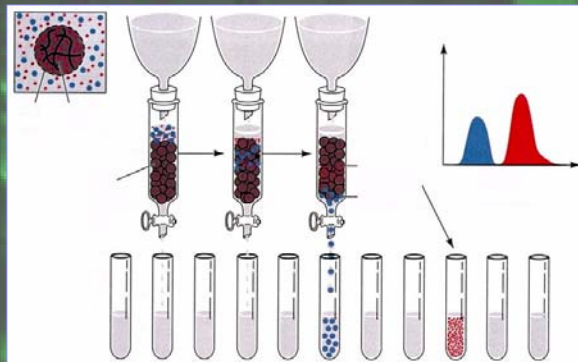
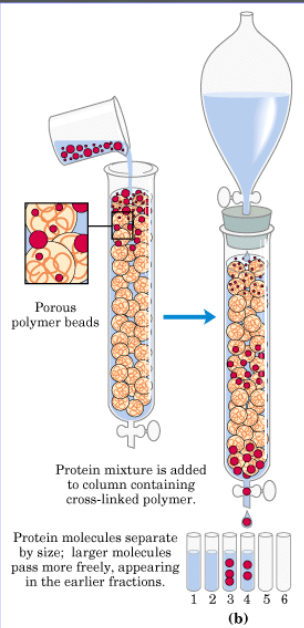


Kromatografske metode



Gel-filtracija
Ionsko-izmjenjivačka kromatografija
Afinitetna kromatografija

Gel-filtracija

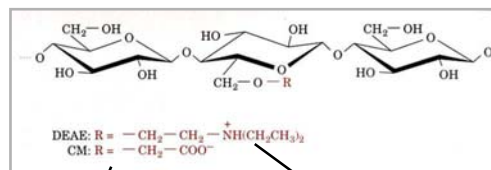
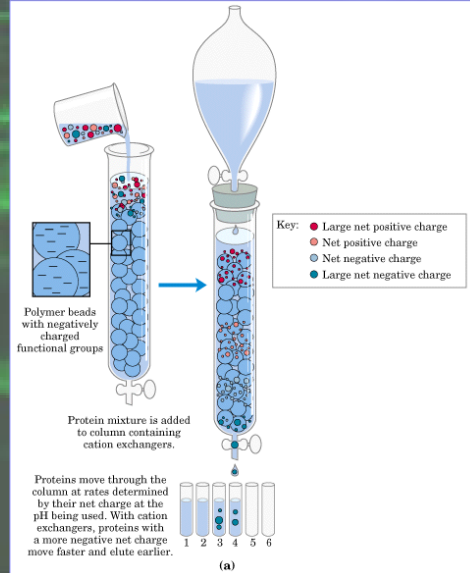


Ionsko-izmjenjivačka kromatografija



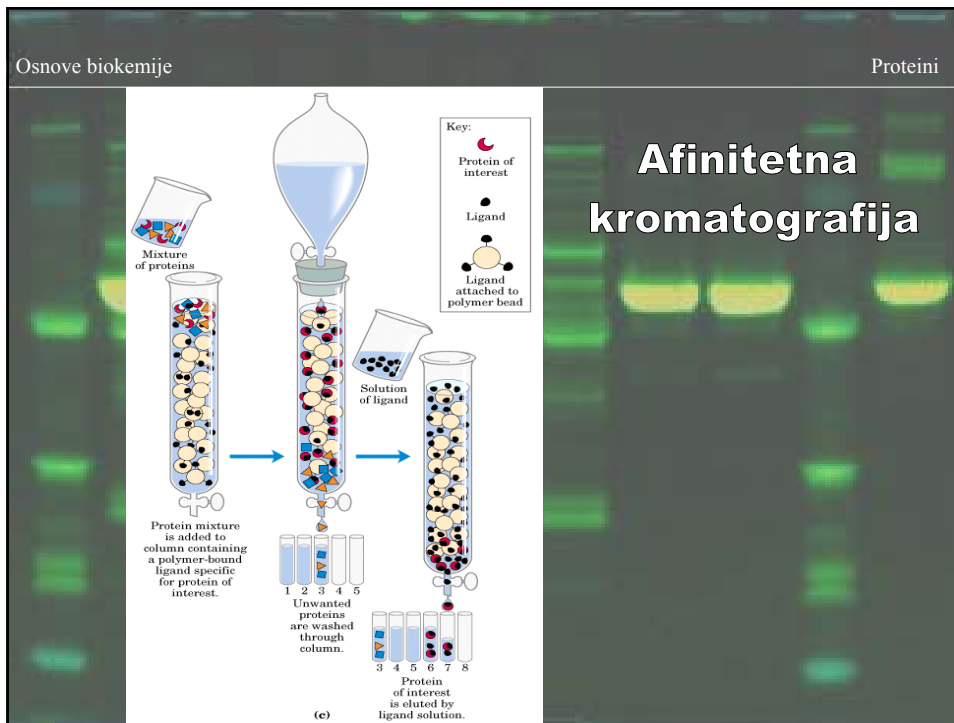
pozitivno nabijeni protein veže se na negativno nabijena zrnca

negativno nabijeni protein prolazi



karboksimetil
odvaja proteine s pozitivnim nabojem - **kationski izmjenjivač**

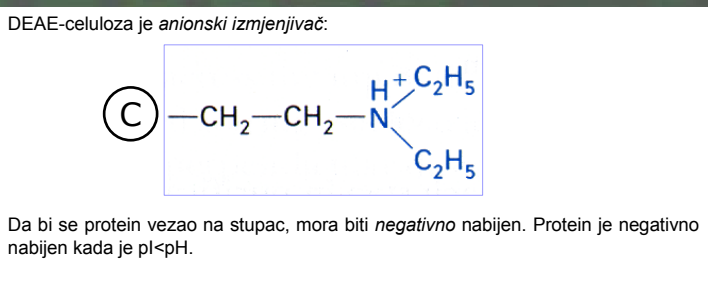
dietilaminoetil
odvaja proteine s negativnim nabojem - **anionski izmjenjivač**

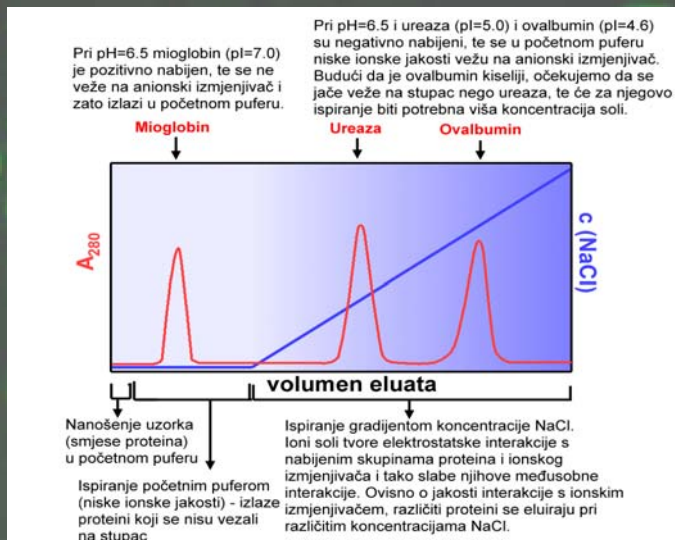


Zadatak 4. Smjesa triju proteina: ovalbumin pI=4.6
 ureaza pI=5.0
 mioglobin pI=7.0

nanesena je na stupac DEAE-celuloze u puferu slabe ionske jakosti, pH=6.5. Stupac je ispran istim puferom, a zatim gradijentom koncentracije NaCl pri istom pH.
 Kojim redom će se proteini ispirati sa stupca?

Rješenje:



Zadatak 4.**Zadatak 5.**

Koji je slijed elucije navedenih proteina s karboksimetil-celuloze koristeći gradjent koncentracije soli pri pH 7,0?

protein	pI
fibrinogen	5,8
hemoglobin	7,1
lizozim	11,0
pepsin	<1
ribonukleaza A	7,8

Zadatak 5.

Pri zadanom pH (7.0), lizozim i ribonukleaza su pozitivno nabijeni, hemoglobin je gotovo neutralan, a pepsin i fibrinogen su negativno nabijeni proteini.

Karboksimetil-celuloze je kationski izmjenjivač, što znači da na sebe veže katione, jer je sama negativno nabijena.

Dakle, karboksimetil-celuloza će vezati pozitivno nabijene proteine - lizozim i ribonukleazu.

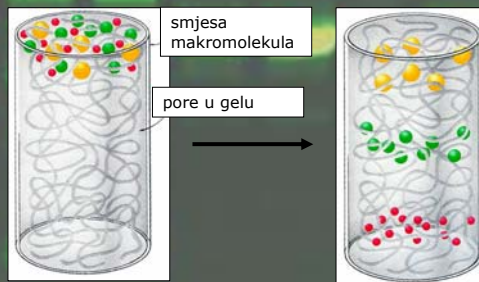
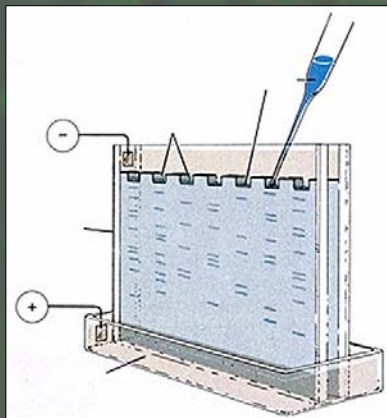
Pri eluciji povećanjem koncentracije soli, prvo će se eluirati ribonukleaza, jer je manje pozitivno nabijena.

Zadatak 6.

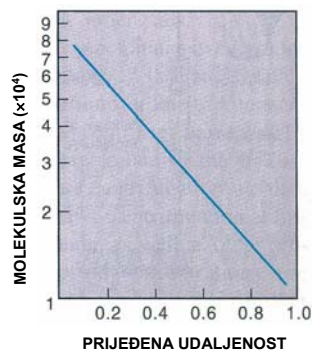
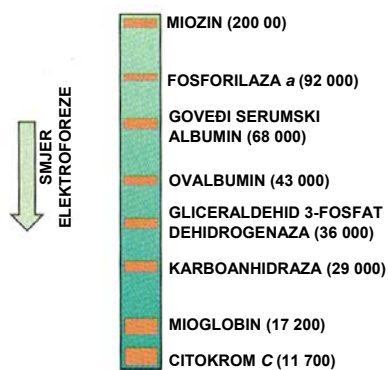
Kako biste razdvojili slijedeću smjesu proteina:

	<i>M_r</i>	<i>pI</i>
citokrom c	13 000	10,6
mioglobin	17 000	7,0
hemoglobin	68 000	7,1
serumski albumin	69 000	4,8

Elektroforeza



SDS elektroforezom proteina poznate molekulske mase (standardni proteini) moguće je konstruirati dijagram u kojem je pokretljivost proteina obrnuto proporcionalna logaritmu njihove molekulske mase.

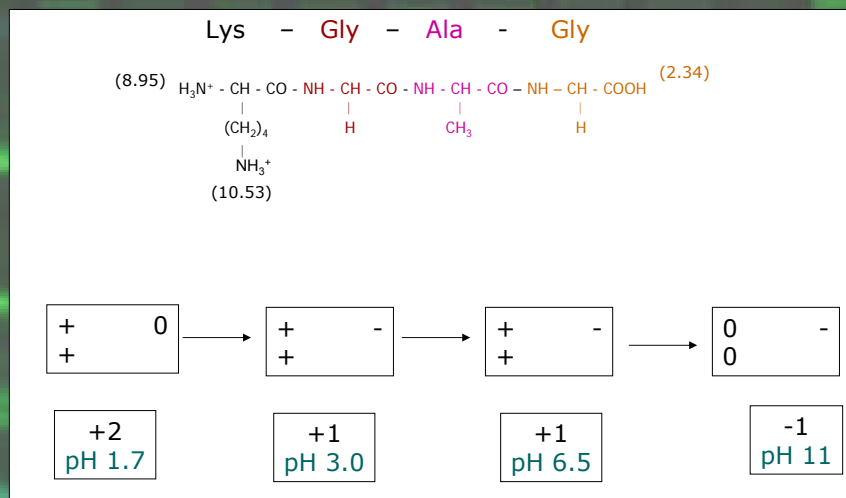


Zadatak 7.

Elektroforeza je metoda kojom se peptidi mogu odijeliti obzirom na naboj koji nose pri određenoj vrijednosti pH. Označite smjer kretanja (A, K, 0) ovih tetrapeptida pri zadanim vrijednostima pH.

Peptid	pH			
	1.7	3.0	6.5	11
Lys-Gly-Ala-Gly				
Lys-Gly-Ala-Glu				
His-Gly-Ala-Glu				
Glu-Gly-Ala-Glu				

Zadatak 7.



Zadatak 7.

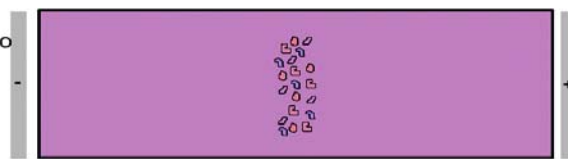
Na temelju vrijednosti pK treba izračunati neto-naboj peptida pri svakom zadanom pH. Peptid se u elektroforezi kreće prema elektrodi suprotnog naboja od njegovog vlastitog. Peptid se ne giba ako mu je ukupni naboj 0. U tablici je dan ukupni naboj peptida i smjer kretanja pri elektroforezi.

Peptid	pH			
	1.7	3.0	6.5	11
Lys-Gly-Ala-Gly	+2 K	+1 K	+1 K	-1 A
Lys-Gly-Ala-Glu	+2 K	+1 K	0 0	-2 A
His- Gly-Ala-Glu	+2 K	+1 K	-1 A	-2 A
Glu-Gly-Ala-Glu	+1 K	0 0	-2 A	-3 A

Izoelektrično fokusiranje

Početak:

Smjesa amfolita je ravnomjerno raspoređena u gelu. Smjesa proteina se nanosi na površinu gela.



Fokusiranje:

Migracijom amfolita u el. polju uspostavlja se gradijent pH. Svaki protein se giba prema području na gelu koje odgovara njegovom pI.



Kraj:

Gradijent pH je do kraja formiran. Proteini su dosegli područje pH jednako njihovim pI, te imaju neto naboj 0 i ne gibaju se u el. polju.

