

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Α. Μπαδέκα
Αναπλ. Καθηγήτρια
Τμήμα Χημείας
Παν/μιο Ιωαννίνων

- Οι πρωτεΐνες είναι πολυμερή αμινοξέων. Είκοσι διαφορετικοί τύποι αμινοξέων υπάρχουν φυσικά στις πρωτεΐνες. Διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με τον τύπο, τον αριθμό και την αλληλουχία των αμινοξέων.
- Πηγή ενέργειας και πηγή απαραίτητων αμινοξέων.
- Επίσης χρησιμοποιούνται ως μέσα ζελατινοποίησης, γαλακτωματοποιητές, μέσα αφρισμού και πυκνωματοποιητές.
- Αρκετά ένζυμα είναι πρωτεϊνικής φύσης κι έτσι συμμετέχουν στο ρυθμό διαφόρων βιοχημικών αντιδράσεων.

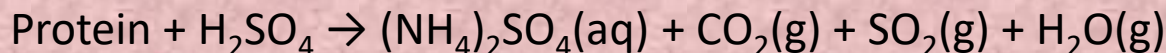
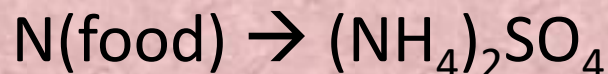
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Kjeldahl method

- Το τρόφιμο υπόκειται σε πέψη με ένα ισχυρό οξύ κι έτσι ελευθερώνεται το άζωτο το οποίο προσδιορίζεται με ογκομέτρηση. Το ποσό της πρωτεΐνης υπολογίζεται από τη συγκέντρωση του αζώτου στο τρόφιμο.
- Θα πρέπει να μετατραπεί σε πρωτεΐνη (συντελεστής μετατροπής - F). Στις περισσότερες περιπτώσεις $F=6.25$ όμως κάθε πρωτεΐνη έχει άλλο συντελεστή μετατροπής που εξαρτάται από τη σύσταση των αμινοξέων.
- Τρία στάδια: πέψη, εξουδετέρωση και ογκομέτρηση.

Πέψη

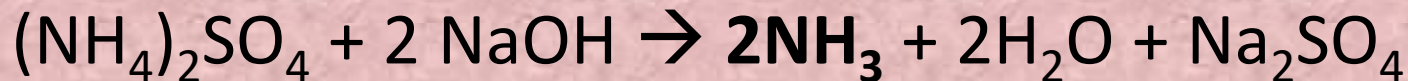
- Ζυγίζεται το τρόφιμο προς ανάλυση και τοποθετείται στη φιάλη πέψης και προστίθενται θειικό οξύ (οξειδωτικό μέσω του οποίου θα γίνει η πέψη του τροφίμου, εξαρτάται από την ποσότητα του λίπους), άνυδρο θειικό νάτριο (επιταχύνει την αντίδραση με αύξηση της θερμοκρασίας) και έναν καταλύτη, όπως χαλκός, σελήνιο, τιτάνιο ή υδράργυρος (επιτάχυνση της αντίδρασης).
- Μετατροπή του αζώτου του τροφίμου (εκτός αυτών με τη μορφή νιτρικών και νιτρωδών) σε αμμωνία και η οργανική ύλη σε CO_2 & H_2O . Η αέρια αμμωνία δεν ελευθερώνεται σε όξινο διάλυμα γιατί η αμμωνία είναι σε μορφή ιόντων αμμωνίου (NH_4^+) το οποίο συνδέεται στο θειικό ιόν (SO_4^{2-}) και έτσι παραμένει στο διάλυμα:





Απόσταξη

- Μετά την πέψη συνδέεται στο σύστημα απόσταξης και το διάλυμα γίνεται αλκαλικό με προσθήκη NaOH και έτσι μετατρέπεται το θειικό αμμώνιο σε αμμωνία:



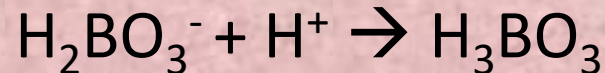
- Η αμμωνία ελευθερώνεται από το διάλυμα και μετακινείται στη φιάλη που περιέχει βορικό οξύ. Το χαμηλό pH μετατρέπει την αμμωνία σε ιόν αμμωνίου και ταυτόχρονα μετατρέπεται το βορικό οξύ σε βορικό ιόν:





Ογκομέτρηση

- Το περιεχόμενο άζωτο μετρείται με ογκομέτρηση του βορικού αμμωνίου με θειικό ή υδροχλωρικό οξύ με κατάλληλο δείκτη



$$\% N = \frac{N (V_{\text{δειγμα}} - V_{\text{τυφλό}}) \times 1,4007}{m}$$

N=κανονικότητα του οξέος

$V_{\text{δειγμα}}$ = όγκος οξέος (mL) τιτλοδότησης του δείγματος

$V_{\text{τυφλό}}$ = όγκος οξέος (mL) τιτλοδότησης του τυφλού

m = μάζα δείγματος (g)

$$\% \text{Protein} = F \times \% N$$

Food		% Nitrogen	Factor	% Protein
Cereals, pasta				
	Brown Rice	1.3	6.25	7.9
	Wheat flour, whole-grain	2.4	5.7	13.7
	Macaroni, spaghetti	1.9	5.7	11.0
Pulses, nuts and seeds				
	Red beans	3.4	6.25	21.2
	Soy and soy products	6.3	5.71	36.0
	Almonds	4.9	5.18	25.3
	Peanuts	4.8	5.46	26.0
	Nuts	2.9	5.3	15.2
	Sunflower seeds	3.2	5.3	17.2
Dairy products				
	Milk, whole	0.5	6.38	3.3
	Cheese (i.e. Cheddar)	3.9	6.38	24.9
	Butter	0.3	6.38	2.0
	Yogurt	0.8	6.38	5.3
Meat, poultry, fish				
	Beef	3.0	6.25	18.5
	Chicken, breast meat	3.7	6.25	23.1
	Ham	2.8	6.25	17.6
	Egg, whole	2.0	6.25	12.5
	Fish	2.6	6.25	16.0

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα

- **Πλεονεκτήματα.** Πρότυπη μέθοδος με υψηλή ακρίβεια και καλή επαναληπτικότητα.
- **Μειονεκτήματα.** Δεν δίνει μέτρηση της πραγματικής πρωτεΐνης γιατί όλο το άζωτο στο τρόφιμο δεν σχηματίζει πρωτεΐνη. Αρκετά χρονοβόρα και επικίνδυνη λόγω χρήσης πυκνών οξέων και καταλυτών (αύξηση της θερμοκρασίας).

Dumas method

- Αυτοματοποιημένη μέθοδος και μετρά με ταχύτητα τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα τρόφιμα.
- Δείγμα γνωστής μάζας καίγεται σε υψηλή θερμοκρασία ($\sim 900^{\circ}\text{C}$) παρουσία οξυγόνου. Σχηματίζονται τα αέρια CO_2 , H_2O & N_2 . Τα CO_2 , H_2O απομακρύνονται και δεσμεύονται σε κατάλληλες στήλες. Το άζωτο μετρείται μέσω στήλης που έχει στο τέλος της ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας.

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα

- **Πλεονεκτήματα:** Είναι πολύ πιο γρήγορη από την Kjeldahl μέθοδο (κάτω από 4 λεπτά ανά μέτρηση). Δεν χρησιμοποιούνται τοξικά χημικά ή καταλύτες. Πολλά δείγματα μετρούνται αυτόματα. Εύκολη στη χρήση.
- **Μειονεκτήματα:** Υψηλό αρχικό κόστος. Δεν δίνει μέτρηση της πραγματικής πρωτεΐνης. Μικρή ποσότητα δείγματος και έτσι δεν μπορεί να είναι αντιπροσωπευτικό.

Μέθοδοι με χρήση φασματοσκοπίας UV-ορατού

- Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν είτε τη φυσική ικανότητα των πρωτεϊνών να απορροφούν (ή σκεδάζουν) το φως στην περιοχή UV-Vis είτε κατόπιν φυσικής ή χημικής τροποποίησης των πρωτεϊνών έτσι ώστε να απορροφούν (ή σκεδάζουν) το φως αυτής της περιοχής.
- Απαιτείται πρότυπη καμπύλη απορρόφησης (ή θολερότητας) έναντι συγκέντρωσης πρωτεΐνης.
- Διαφορετικές απορροφήσεις διαφορετικών δεσμών π.χ. πεπτίδια, αρωματικές αλυσίδες, βασικές ομάδες και συσσωματώματα πρωτεϊνών.

Άμεση μέτρηση στα 280 nm

- Η θρυπτοφάνη και η τυραμίνη απορροφούν ισχυρά στα 280nm.
- Απλή η πορεία, μη καταστρεπτική και δεν απαιτούνται ιδιαίτερα αντιδραστήρια.
- Το κυριότερο μειονέκτημα → τα νουκλεϊνικά οξέα απορροφούν ισχυρά στο ίδιο μήκος κύματος και επηρεάζουν τη μέτρηση εάν βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση.
- Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με μέτρηση της απορρόφησης σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος.

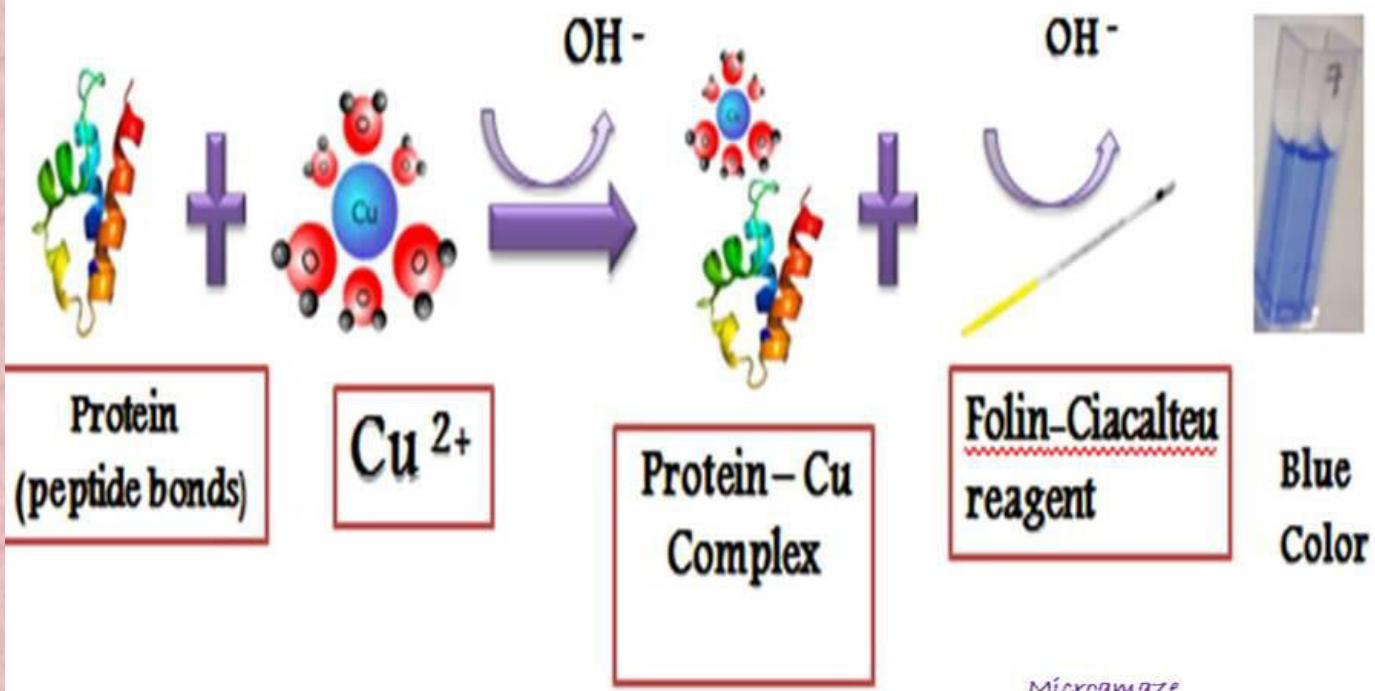
Biuret Method

- Τα ιόντα χαλκού (Cu^{2+}) αντιδρούν με τους πεπτιδικούς δεσμούς σε αλκαλικές συνθήκες και σχηματίζεται προϊόν με βιολετί χρώμα. Τα αντιδραστήριο Biuret αναμιγνύεται με το διάλυμα πρωτεϊνών και αφήνεται για 15-30 λεπτά πριν γίνει η μέτρηση στα 540nm.
- Το κυριότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μη αλληλεπίδραση με άλλα υλικά που απορροφούν σε μικρότερα μήκη κύματος.
- Μικρή ευαισθησία.

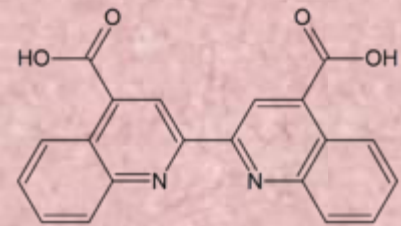


Lowry Method

- Αυτή η μέθοδος συνδυάζει το αντιδραστήριο Biuret με άλλο αντιδραστήριο (Folin-Ciocalteu) τα οποία αντιδρούν με την τυροσίνη και τη θρυπτοφάνη των πρωτεϊνών.
- Προϊόν με μπλε χρώμα και μετρείται μεταξύ 500-750nm ανάλογα με την ευαισθησία που απαιτείται. Μία μικρή κορυφή ~500nm για προσδιορισμό μεγάλων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και μία μεγάλη κορυφή ~750nm για τον προσδιορισμό μικρών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών.
- Πιο ευαίσθητη για μικρές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών.

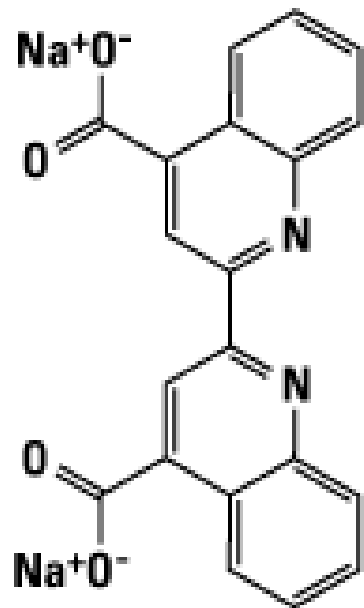


Microamaze
2015

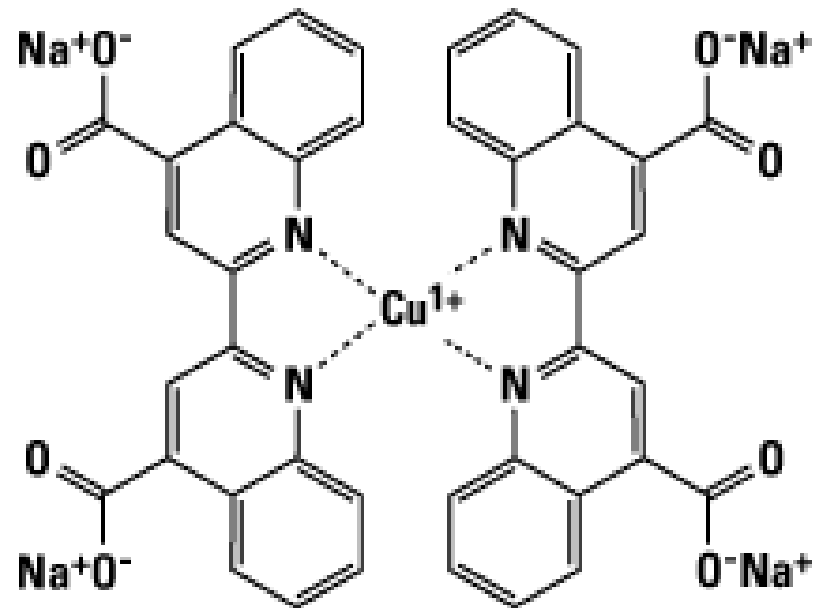


Bicinchoninic acid assay

- Για τον προσδιορισμό ολικής πρωτεΐνης (0.5mg/mL – 1.5 mg/mL) και είναι παρόμοια με τις μεθόδους Lowry, Bradford, Biuret.
- Το διάλυμα BCA είναι ισχυρά αλκαλικό (pH=11.25).
- Δύο σταδίων:
- Οι πεπτιδικοί δεσμοί ανάγουν τον $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$. Το ποσό του χαλκού που ανάγεται είναι ανάλογο με την παρούσα πρωτεΐνη.
- 2 μόρια BCA σχηματίζουν χηλικό σύμπλοκο με κάθε ιόν Cu^+ και σχηματίζεται ένα σύμπλοκο μωβ χρώματος που απορροφά ισχυρά στα 562nm.

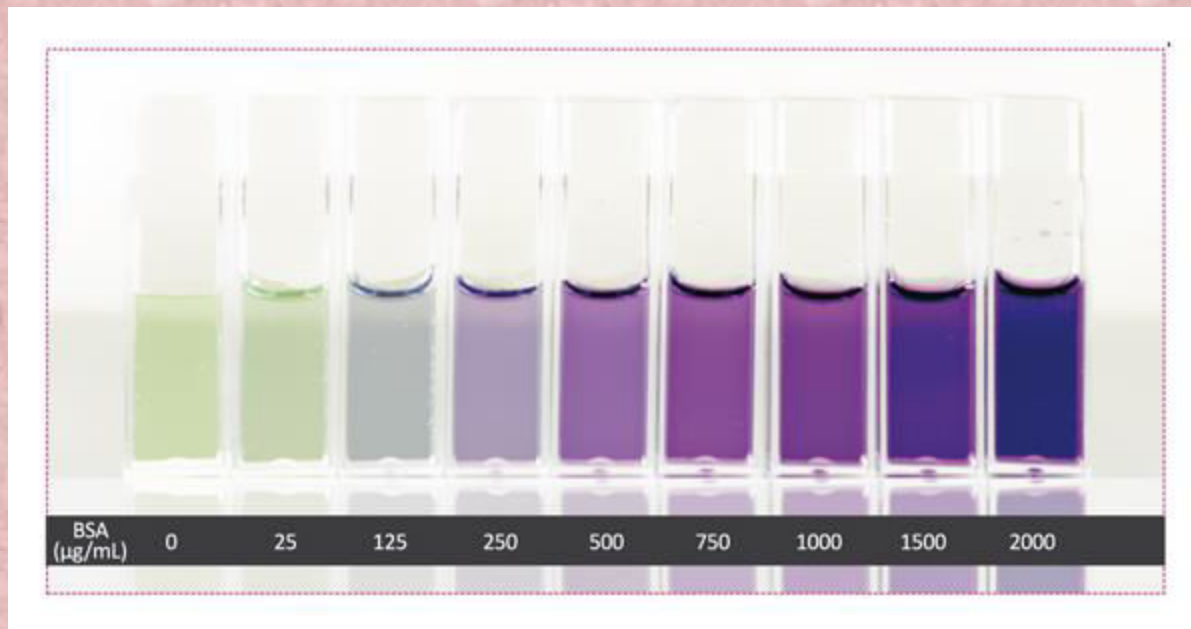


**Bicinchoninic Acid
(BCA) sodium salt**



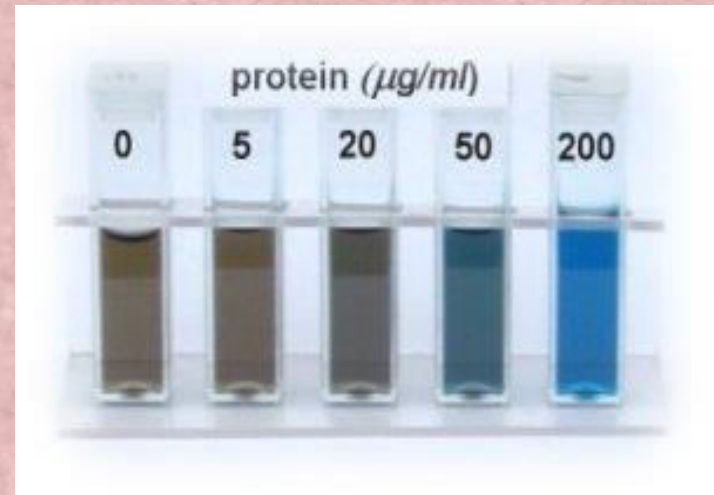
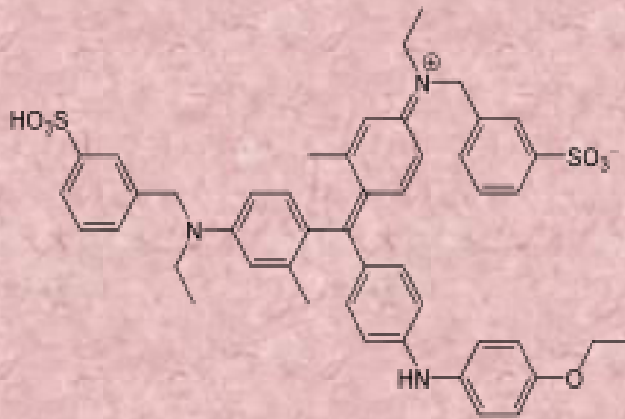
**BCA-Copper
Reaction**

- Το σύμπλοκο αυτό επηρεάζεται από την παρουσία πλευρικών αλυσίδων κυστεΐνης/κυστίνης, τυροσίνης και θρυπτοφάνης.
- Οι υψηλότερες θερμοκρασίες (37-60°C) βοηθούν του πεπτιδικούς δεσμούς στον σχηματισμό του συμπλόκου.



Bradford method

- Coomassie Brilliant Blue G-250. Υπάρχει σε τρεις τύπους: ανιονική (μπλε), ουδέτερη (πράσινη) και κατιονική (κόκκινη).
- Σε όξινες συνθήκες η κόκκινη βαφή μετατρέπεται σε μπλε (σύνδεση με τις πρωτεΐνες). Εάν δεν υπάρχουν πρωτεΐνες να συνδεθούν μαζί της το διάλυμα παραμένει καφέ.



Μέθοδοι δέσμευσης χρωστικής

- Μία γνωστή περίσσεια αρνητικά φορτισμένης (ανιονική) βαφής προστίθεται στο διάλυμα πρωτεΐνης της οποίας το pH ρυθμίζεται έτσι ώστε οι πρωτεΐνες φορτίζονται θετικά (< ισοηλεκτρικό σημείο).
- Οι πρωτεΐνες σχηματίζουν με τη βαφή ένα αδιάλυτο σύμπλοκο (ηλεκτροστατικές έλξεις μεταξύ των μορίων) ενώ η μη δεσμευμένη βαφή παραμένει υπό διάλυση.

- Η βαφή συνδέεται με τις κατιονικές ομάδες των βασικών εναπομεινάντων αμινοξέων (ιστιδίνη, αργινίνη και λυσίνη) και τις τερματικές ομάδες ελεύθερων αμινοξέων.
- Το ποσό της μη δεσμευμένης βαφής μετρείται φωτομετρικά (μετά την απομάκρυνση του συμπλόκου με φυγοκέντρηση).

$$\text{dye}_{\text{bound}} = \text{dye}_{\text{initial}} - \text{dye}_{\text{free}}$$

Θολομετρία

- Τα μόρια της πρωτεΐνης καταβυθίζονται π.χ. τριχλωροξικό οξύ και η συγκέντρωσή της μετρείται με τον βαθμό θολερότητας.
- **Πλεονεκτήματα:** Είναι σχετικά γρήγορες και ευαίσθητες σε μικρές συγκεντρώσεις πρωτεΐνες.
- **Μειονεκτήματα:** Για τις περισσότερες UV-ορατού τεχνικές απαιτούνται διαυγή διαλύματα. Απαιτείται προετοιμασία του δείγματος πριν την ανάλυση (π.χ. ομογενοποίηση, εκχύλιση, φυγοκέντρηση).

Ενόργανες τεχνικές

- Μέτρηση των φυσικών ιδιοτήτων.
- Μέτρηση απορρόφησης ακτινοβολίας.
- Μέτρηση του σκεδασμού της ακτινοβολίας.

Μέτρηση των φυσικών ιδιοτήτων

- **Πυκνότητα:** Η πυκνότητα των πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή των άλλων συστατικών των τροφίμων. Αύξηση της πυκνότητας → αύξηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης.
- **Δείκτης διάθλασης:** Ο δείκτης διάθλασης ενός υδατικού διαλύματος αυξάνεται καθώς η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυξάνεται.

Μέτρηση απορρόφησης ακτινοβολίας

- **UV-visible:** Μέτρηση απορρόφησης (ανωτέρω).
- **Υπέρυθρο:** Χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σε δείγματα τροφίμων.
Χαρακτηριστικές δονήσεις συγκεκριμένων χημικών ομάδων. Μικρή προετοιμασία του δείγματος και δεν είναι καταστρεπτική. Μειονέκτημα το υψηλό κόστος και η καλή και ιδιαίτερη βαθμονόμηση.
- **Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός:** Το περιεχόμενο της πρωτεΐνης μετρείται με μέτρηση της περιοχής κάτω από την κορυφή στο NMR φάσμα το οποίο αντιστοιχεί στο κλάσμα της πρωτεΐνης.

Μέτρηση του σκεδασμού της ακτινοβολίας

- **Σκεδασμός φωτός:** Η συσσωμάτωση των πρωτεϊνών σε υδατικό διάλυμα προσδιορίζεται με σκεδασμό του φωτός λόγω της θολερότητας του διαλύματος η οποία είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των συσσωματωμάτων.
- **Σκεδασμός υπερήχων:** Η συγκέντρωση των συσσωματωμάτων πρωτεΐνης προσδιορίζεται με την τεχνική σκεδασμού υπερήχων γιατί η ταχύτητα και η απορρόφηση υπερήχων σχετίζεται με τη συγκέντρωση των παρόντων συσσωματωμάτων πρωτεΐνης.

Διαχωρισμός και Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών

- Συχνά απαιτείται να είναι γνωστός ο τύπος των πρωτεϊνών στο τρόφιμο.
- Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση τις διαφορές τους στις φυσικοχημικές ιδιότητες όπως το μέγεθος, φορτίο, απορρόφηση, διαλυτότητα και θερμοσταθερότητα.

Διαλυτότητα

- Ανάλογα με τη διαλυτότητά τους σε υδατικά διαλύματα. Οι πρωτεΐνες καταβυθίζονται ή διαλυτοποιούνται με αλλαγή του pH, ιοντικής ισχύος, διηλεκτρικής σταθεράς ή της θερμοκρασίας.
- Είναι γρήγορες, οικονομικές και δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από τα άλλα συστατικά των τροφίμων.

Εξαλάτωση

- Όταν προστεθεί άλας με συγκέντρωση κρίσιμου σημείου οι πρωτεΐνες καταβυθίζονται (εξαλάτωση) γιατί όλο το νερό συνδέεται με τα άλατα και δεν μπορούν να εφυδατώσουν τις πρωτεΐνες.
- Συνήθως χρησιμοποιείται το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ λόγω της μεγάλης διαλυτότητάς του στο νερό, επίσης χρησιμοποιούνται και τα NaCl & KCl .

- Δύο στάδια:
 - Προσθήκη άλατος σε συγκέντρωση κάτω από αυτή που θα γίνει η καταβύθιση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει. Ακολουθεί φυγοκέντριση για να απομακρυνθούν οι λιγότερο διαλυτές πρωτεΐνες.
 - Στη συνέχεια γίνεται αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος και γίνεται η καταβύθιση της πρωτεΐνης η οποία απομακρύνεται με φυγοκέντριση αλλά παραμένουν στο διάλυμα οι διαλυτές πρωτεΐνες.
- Το μεγαλύτερο πρόβλημα είναι οι μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος που επιμολύνουν το διάλυμα και θα πρέπει να απομακρυνθεί πριν την επαναδιάλυση της πρωτεΐνης π.χ. με διάλυση ή υπερφιλτράρισμα.

Καταβύθιση στο ισοηλεκτρικό σημείο

- Το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) είναι το pH στο οποίο το φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν. Οι πρωτεΐνες τείνουν να συσσωματώνονται και να καταβυθίζονται στο pI γιατί οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις δεν τις κρατούν χωριστά.
- Οι πρωτεΐνες έχουν διάφορα ισοηλεκτρικά σημεία λόγω των διαφορετικών αλληλουχιών των αμινοξέων και έτσι μπορούν να διαχωριστούν με ρύθμιση του pH ενός διαλύματος. Όταν το pH ρυθμιστεί στο pI μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης αυτή καταβυθίζεται αφήνοντας τις άλλες πρωτεΐνες στο διάλυμα.

Κλασματοποίηση με διαλύτη

- Η διαλυτότητα μίας πρωτεΐνης εξαρτάται από τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος γιατί αλλάζει το μέγεθος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φορτισμένων ομάδων.
- Όταν η διηλεκτρική σταθερά ελαττώνεται το μέγεθος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φορτισμένων σειρών αυξάνεται. Αυτό οδηγεί στην ελάττωση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών → συσσωματώνονται.
- Η διηλεκτρική σταθερά ενός διαλύματος ελαττώνεται με προσθήκη υδατοδιαλυτών διαλυτών π.χ. αιθανόλη ή ακετόνη.
- Η ποσότητα του διαλύτη για την καταβύθιση των πρωτεϊνών ποικίλει από 5 έως 60%. Συνήθως γίνεται στους 0°C ή πιο χαμηλά για να αποφευχθεί η μετουσίωση της πρωτεΐνης.

Μετουσίωση «μολυσματικών» πρωτεϊνών

- Πολλές πρωτεΐνες μετουσιώνονται και καταβυθίζονται όταν το διάλυμα θερμαίνεται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία ή με ρύθμιση σε ισχυρά όξινο ή βασικό pH.
- Οι πρωτεΐνες που είναι σταθερές σε υψηλή θερμοκρασία ή σε ακραίες τιμές pH μπορούν εύκολα να διαχωριστούν γιατί κάποιες «μολυσματικές»(ανεπιθύμητες) πρωτεΐνες μπορούν να καταβυθιστούν ενώ αυτές που μας ενδιαφέρουν παραμένουν στο διάλυμα.

Διαχωρισμός λόγω των διαφορετικών χαρακτηριστικών προσρόφησης

- Επιλεκτική προσρόφηση – εκρόφηση ενός στερεού υλικού το οποίο περιέχεται σε μία στήλη μέσω της οποίας περνά το μίγμα.
- Με βάση των διαφορετικών συγγενειών των διαφορετικών πρωτεϊνών.
- Η χρωματογραφία συγγένειας και ιονανταλλαγής οι κυριότεροι τύποι που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανοιχτή στήλη ή HPLC.

Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής

- Η χρωματογραφία ιονανταλλαγής βασίζεται στην αναστρέψιμη προσρόφηση-εκρόφηση των ιόντων ενός διαλύματος σε ένα φορτισμένο στερεό πλέγμα ή ένα πολυμερικό πλέγμα.
- Κατιοναταλλαγής ή ανιοναταλλαγής.
- Οι συνθήκες του ρυθμιστικού διαλύματος ρυθμίζονται έτσι ώστε να είναι ευνοϊκές ως προς τη δέσμευση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει με το υπόστρωμα της στήλης.
- Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες αποδεσμεύονται με χρήση άλλου ρυθμιστικού διαλύματος και απομακρύνονται από τη στήλη.

Χρωματογραφία συγγένειας

- Η στατική φάση αποτελείται από έναν ligand ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε ένα στερεό υπόστρωμα. Ο ligand είναι ένα μόριο που έχει ιδιαίτερα υψηλή και μοναδική αναστρέψιμη συγγένεια με μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη.
- Το δείγμα περνά μέσα από την στήλη και η πρωτεΐνη συνδέεται με το ligand ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες απομακρύνονται. Στη συνέχεια η συνδεδεμένη πρωτεΐνη εκλούεται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο ευνοεί την εκρόφιση από τη στήλη.
- Είναι πιο εκλεκτική αλλά πιο ακριβή (στήλες με ιδιαίτερους ligands).

Διαχωρισμός με βάση το μέγεθος

- Διαχωρισμός ανάλογα με το μέγεθός της.
- Το M.W. κυμαίνεται από 10.000 → 1.000.000 Da.
- Ο διαχωρισμός εξαρτάται με την ακτίνα Stokes της πρωτεΐνης, παρά το M.W.
- Για ίδιο M.W. η ακτίνα Stokes αυξάνεται με τη σειρά:
Συμπαγής σφαιρική πρωτεΐνη < εύκαμπτη τυχαίως σπειροειδής < ραβδόμορφη.

Διήθηση

- Χρήση ημιπερατών μεμβρανών που επιτρέπουν τη διάβαση των μικρότερων μορίων αλλά παρεμποδίζουν τα μεγαλύτερα μόρια.
- Είναι αρκετά χρονοβόρα μεθόδων (12 ώρες).
- Αυτή η μέθοδος συνήθως χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση του άλατος από τα διαλύματα πρωτεΐνης μετά τον διαχωρισμό με εξαλάτωση.

Υπερδιήθηση

- Ένα διάλυμα πρωτεΐνης τοποθετείται σε ένα «κύτταρο» που περιέχει μία ημιπερατή μεμβράνη και εφαρμόζεται πίεση. Τα μικρότερα μόρια περνούν μέσα από τη μεμβράνη ενώ τα μεγαλύτερα παραμένουν στο διάλυμα.
- Υπάρχουν μεμβράνες με σημεία απομόνωσης που κυμαίνονται από 500 έως 300.000.
- Είναι παρόμοια με τη μέθοδο της διήθησης αλλά λόγω της εφαρμογής πίεσης είναι πιο γρήγορη.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για συμπύκνωση του πρωτεϊνούχου διαλύματος, απομάκρυνση αλάτων, ανταλλαγή buffer, κλασματοποίηση πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους.

Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

- Χρωματογραφία πηκτής και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους.
- Η στήλη είναι γεμάτη με πορώδες υλικό (χάντρες) από πολυμερικό υλικό με σταυροδεσμούς (δεξτρόζη ή αγαρόζη) και από μέσα του περνά το διάλυμα. Τα μόρια που είναι μεγαλύτερα από τους πόρους των «χαντρώων» περνούν γρήγορα μέσα από τη στήλη, ενώ η κίνηση των μορίων που εισήχθησαν στη στήλη μέσω των πόρων επιβραδύνεται. Έτσι τα μόρια εκκλούνται με σειρά ελαττωμένου μεγέθους.
- Σε αυτή την περίπτωση το M.V. δεν σχετίζεται άμεσα με την ακτίνα Stokes του διαφορετικού μεγέθους πρωτεϊνών.

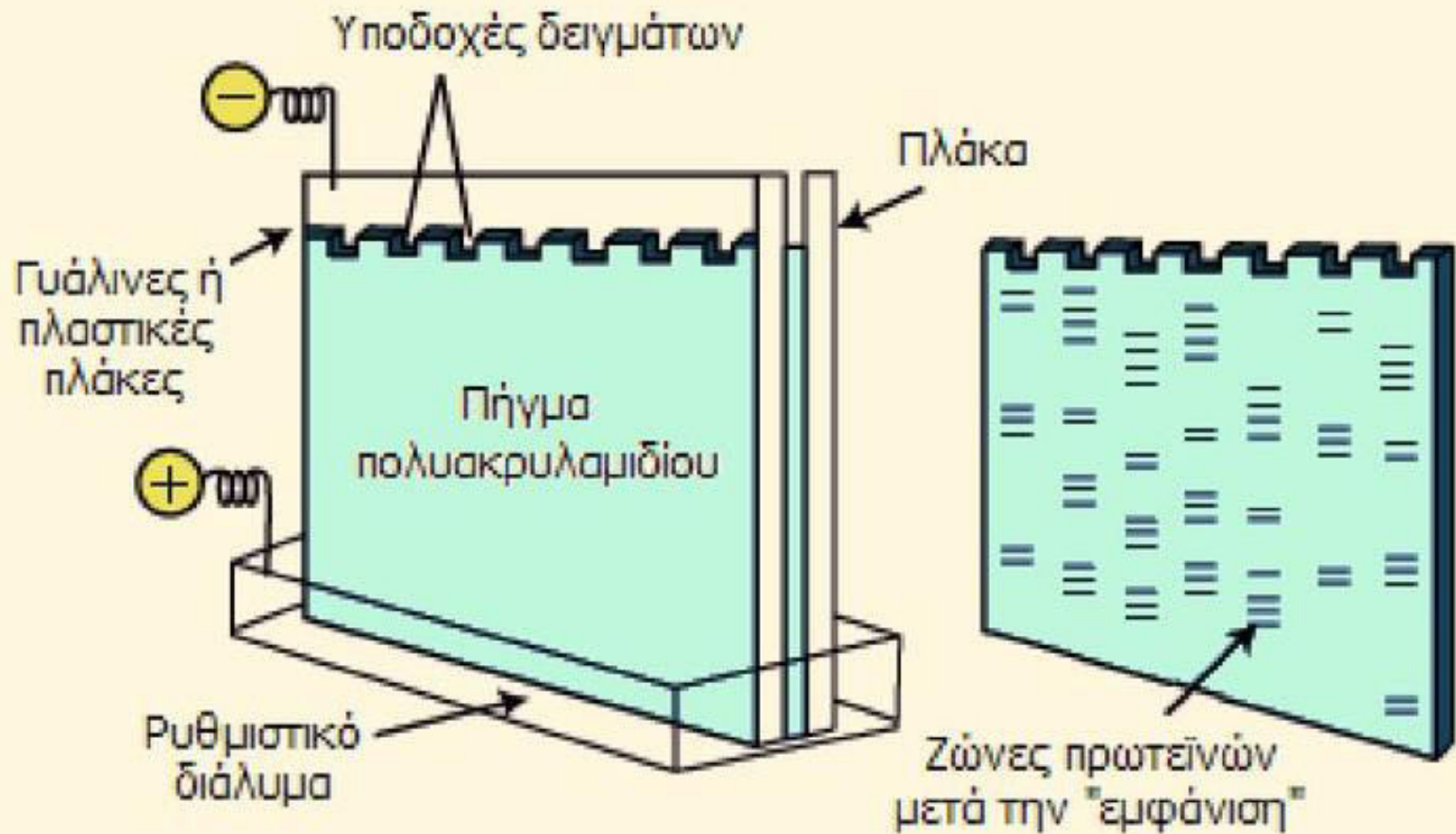
Διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση

- Με βάση των διαφορών στη μετακίνηση των φορτισμένων μορίων στο διάλυμα όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος του.
- Διαχωρισμός με βάση το μέγεθος, σχήμα ή φορτίο.

Μη μετουσιωτική ηλεκτροφόρηση

- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεϊνών αποχύνεται πάνω σε μία πορώδη πηκτή (πολυακρυλαμίδιο, άμυλο ή αγαρόζη) και εφαρμόζεται ένα δυναμικό στην πηκτή. Οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος της πηκτής και εξαρτάται από το φορτίο, και ο ρυθμός εξαρτάται από το μέγεθος του φορτίου και τη τριβή της κίνησής τους:

$$\text{mobility} = \frac{\text{applied voltage} \times \text{molecular charge}}{\text{molecular friction}}$$



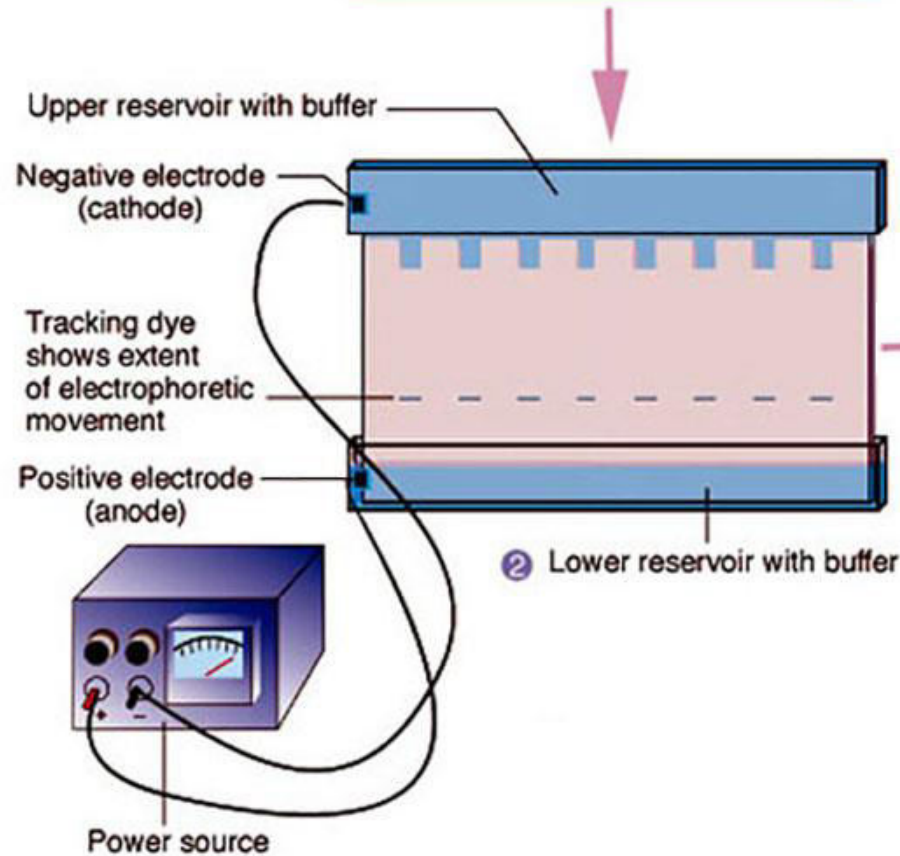
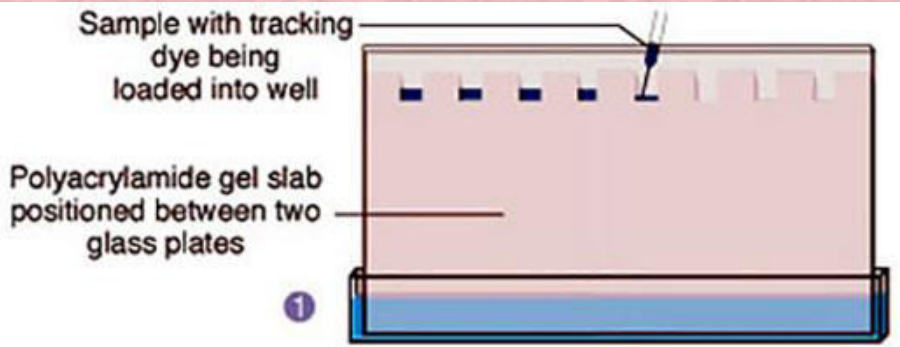
- Οι πρωτεΐνες μπορεί να είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένες στο διάλυμα που εξαρτάται από το ισοηλεκτρικό σημείο τους και το pH.
- Αρνητικά φορτισμένη εάν το pH είναι πάνω από το pI και θετικά φορτισμένη εάν το pH είναι κάτω από το pI.
- Το μέγεθος του φορτίου και το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Όσο υψηλότερο δυναμικό ή μεγαλύτερο φορτίο της πρωτεΐνης πιο γρήγορα θα κινηθεί η πρωτεΐνη.
- Η τριβή του μορίου είναι ένα μέτρο της αντίστασης στην κίνηση στην πηκτή και προσδιορίζεται από τη σχέση μεταξύ του ενεργού μεγέθους του μορίου και του μεγέθους των πόρων της πηκτής.

Ηλεκτροφόριση με μετουσίωση

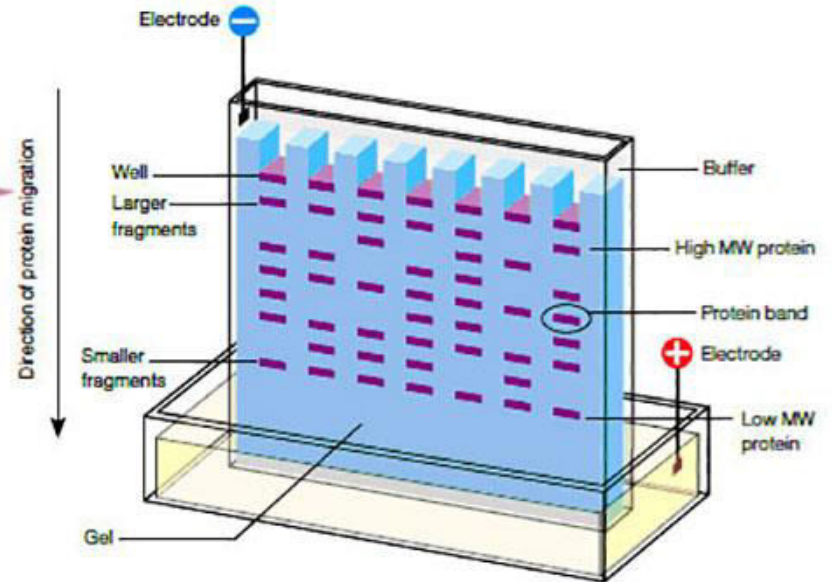
- Ο διαχωρισμός κυρίως με βάση το M.B.
- Οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται πριν την ανάλυση με ανάμιξη με μερκαπτοαιθανόλη, η οποία διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς, και δωδεκυλοθειικό νάτριο (*sodium dodecyl sulfate (SDS)*), το οποίο είναι ένα ανιονικό τασιενεργό το οποίο συνδέεται υδροφοβικώς με τα μόρια των πρωτεϊνών και προκαλεί το ξεδίπλωμά τους γιατί υπάρχει απώθηση μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ομάδων των επιφανειοδραστικών ενώσεων.

- Καθώς οι πρωτεΐνες ταξιδεύουν μέσα το δίκτυο της πηκτής διαχωρίζονται με βάση το MB ανάλογα με το μέγεθος των πόρων στην πηκτή: μικρότερα μόρια πρωτεΐνης κινούνται πιο γρήγορα σε σχέση με μεγαλύτερα μόρια.
- Για τον προσδιορισμό της κίνησης των πρωτεϊνών προστίθεται μία βαφή παρακολούθησης π.χ. μπλε της βρωμοφαινόλης. Μόριο μικρού φορτίου. Οι πρωτεΐνες γίνονται ορατές (Coomassie Brilliant Blue ή ασημί χρώμα).
- Η απόσταση κάθε πρωτεΐνης υπολογίζεται ως:

$$R_{\text{m}} = \frac{\text{distance protein moves}}{\text{distance dye moves}}$$



Electrophoresis is a procedure that enables the sorting of molecules based upon size and charge. Using an electric field, molecules, (such as proteins or DNA) can be made to move through a gel made of agar or polyacrylamide. The molecules to be sorted are placed into a well in the gel chamber, which is connected to a power source. When electric current is applied the larger molecules move more slowly through the gel medium, while the smaller molecules move faster. The different sized molecules form banding patterns, which may be seen when stained with a dye.



Ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης

- Μία τροποποίηση της ηλεκτροφόρησης με την οποία οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με το φορτίο σε μία πηκτή η οποία έχει ένα βαθμωτό pH κατά μήκος της. Οι πρωτεΐνες ταξιδεύουν στο σημείο που το pH είναι ίσο με το ισοηλεκτρικό σημείο και μετά σταματά η κίνησή τους λόγω του ότι δεν είναι πλέον φορτισμένες.
- Το pH στην πηκτή μπορεί να καλύψει ένα στενό εύρος (2-3 μονάδες) ή πιο ευρύ (3-10 μονάδες).
- Έχει την πιο υψηλή αναλυτική ικανότητα σε σύγκριση με όλες τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών.

Ηλεκτροφόριση δύο διαστάσεων

- Διαχωρισμός με βάση το φορτίο με χρήση ισοηλεκτρικής εστίασης και μετά στην κάθετη διάσταση με βάση το μέγεθος.

Ανάλυση αμινοξέων

- Η πρωτεΐνη πρώτα υδρολύεται (π.χ. με χρήση ισχυρού οξέος) για να ελευθερωθούν τα αμινοξέα και στη συνέχεια διαχωρίζονται με χρωματογραφία π.χ. ιονανταλλαγής, εκλεκτικότητας ή προσρόφησης.