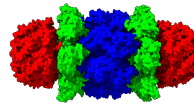


Analiza *in-vitro* a proteinelor – cromatografia, electroforeza, IEF, metode imunologice

Analiza *in-vitro* a proteinelor – un proces etapizat



Pentru a putea studia proprietățile și rolul unei proteine de interes, este esențial ca aceasta să fie obținută în formă pură. O celulă conține însă numeroase molecule ne-proteice, precum și mii de tipuri de proteine diferite. **Procesul de purificare a unei proteine dintr-un amestec** nu este unul trivial și **se folosește de diverse proprietăți prin care proteina de interes diferă de proteinele contaminante**, precum **masă**, **sarcină** sau **afinitate**. În prezent nu există metode universale de purificare care să funcționeze pentru orice proteină de interes, deși metodele bazate pe clonare și expresia proteinelor recombinante cu tag-uri specifice sunt etape importante în această direcție.

	Percentage of total weight of +1 cell	Approximate number of different
Water	70	1
Proteins	15	3,000
Nucleic acids		
DNA	1	1
RNA	6	>3,000
Polysaccharides	3	5
Lipids	2	20
Monomeric subunits and intermediates	2	500
Inorganic ions	1	20

Table 1-1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

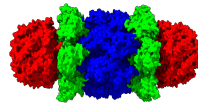
Purificarea unei proteine de interes presupune parcurgerea următoarelor etape generale:

1. **Obținerea extractului brut** – prin simpla liză a sursei proteinei de interes (țesut sau celule); conține toate componentele celulare;
2. **Fracționarea componentelor celulare** sau **separarea organelor celulare** dacă este cazul; cel mai frecvent se realizează prin centrifugare diferențiată; cea mai simplă fracționare se realizează prin centrifugare la viteză mare pentru separarea membranelor celulare și componentelor insolubile de proteinele citoplasmatiche solubile;
3. **Fracționarea proteinelor** – constă în separarea celor câteva mii de proteine diferite dintr-un extract în **fracții ce grupează proteine cu proprietăți foarte similare**. (din DEX: fracție = Număr care exprimă una sau mai multe părți dintr-un întreg; toate fracțiile proteice obținute alcătuiesc extractul inițial)

Cel mai frecvent fracționarea se realizează prin:

- A. **Precipitare diferențiată** – nu toate proteinele au aceeași solubilitate, această proprietate variind foarte mult funcție de pH și concentrația de săruri din soluție. Prin modificarea acestor parametri, **se pot precipita unele proteine (cele cu solubilitate redusă) și separa dintr-un amestec de cele cu solubilitate mare**. Cel mai utilizat sistem este precipitarea cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: în extractul conținând proteine se adaugă $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ până la concentrația de 30% și se separă proteinele precipitate; apoi se crește concentrația până la 60% și se separă proteinele precipitate. Extractul a fost astfel fracționat în 3 fracții – **care sunt acestea?**

Cromatografia ca metoă de fracționare



B. Cromatografia este de departe cea mai frecventă metodă de fracționare a proteinelor; extractul proteic sub forma unei soluții numite **fază mobilă** este amplasat pe o **coloană cromatografică** și pătrunde prin materialul poros al acesteia (material denumit **faza staționară**).

Proteinele interacționează diferențiat cu faza staționară și se vor separa funcție de tăria acestor interacțiuni: **proteinele ce interacționează puțin** vor petrece puțin timp în coloană, **eluard mai repede**, cele ce au **afinitate mare față** de faza staționară vor petrece mai mult timp în coloană și vor **elua mai târziu**.

Materialul poros al fazei staționare este elementul cheie ce permite selectarea proprietăților funcție de care să se realizeze fracționarea proteinelor. Funcție de tipurile de interacțiuni posibile între faza staționară și proteine, au fost descrise mai multe tipuri de cromatografie utilizabile în studiul proteinelor:

- Cromatografia de schimb ionic** – folosește diferențele ce există între **sarcinile electrice de pe suprafața proteinelor la un anumit pH**; faza staționară este o rășină sintetică ce conține fie grupe anionice (**schimbător cationic**) fie grupe cationice (**schimbător anionic**). Afinitatea proteinelor față de rășină depinde de pH și de cantitatea de săruri;
- Filtrare prin gel** - **separă proteinele funcție de dimensiunea acestora**;
- Cromatografia de afinitate** – **se bazează pe afinitatea pe care unele proteine o au față de molecule mici**

(liganzi; Ex: ioni de metale; ATP; maltoză); faza staționară este o rășină sintetică ce conține liganzii atașați covalent; trecerea unui amestec de proteine pe coloană va face ca doar proteinele cu afinitate față de această să se lege și astfel să fie separate de restul proteinelor;

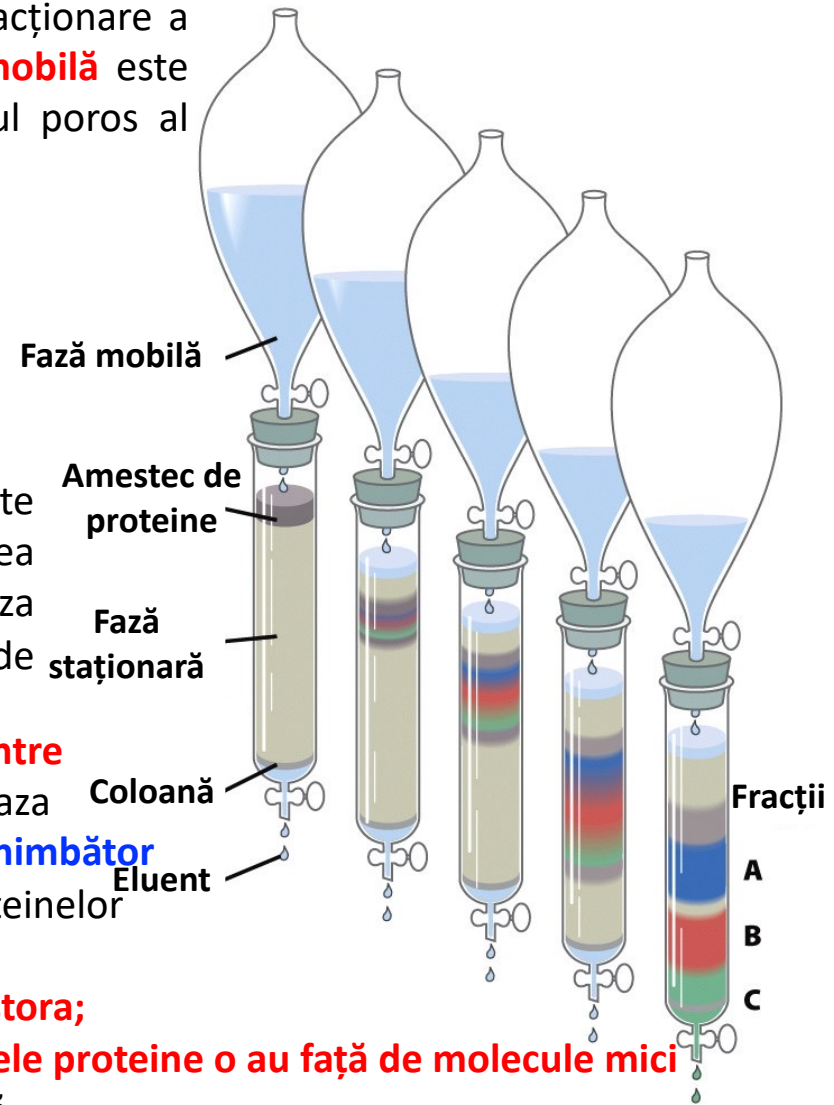
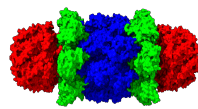


Figure 3-16
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Cromotografia ca metofă de fracționare



- Large net positive charge
- Net positive charge
- Net negative charge
- Large net negative charge

Polymer beads with negatively charged functional groups

Protein mixture is added to column containing cation exchangers.

Proteins move through the column at rates determined by their net charge at the pH being used. With cation exchangers, proteins with a more negative net charge move faster and elute earlier.

1 2 3 4 5 6

Ion-exchange chromatography

Figure 3-17a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Porous polymer beads

Protein mixture is added to column containing cross-linked polymer.

Protein molecules separate by size; larger molecules pass more freely, appearing in the earlier fractions.

1 2 3 4 5 6

Size-exclusion chromatography

Figure 3-17b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Mixture of proteins

Solution of ligand

Protein of interest

Ligand

Protein mixture is added to column containing a polymer-bound ligand specific for protein of interest.

Unwanted proteins are washed through column.

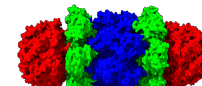
Protein of interest is eluted by ligand solution.

1 2 3 4 5 3 4 5 6 7 8

Affinity chromatography

Figure 3-17c
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Sistemele cromatografice automatizează fracționările

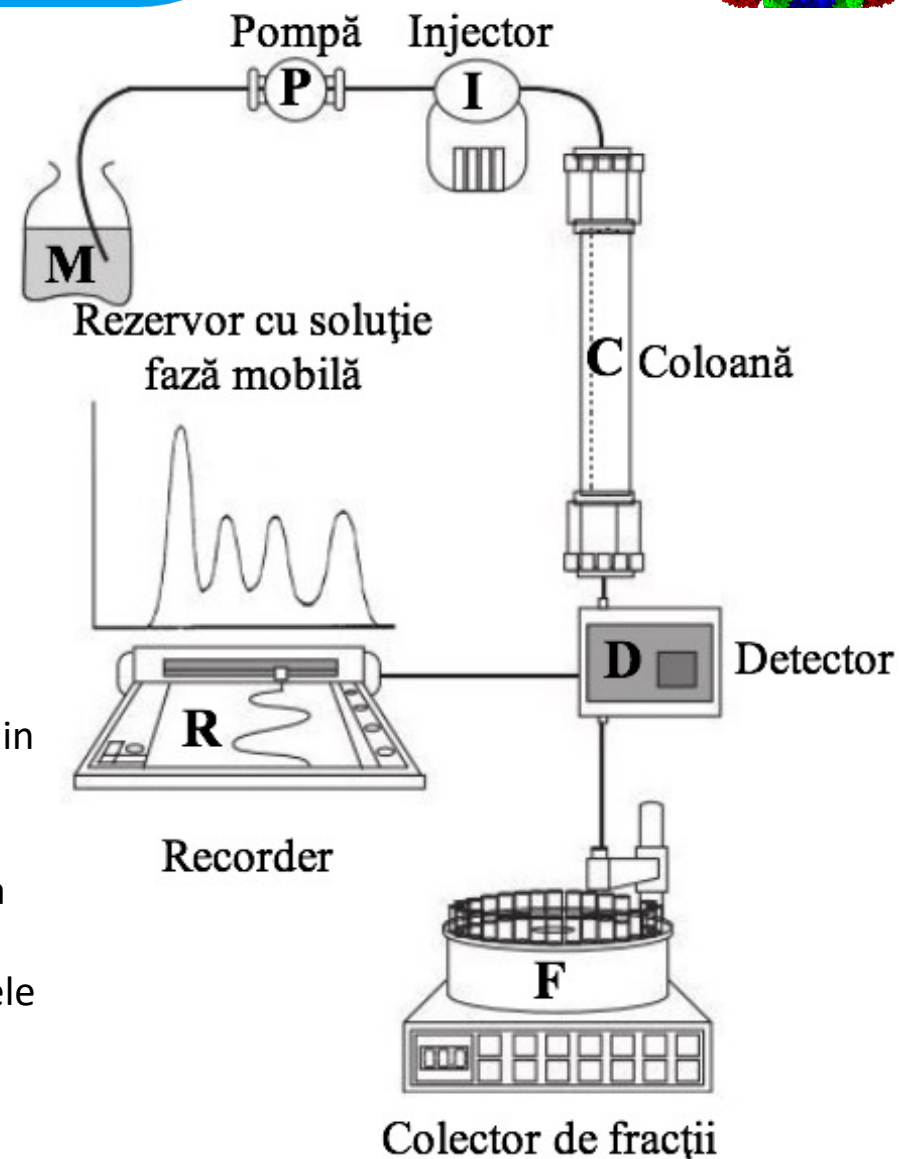


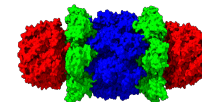
Fracționarea proteinelor folosind tehnicile cromatografice se realizează în **sisteme cromatografice** care cel mai frecvent sunt alcătuite din:

1. **rezervor** cu soluție reprezentând faza mobilă (M) – capacitatea minimă a rezervorului este dată de dimensiunile coloanei cromatografice, fiind necesar ca acesta să conțină suficientă fază mobilă pentru a permite echilibrarea coloanei și separarea cromatografică propriu-zisă;

2. **pompă (P)** – are rolul de a asigura un debit constant în timpul separării; pentru GF este suficientă o pompă peristaltică simplă, deoarece presiunile atinse în coloană sunt mici; aplicațiile mai complexe necesită o pompă cu piston sau chiar un sistem format din două sau patru pompe cu piston;

3. **injector (I)** – permite injectarea probei de analizat în coloană la momentul stabilit de utilizator. În cazul instrumentelor moderne injector este înlocuit de un autosampler ce încarcă automat probele de analizat;



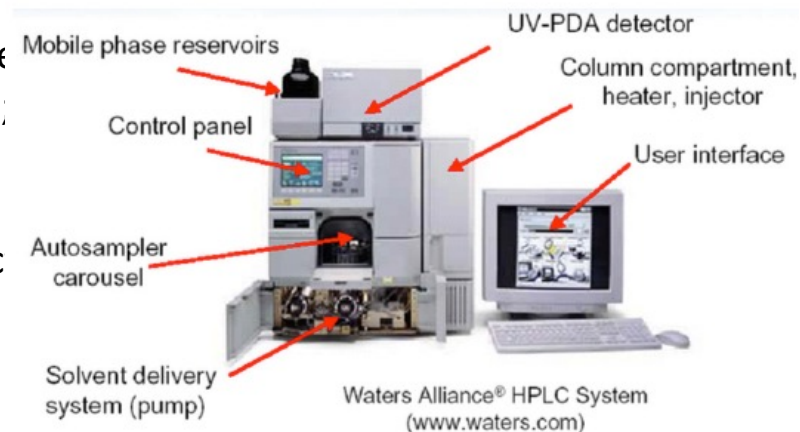


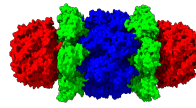
4. **coloana cromatografică** (C) – este elementul în care se realizează propriu-zis separarea; coloanele cromatografice conțin diverse tipuri de faza staționară, funcție de tipul de separare (SEC; HILIC; RPLC, HIC, IEX);

5. **detector** (D) – permite monitorizarea în timp real a concentrației proteine din faza mobilă la ieșirea din coloana cromatografică și detec momentului în care proteina investigată este eluată;

6. **colector de fracții** (F) – permite colectarea fracționată automată în eprubete separate a eluentului de pe coloană; nu este obligatoriu, sistemele cromatografice pot fi conectate direct la un spectrometru de masă;

7. **aparat de înregistrare** (recorder (R)) – are rolul de a prelua și prezenta grafic valorile înregistrate de către detector; informațiile sunt prezentate sub forma unui grafic numit cromatogramă, pe abscisă (axa Ox) fiind reprezentat timpul (sau volumul), iar pe ordonată (axa Oy) extincția fazei mobile; în cazul sistemelor moderne de cromatografie, sistemul de înregistrare este înlocuit de software-ul de control al întregului sistem cromatografic; acesta permite nu doar monitorizarea, ci și ajustarea în timp real a parametrilor separării.





C. Electroforeza este o metodă de separare care **se bazează pe capacitatea particulelor coloidale sau moleculelor încărcate electric de a migra, sub influența unui câmp electric generat de doi electrozi, în direcția electrodului purtător al sarcinii opuse**. Viteza de migrare depinde în principal de dimensiunea sarcinii electrice și din acest motiv moleculele cu sarcini diferite vor avea o mobilitate electroforetică diferită, separându-se în fracții. În principiu, această metodă poate fi aplicată tuturor macromoleculelor încărcate electric.

Electroforeza nu este utilizată pentru a purifica protein în cantități mari, deoarece metodele cromatografice sunt semnificativ mai eficiente în această direcție și pentru că prin electroforeză structura tridimensională a proteinelor este în general afectată. Totuși, **metodele bazate pe electroforeză sunt extrem de folosite mai ales ca metode analitice prin care proteinele pot fi vizualizate și separate, permițând estimarea rapidă a numărului de proteine dintr-o probă sau a gradului de puritate a unei fracții**. De asemenea, **prin electroforeză se pot determina o serie de proprietăți importante ale proteinelor, precum masa moleculară relativă sau punctul isoelectric**.

Funcție de mediul în care se realizează separarea, se pot distinge 3 soluții tehnice pentru realizarea separării electroforetice a moleculelor:

- 1. Separarea în soluții tampon** – foarte puțin utilizată, importanță istorică. Reprezintă prima metodă de separare electroforetică și a fost pusă la punct de Arne Tiselius în anul 1937;
- 2. Separarea în medii stabilizatoare** (plăci cu silicagel, filme, geluri). Funcție de amplasarea fizică a mediului stabilizator, putem distinge:

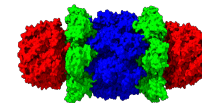
2.A. electroforeza orizontală – pentru suporturi inerte față de oxigen (hârtie, plăci de silicagel, amidon, agaroză).

2.B. electroforeza în sistem vertical - suporturi care trebuie ferite de oxigen, precum poliacrilamida. Reprezintă tipul de electroforeză standard pentru separarea proteinelor.



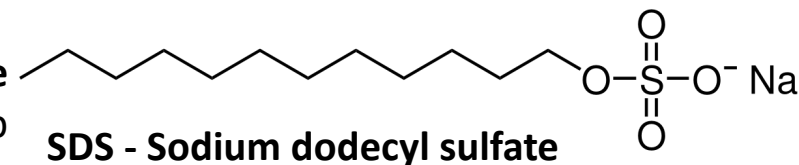
Arne Wilhelm Kaurin Tiselius
1902 - 1971

Tipuri de electroforeză - SDS-PAGE



Electroforeza proteinelor în condiții denaturante (SDS-PAGE)

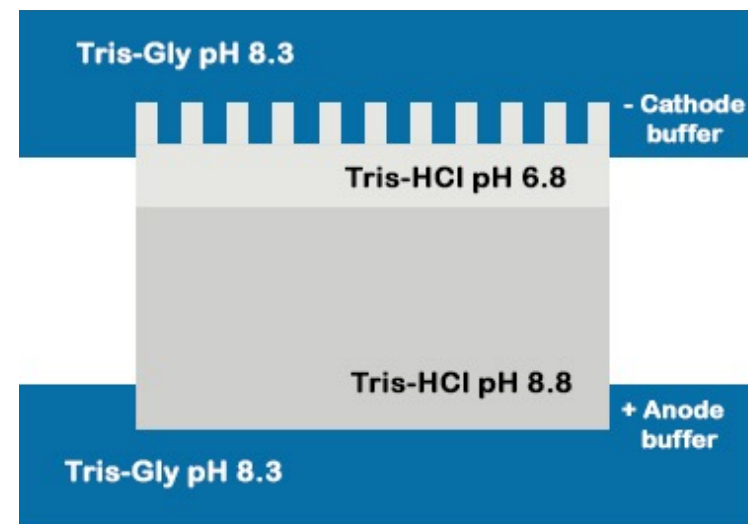
Denumirea acestei metode face referire la faptul că **moleculile proteice nu sunt separate în forma lor nativă, ci sunt denaturate** sub acțiunea temperaturii, a detergentului **SDS**-ului și agentului reducător



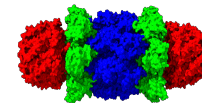
β -mercaptoetanol. Plierea tridimensională a moleculelor proteice înlăturată, proteinele fiind transformate în catenele liniare de aminoacizi. Suplimentar, **SDS-ul se fixează pe catenele polipeptidice într-o cantitate proporțională cu lungimea acestora și ecranează sarcinile datorate încărcării aminoacizilor**. Toate proteinele vor fi, prin urmare, încărcate negativ, dimensiunea sarcinii fiind direct proporțională cu cantitatea de SDS fixată, adică cu lungimea catenei. **În acest tip de electroforeză separarea se realizează în funcție de un singur parametru și anume de lungimea catenelor polipeptice, adică masa moleculară.**

Proteinele sunt separate pe geluri pe poliacrilamidă (PAGE-poliacrilamide gel electrophoresis) folosind un sistem tampon discontinuu. Discontinuitatea se referă la 4 parametri:

- porozitatea gelului** – gelul în care se realizează separarea electroforetică conține două zone de concentrații diferite, una în zona superioară de **concentrație mică** (pori de dimensiuni mari, **gel de concentrare**) și una în zona inferioară de **concentrație mare** (pori de dimensiuni mici, **gel de separare**);
- pH-ul gelului** – **gelul de concentrare are pH-ul 6,8** iar cel de **migrare are pH-ul 8,8**;



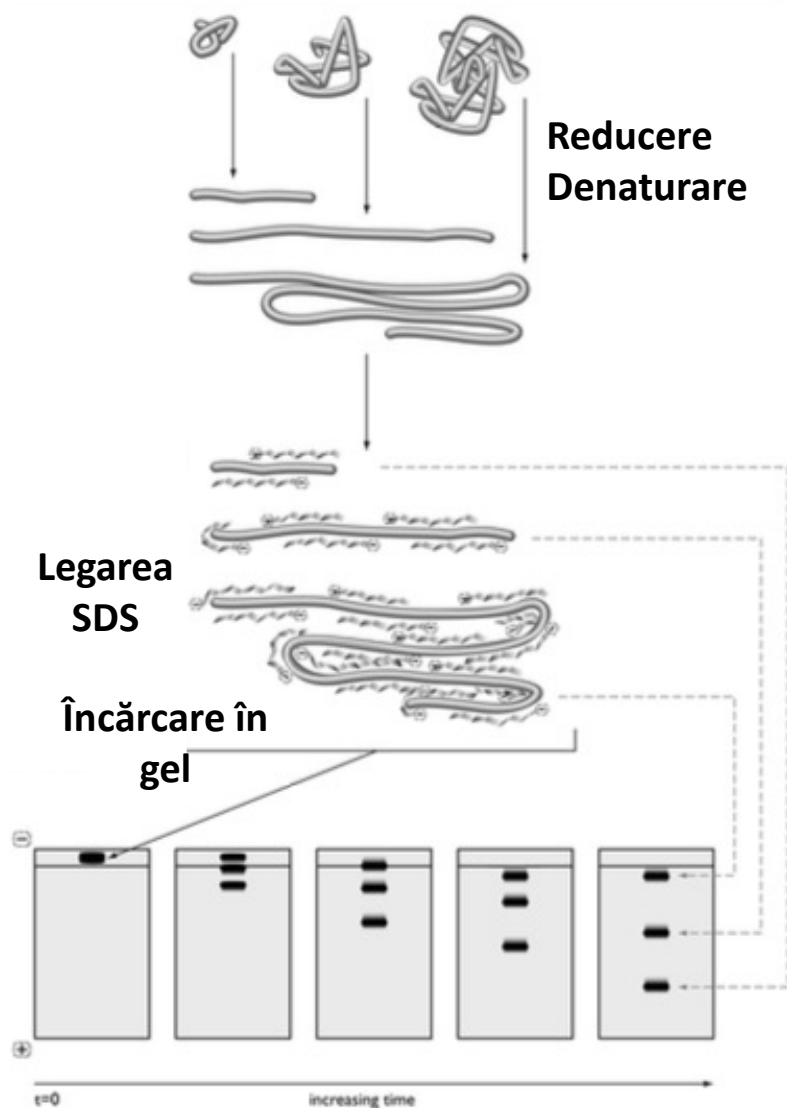
- tăria ionică a soluțiilor tampon** din interiorul gelului – gelul de concentrare conține 0,125 mol/l TRIS-HCl, iar gelul de separare 0,375 mol/l TRIS-HCl;
- natura ionilor din gel și din tamponul de electrod**; gelul conține ioni Cl⁻ iar tamponul de migrare glicină.



Separare proteinelor în sistemul discontinuu are loc în două etape, corespunzătoare celor două geluri:

1. Etapa de concentrare a fracțiilor proteice. Probele reprezentate de soluția proteică sunt plasate în gelul de concentrare, al cărui pH este de 6,8. La această valoare a pH-ului, glicina (punctul izoelectric, $pI=6,7$) este practic lipsită de sarcină electrică, iar Cl este încărcat negativ. La aplicarea curentului electric, glicina va avea o mobilitate redusă (datorită lipsei sarcinii), iar clorul va avea mobilitate maximă. Cele două molecule realizează două fronturi, unul puternic încărcat negativ și foarte mobil, și unul neutru cu mobilitate redusă. Proteinele au grade diferite de încărcare datorită interacțiunii cu gelul de poliaciamidă și vor avea mobilități intermediare, plasându-se între frontul glicinei și cel al clorului, realizând legătura între aceste două fronturi și formând așa-numitul „tren de ioni”. Când acest tren al ionilor ajunge în zona de contact dintre gelul de concentrare și cel de migrare, rezistența datorată porilor mici ai gelului de migrare crește, ceea ce duce la concentrarea proteinelor sub forma unei singure benzi foarte fine.

2. Etapa de separare a fracțiilor proteice. În gelul de separare, la pH 8,8, glicina este încărcată negativ și, datorită masei moleculare mici, continuă să migreze împreună cu frontul clorului cu o viteză relativ mare, depășind frontul proteic întârziat la intrarea în acest gel. Proteinele se desprind din trenul ionilor și se separă în funcție de sarcina electrică = masa moleculară.



Tipuri de electroforeză - SDS-PAGE

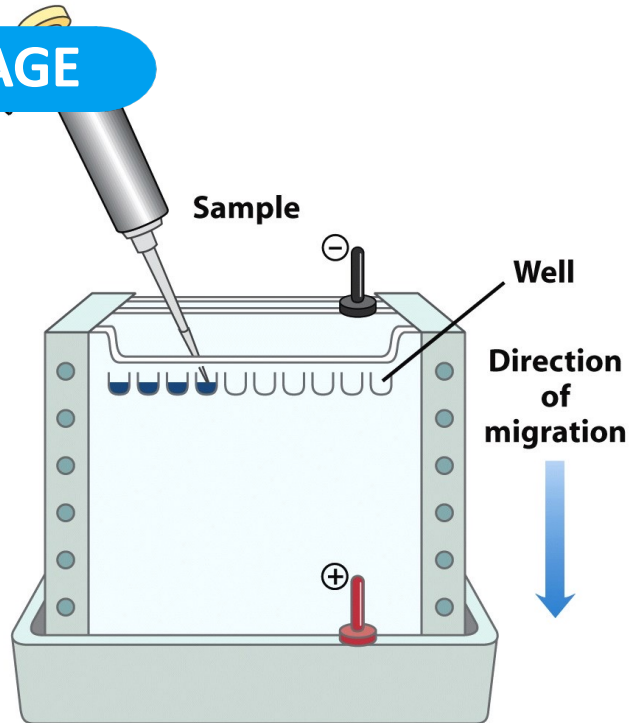
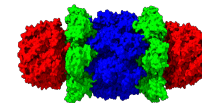


Figure 3-18a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

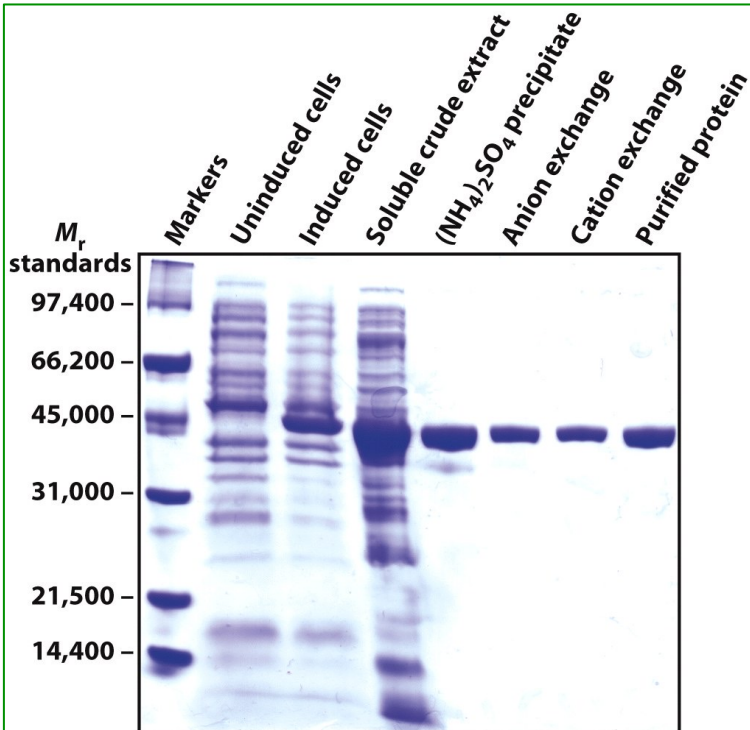


Figure 3-18b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

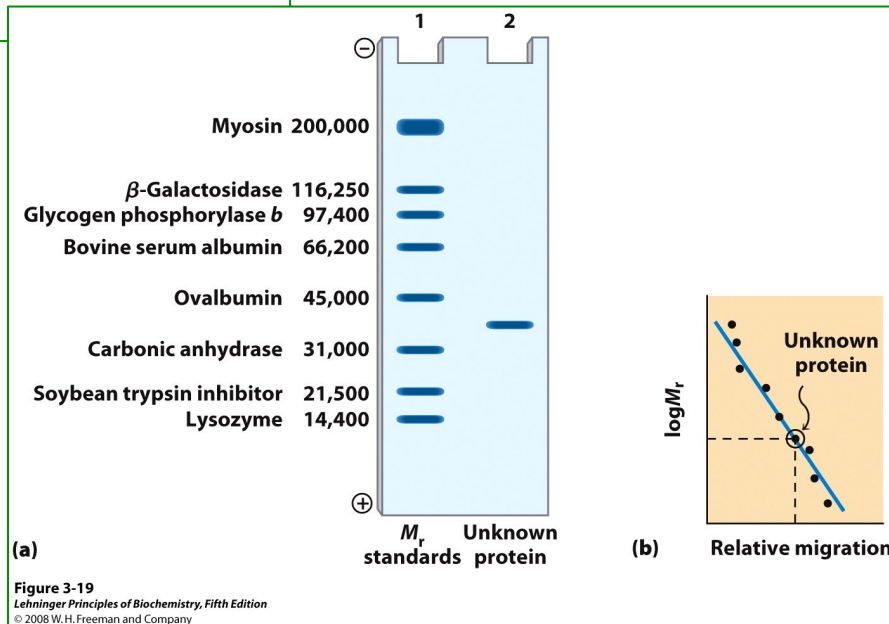
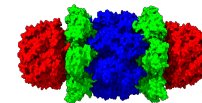


Figure 3-19
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Tipuri de electroforeză - Izoelectrofocusera



Izoelectrofocusera

O bună parte a aminoacizilor proteinogeni conțin grupe funcționale care, în anumite condiții pot ioniza, și deci care pot genera sarcini electrice (COOH în COO^- , $-\text{NH}_3$ în $-\text{NH}_4^+$). De asemenea, MPT-urile pot introduce grupe funcționale ionizabile pe suprafața moleculelor proteice (PO_4^-) și astfel genera sarcini. Ionizarea acestor grupe este influențată de pH-ul soluției, în sensul în care **la valori de pH mici**, majoritatea grupelor funcționale ce pot accepta H^+ îi vor accepta și vor deveni **neutre sau pozitive**. **La valori mari de pH**, majoritatea grupelor funcționale ce pot ceda H^+ îi vor ceda și vor deveni **neutre sau negative**. Fiecare grupă funcțională se caracterizează astfel

printr-o valoare specifică de pH ionizează, valoare de pH care se notează $\text{p}K_A$. Grupele funcționale ionizabile din structura aminoacizilor se influențează reciproc, ceea ce face ca fiecare aminoacid să fie caracterizat **printr-o valoare unică de pH la care nici una dintre grupele funcționale nu sunt încărcate electric, aminoacidul fiind lipsit de sarcină – punct izoelectric, pI** .

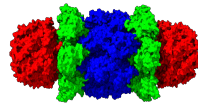
Același lucru este valabil și pentru proteine. În cazul lor, grupele funcționale de la suprafața moleculelor proteice pot ioniza și deci genera sarcini. Interacțiunea dintre grupele funcționale ionizabile de la suprafața moleculei proteice face ca fiecare proteină să fie caracterizată de un pI unic. Funcție de valoarea acestuia, proteinele se pot împărți în:

- A. **proteine acide**, $\text{pI} < 7$,
- B. **Proteine bazice**, $\text{pI} > 7$.

TABLE 3-6		The Isoelectric Points of Some Proteins	
Protein			pI
Pepsin			<1.0
Egg albumin			4.6
Serum albumin			4.9
Urease			5.0
β -Lactoglobulin			5.2
Hemoglobin			6.8
Myoglobin			7.0
Chymotrypsinogen			9.5
Cytochrome c			10.7
Lysozyme			11.0

Table 3-6
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

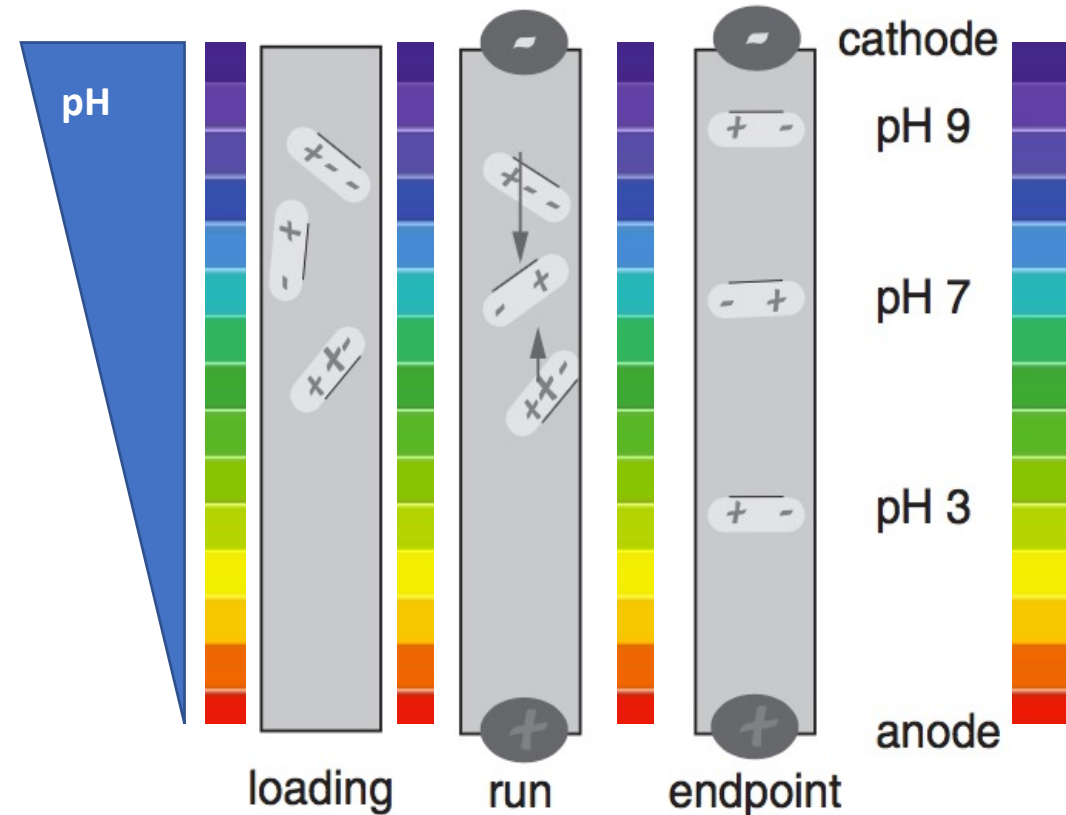
Tipuri de electroforeză - Izoelectrofocuseria

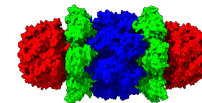


Indiferent de tipul lor, **proteinele vor fi deci încărcate pozitiv la valori de pH mai mici decât pI, încărcate negativ la valori de pH mai mari decât pI și neutre la pI**. Pe această variabilitate a sarcinii proteinelor funcție de pH la care sunt expuse se bazează metoda de fracționare numită - **izoelectrofocuseria**.

Izoelectrofocuseria reprezintă o metodă de fracționare și separarea a proteinelor funcție de valoarea pI-ului acestora. Propriu-zis, **proteinele sunt amplasate în geluri în**

care a fost generat în prealabil un gradient de pH. Prin aplicarea curentului electric, **proteinele se deplasează spre unul dintre electrozi, funcție de sarcina lor**. În deplasarea lor spre electrozi, proteinele trec prin zone ale gelului cu valori diferite de pH și sarcina lor se modifică corespunzător. Atunci când **o moleculă proteică ajunge în zona gelului ce are un pH egal ca valoare cu pI-ul său**, sarcina proteinei devine nulă și aceasta **nu se mai deplasează**. Indiferent de timpul de aplicare al curentului electric, o moleculă proteică ajunsă la pI-ul său nu se va mai deplasa în gel. Prin aplicarea îndelungată a curentului electric, toate moleculele proteice cu același pI, indiferent de secvență și locul unde erau amplasate în gel la începutul separării, vor migra și se vor concentra în aceeași zonă – denumirea tehnicii de **izoelectrofocuseria**.





Electroforeza 2D-PAGE

Electroforeza 2D-PAGE este o metodă de separare a proteinelor în geluri de poliacrilamidă (**polyacrylamide gel electrophoresis - PAGE**) care combină principiile descrise anterior pentru a separa amestecurile proteice funcție de 2 parametri sau dimensiuni (2D):

A. punctul izoelectric – printr-o etapă inițială de izoelectrofoculare

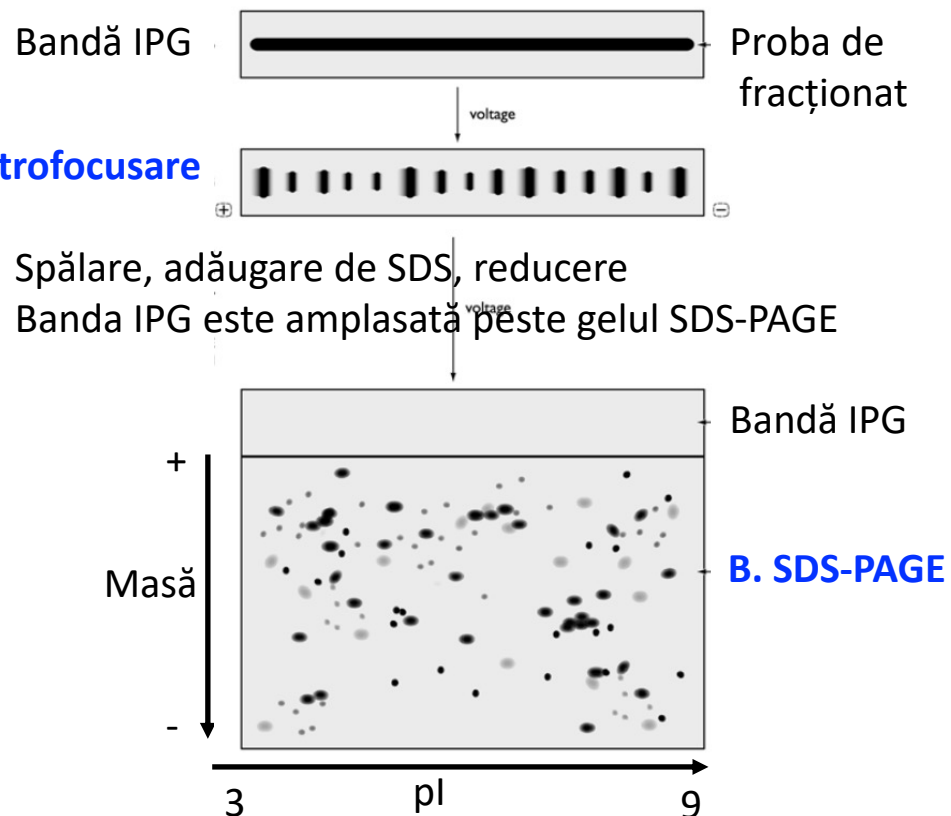
B. masă moleculară - printr-o etapă de SDS-PAGE.

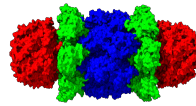
Deși principiile și metoda în sine a fost introdusă încă din anii 70, aceasta nu a fost utilizată foarte intens datorită dificultăților tehnice întâmpinate în:

A. Izelectrofoculare

- realizarea într-o manieră repetabilă a gradientului de pH;
- atașarea gelului pentru electrofoculare peste gelul SDS-PAGE și tranferul proteinelor dintr-un gel în altul.

În prezent, prin utilizarea în etapa de electrofoculare a unor benzi de gel în care compușii ce generează gradientul de pH sunt imobilizați pe un gel de acrilamidă (**benzi IPG – imobilized pH Gradient**), 2D-PAGE a devenit metoda de referință pentru studiile de proteomică, ea permițând inclusiv separarea moleculelor proteice cu aceeași secvență, dar cu MPT diferite (Ex. diverse nivele de fosforilare)





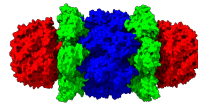
Pentru evidențierea proteinelor separate pe gelurile de poliacrilamidă au fost descrise numeroase protocoale ce pot fi împărțite în două categorii mari:

1. **colorații specifice** cu care sunt evidențiate doar anumite fracțiuni din toate proteinele separate; aceste colorații se folosesc în special pentru evidențierea unor enzime;
2. **colorații nespecifice** care realizează colorarea uniformă a tuturor proteinelor separate. Diversele metode de colorare nespecifică diferă între ele prin nivelul de sensibilitate și prin complexitatea. Indiferent de metoda de colorare, la bază stă reacția unui reactiv de culoare cu resturi specifice de aminoacizi din catena polipeptidică (ex. nucleeele aromatice). Din acest motiv intensitatea culorii nu depinde doar de cantitatea de proteină din gel, ci și de secvența de aminoacizi a proteinei colorate.

3. Evidențierea imunologică

Tehnicile imunologice și-au găsit un număr foarte mare de utilizări în biologia moleculară, având aplicații diverse, de la identificarea proteinelor cu ajutorul anticorpilor până la purificarea proteinelor prin imunoprecipitare sau cromatografie de imunoafinitate. În cele ce urmează sunt prezentate tehnicile ce stau la baza metodei cunoscute sub numele general de **Western-blot**, metodă ce are ca scop evidențierea și identificarea specifică a moleculelor proteice transferate pe membrane. La baza acestei tehnici stau anticorpul și proprietățile acestora.

Anticorpul sunt proteine serice care apar în organism ca răspuns la pătrunderea antigenelor și au capacitatea de a reacționa specific atât „in vivo” cât și „in vitro” cu antigenele care le-au indus apariția. Anticorpul policlonali sunt molecule de imunoglobuline (Ig) produse de diferite tipuri de limfocite B ca urmare a stimulării cu un antigen specific ce prezintă mai mulți epitopi diferiți. Spre deosebire de anticorpul monoclonali produși de un singur tip de limfocit B față de un singur epitop specific, cei policlonali reprezintă un amestec de anticorpi, fiecare fiind determinat și capabil să reacționeze specific cu un anumit epitop din structura antigenului.



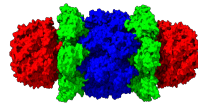
Imunobloting-ul

Tehnicile de imunobloting sau Western blotting-ul se utilizează în scopul identificării unor proteine recunoscute specific de anticorpi monoclonali sau policlonali.

În scopul identificării, **proteinele sunt separate electroforetic folosind SDS-PAGE**, după care sunt **transferate pe membrane de nitroceluloză, nailon sau difluorură de poliviniliden**.

Imuno-deteția propriu-zisă constă în tratarea membranei cu un **anticorp primar** care se leagă specific de proteina de interes. Siturile de legare rămase libere sunt apoi blocate prin imersarea membranei într-o soluție ce conține un agent de blocare (o proteină sau un detergent inert din punct de vedere imunologic). Membrana este spălată și apoi tratată cu un **anticorp secundar anti-IgG** ce se va lega de anticorpul primar. **Anticorpul secundar este modificat în mod specific, în sensul că este cuplat cu o enzimă ce poate genera în prezența unui substrat cromogen, produs colorat ce marchează prezența proteinei de interes.**

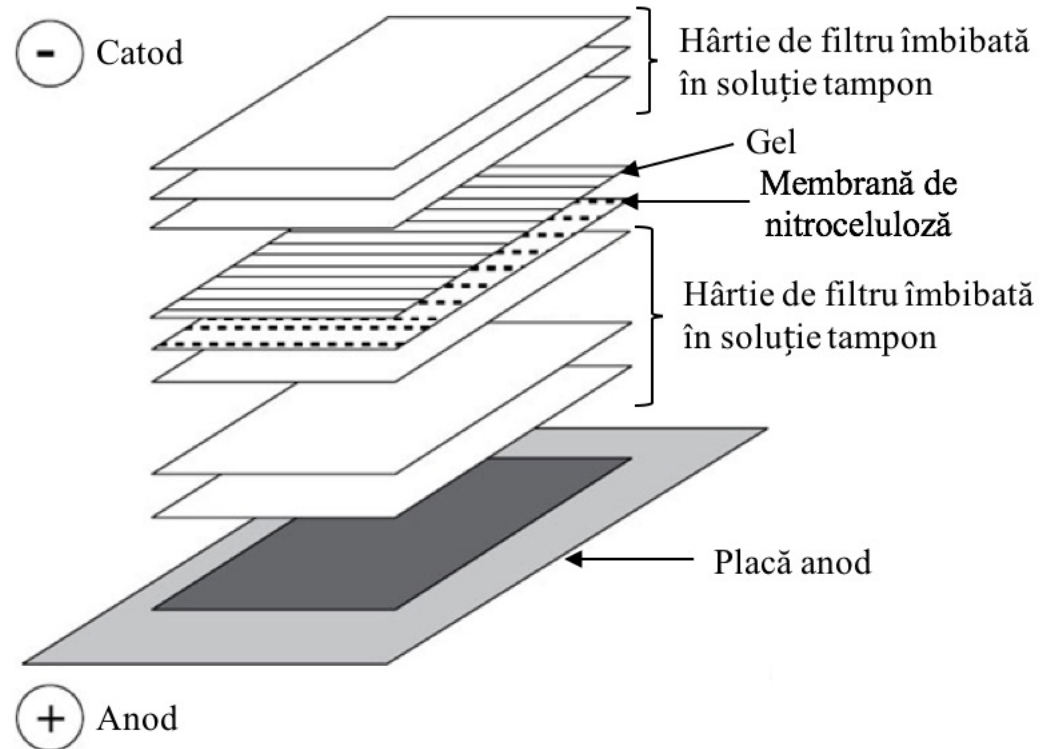
O variantă mai simplă de imunobloting este reprezentată de **dot-blot**. În acest caz proteinele de interes nu mai sunt separate electroforetic, ci sunt depuse direct pe membrană sub forma unui punct (**dot, spot**). Dot-blot-ul este o tehnică preliminară folosită pentru a identifica prezența unui antigen specific într-o probă.



Imunobloting-ul presupune parcurgerea a 2 etape distincte:

a. Electro-transferul proteinelor pe membrane

O metodă eficientă de transfer a majorității proteinelor din gelul de poliacrilamidă pe membrane diverse este reprezentată de **blot-ul semi-uscat**. În acest caz, gelul de poliacrilamidă este plasat orizontal, peste membrană, între foi de hârtie de filtru saturate cu soluție tampon. Electrozii sunt puși în contact direct cu foile de hârtie de filtru, foarte aproape unul de celălalt. Prin aplicarea unui curent de la o sursă de curent standard precum cea utilizată pentru electroforeză, proteinele încărcate negativ vor migra rapid din pe gelul de poliacrilamidă pe membrana.



a. Imunodetecția proteinelor transferate pe membrane de nitroceluloză

