

PROTEİNLERİN TANIMLANMASI ve TAYİN YÖNEMLERİ

Dr.Ozem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

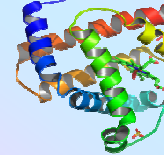
1

Genel Bakış

- Proteinler, amino asitlerin belirli türde, belirli sayıda ve belirli diziliş sırasında karakteristik düz zincirde birbirlerine kovalent bağlanmasıyla oluşmuş polipeptitlerdir.



- Proteinler, bütün hücrelerde ve hücrelerin bütün kısımlarında bulunurlar; bir bakteri hücresinde yaklaşık 4000 tür protein bulunmaktadır.
- Myoglobin in 3D yapısı



Dr.Ozem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

2

Genel Bakış

- Yaşamsal bütün işlevler proteinlere bağlıdır.

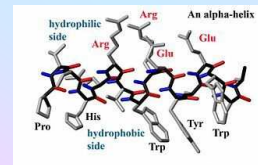
Enzim	katalizör
Membran proteini.....	madde iletimi
Reseptör	madde iletimi
Antikor	savunma
Zehir ve antibiyotikler	savunma
Aktin, miyosin ve flagellin	hareket
Büyüme faktörleri.....	gelişme
Hormonlar	haberleşme

Dr.Ozem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

3

Proteinlerin yapılarında,

- kovalent bağlar**; peptit bağları ve disülfid bağlarıdır;
- kovalent olmayan bağlar**; hidrojen bağları, iyon bağları ve hidrofob bağlar (apolar bağlar) dir.

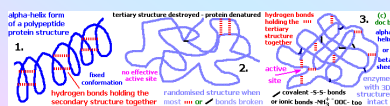


Dr.Ozem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

4

Protein moleküllerinin yapısı ve konformasyonu

Proteinlerde birinci (primer), ikinci (sekonder), üçüncü (tersiyer), dördüncü (kuarterner) yapı diye dört yapı tanımlanır:



Dr.Ozem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

5



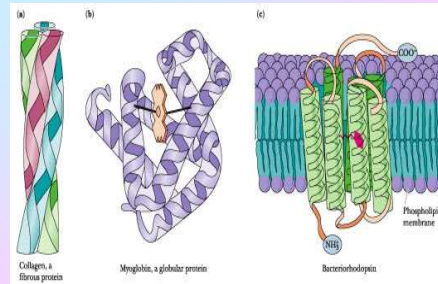
Dr.Ozem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

6

PROTEİNLERİN ÇEŞİTLİ ÖZELLİKLERİ

- Proteinler, çeşitli etkilerle denatüre olurlar.
- Proteinler, amfoter maddeler yani amfoter elektrolit veya amfollitler; hem asit hem baz gibi davranma özellikleri vardır.
- Proteinler Yapılarına Göre;
 - Fibriler proteinler: keratin, kollajen, elastin, ipek fibroini, fibrinojen, miyozin
 - Globüler proteinler: albüminler, globülinler, globinler, glutelinler, prolaminler, protaminler, histonlar
 - Membran proteinleri: Glikoproteinler, Proteoglikanlar, Lipoproteinler, Fosfoproteinler, Nükleoproteinler, Metalloproteinler

7

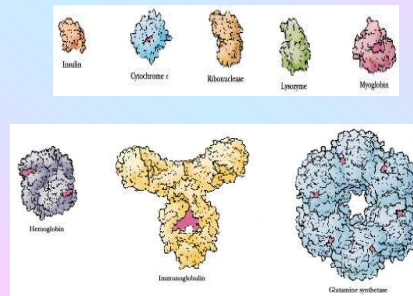


8

Proteinlerin Molekül Ağırlıkları

Protein	M _r
Insulin (bovine)	5,733
Cytochrome c (equine)	12,500
Ribonuclease A (bovine pancreas)	12,640
Lysozyme (egg white)	13,930
Myoglobin (horse)	16,980
Chymotrypsin (bovine pancreas)	22,600
Hemoglobin (human)	64,500
Serum albumin (human)	68,500
Hexokinase (yeast)	96,000
γ-Globulin (horse)	149,900
Glutamate dehydrogenase (liver)	332,694
Myoisin (rabbit)	470,000
Ribulose biphosphate carboxylase (spinach)	560,000
Glutamine synthetase (E. coli)	600,000

9



Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

10

Protein Tayini

Protein analizleri, fen bilimleri araştırmaları ve farmasötik endüstrisinde önemli bir araç olarak karşımıza çıkar.

Protein Analizinin Amaçları:

- Hastalıkların Kesin Tanısının Konmasında
 - Kalıtım tipinin belirlenmesi (X'e bağlı, dominant)
 - Gendeki mutasyonların araştırılmasında nereden başlanması gerektiğinin belirlenmesi
- Bazı durumlarda prognosis için yardımcı
 - Mutasyon tipinin belirlenmesi (ör: çerçeve kayması)
 - Gen terapi için hayvan modellerinin geliştirilmesi

11

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

Protein Tayini

- Mutasyonları içeren işlevsel olarak önemli bölgelerin yerleşimlerinin belirlenmesi
- Birbirleriyle etkileşim içinde olan proteinlerin tanımlanması
- En çok karşımıza çıkan çalışma alanları ELISA (Enzyme linked Immuno-Sorbent Assays) ve Kütle Spektrometrisi (MS)'dir.

12

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

ELISA: hedef bir molekülü spesifik olarak tanıyan ve bağlanan antikolar, enzimler ile kombine kullanılarak bağlanma olayı sonrasında hedef molekülün pikogram düzeyine kadar saptanmasında kullanılır.

Kullanım Alanları:

- Potansiyel ilaç adaylarının optimizasyonu ve sınıflandırılması
- Klinik öncesinde hayvansal çalışmalarda ve klinikte insan kaynaklı örneklerin araştırılması
- Endüstride ürünlerin test edilmesi (kalite kontrol)

13

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

Protein kaynağı olarak;

•Hayvansal dokular, kan, plasenta, bitkisel dokular, algler, küf, maya, mantar ve bakteriler kullanılmaktadır.

•Proteinin izolasyonu yapmak için, ham bir tam hücre ekstraktından, biyolojik aktivite kaybı olmaksızın hücre fraksiyonunun seçilmesi gerekmektedir.

14

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

PROTEİN TAYİN YÖNTEMLERİ

Protein miktar tayini deneylerinde her zaman göz önünde bulundurulması gereken temel bazı hususlar vardır.

- ⊙ Kullandığınız cam malzeme ve diğer malzemelerin temiz olmasına özen gösteriniz.
- ⊙ Küvetlerin (kuvars veya plastik) temiz olduğundan emin olunuz.
- ⊙ Protein miktar tayini denemelerinin örneğinizdeki proteinlerin kompozisyonuna bağlı olduğunu her zaman göz önünde bulundurunuz.
- ⊙ Denemeye başlamadan önce kullanacağınız spektrofotometrenin limitlerini biliniz.
- ⊙ Her zaman ölçüm yapmadan önce spektrofotometrenin 15–20 dakika ısınmasına izin veriniz.

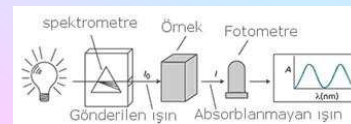
15

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

Spektrofotometre

Fotometrik tayinler bir numuneye giren ışıkla, çıkan ışığın şiddeti arasındaki oranın ölçülmesine dayanır.

- bir kaynaktan çıkan ışık paralel bir demet haline getirilir, bir monokromatörden (prizma) geçirilir ve absorpsiyonun meydana geldiği küvete girer.
- Küvetten çıkan ışık demeti, gelen ışık demetinin şiddeti ile orantılı bir elektrik sinyal oluşturan fotoelektrik dedektöre çarpar.
- Her atom, molekül veya kimyasal bağın kendine özel spesifik bir ışık dalga boyu absorpsiyonu vardır.
- Spektrofotometre çözeltiye bilinen spesifik bir dalga boyu ışığını gönderip, bu ışığın ne kadarının absorbe olduğunu ve ne kadarının yayıldığını ölçen bir alettir.
- Bu ölçümlerde bir kimyasalın ne miktarda bulunduğunu hesaplayabiliriz.



16

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

Standart Eğri

Protein miktar tayini denemelerinde çoğu zaman protein karışımlarının veya ektinksiyon katsayısı bilinmeyen proteinlerin miktarları tayin edilmek istenir. Bu durumda miktarı bilinen saf bir protein “standart” olarak kullanılmak suretiyle bir standart eğri oluşturulur.

17

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

Standart Eğri nasıl hazırlanır ve dikkat edilecek hususlar ?

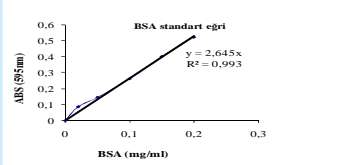
- ♣ Hazırlayacağınız standart eğrinin miktarı bilinmeyen protein örneğinizdeki protein miktarını içerisine alacak şekilde olmasına dikkat ediniz.
- ♣ Standart eğriyi hazırlarken, örneğinizin içinde bulunduğu tampon çözeltiyi kullanınız ve tampon çözeltinin içerebileceği safsızlıkları bertaraf etmek için tampon çözeltinin absorpsiyonunu örneklerinizin absorpsiyonundan çıkartınız.
- ♣ Standart eğriyi hazırlarken aynı stok çözeltiden seyreltilerek hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda standartlar kullanınız.
- ♣ Standart eğri grafiğini çizerken protein konsantrasyonunu x-, absorpsiyonu y- eksenine yerleştiriniz.
- ♣ Hatalara yer vermemek için standart eğride konsantrasyon yerine mikrogram miktarları kullanınız

18

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

Standart Eğri

y eksenini (abs)	x eksenini(mg/ml)
0,1	0,2
0,2	0,8
0,3	1,2
0,4	1,8
0,5	2,0



Bu standart eğri için uygun eğri eşitliği: $y = 2,645x$
Burada x değerleri μg protein ve x değerleri A_{290} a karşılık gelmektedir.
[mg/ml Protein= $2,645 \times [A_{290}]$]

Dolayısı ile eğri eşitliğinde okunan absorbansın direk olarak yerine konması ile protein miktarı hesaplanabilir.

19

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

DENEYSEL YÖNTEMLER**1- Proteinlerin izoelektrik noktaları tayini**

Proteinlerin izoelektrik noktaları değişik yöntemlerle tayin edilebilir. Değişik pH değerlerindeki Asetik asit/Asetat tamponlarından alınan belirli hacime eşit miktarda kazein katılır. En fazla protein çökelen çözeltinin pH'sı kazeinin izoelektrik pH'sıdır.

Reaktifler:

Kazein Çözeltisi: 20gr/lt (0,4 M sodyum asetatta hazırlanır)

Asetik asit: 1 M

Asetik asit:0,1 M

20

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

Metot**Protein Çöktürmesi:**

Numaralandırılmış 9 santrifüj tüpüne aşağıdaki tabloda belirtilen şekilde doldurulup iyice çalkalanır.

Tüp No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Asetik asit (ml)	0,1	0,3	0,5	1,0	2,0	4,0	-	-	-
Asetik asit (ml)	-	-	-	-	-	-	0,8	1,6	3,2
Destile su (ml)	4,4	4,2	4,0	3,5	2,5	0,5	3,7	2,9	1,3
Kazein Çözeltisi (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Çökelme veya Bulanıklık									
pH değeri									

21

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

15 dk sonra tüplerdeki bulanıklık veya çökelti düzeyi göz ile izlenir ve tabloya aşağıdaki şekilde işlenir:

(O) : Çökelti ve bulanıklık yok

(+) : Az bulanıklık var

+ : Belirli bulanıklık var

++ : Şiddetli bulanıklık var

+++ : Çökelti var

22

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{C_{\text{baz}}}{C_{\text{asit}}} \right) \quad [\text{pK2 (Asetik asit): 4,76}]$$

C_{baz} : Tüm tüplerde sabit ve 0,04 M'dır.

C_{asit} : Değişkendir.

Örneğin 1. Tüpteki çözeltinin pH'sı şu şekilde hesaplanır:

1. Tüpteki sıvı hacmi (toplam) : 5 ml

İlave edilen 0,1 M asetik asit hacmi : 0,1 ml

Seyrelme faktörü : 5/0,1=50

Tüpteki asetik asit konsantrasyonu : 0,1/50=0,002 M'dır.

Yukarıdaki denklemde bu değer yerine konduğunda;

$$\text{pH} = 4,76 + \log 0,04/0,002 = 4,76/1,3 = 6,06 \text{ bulunur.}$$

Kazeinin en az çözüldüğü ve protein miktarının en yüksek bulunduğu tüpten alınan üst fazın pH değeri izoelektrik pH değeridir.

23

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

Protein miktarı tayini (Bradford)

1ml serum, Bradford reaktifi, deney tüpleri

Metot

Standart	Kör	Örnek	
	0,1 ml		Destile su
0,1 ml			Standart çözeltisi
		0,1 ml	Örnek çözeltisi
2 ml	2 ml	2 ml	Bradford reaktifi
Tüpler karıştırılıp 10 dk. oda sıcaklığında bekletilir.			
595 nm'de absorbanslar okunur.			

24

Dr.Ozlem İmamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

Standart stok çözeltisi 10mg/ml olarak hazırlanır.

Standart Çözeltisi (BSA)	Konsantrasyon (mg/ml)
1	0,02
2	0,05
3	0,10
4	0,15
5	0,20

Dr.Ozlem Imamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

25

Serum örneğinin içerdiği protein miktarı, spektrofotometrik olarak 595 nm de ölçülen absorpsiyon değerinin, standart eğriden elde edilen formülde yerine konulması ile hesaplanır.

Dr.Ozlem Imamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

26

Tanıyan Bilir. Tanımayan Öğrenir

Dr.Ozlem Imamoglu, Muğla Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Biyokimya Lab.

27