

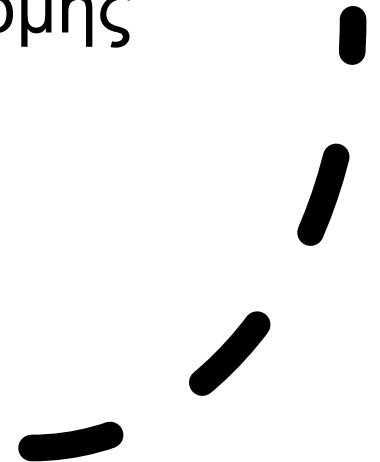


# Καθαρισμός-Απομόνωση και Επίλυση Δομής Πρωτεϊνών

Διάλεξη 5<sup>η</sup>

# Βασικά σημεία διάλεξης

- Τεχνικές καθαρισμού πρωτεϊνών
- Ταυτοποίηση πρωτεϊνών
- Προσδιορισμός 3D δομής πρωτεϊνών

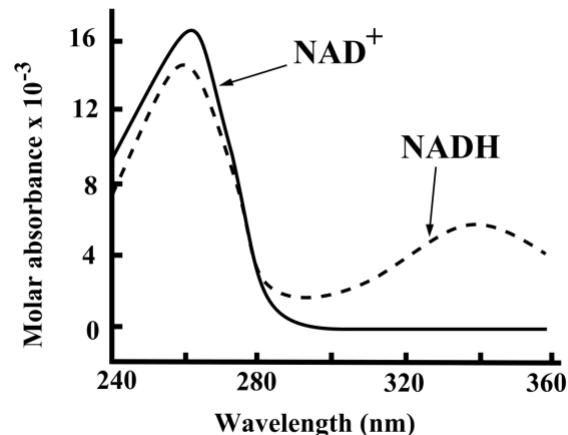
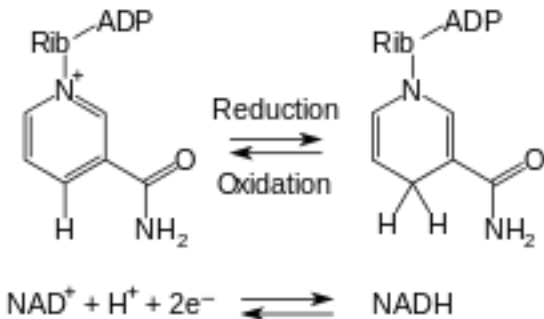


# Ειδική δραστηριότητα

- Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας (θετικό αποτέλεσμα δείχνει την παρουσία μιας πρωτεΐνης) (A)
- Μέτρηση συγκέντρωσης ή μάζας ολικής πρωτεΐνης στο δείγμα (B)
- Ειδική δραστηριότητα =  $A/B$   $\uparrow$  κατά τον καθαρισμό



Απορρόφηση  
στα 340 nm



Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοσίδιο

# Διαδικασία καθαρισμού πρωτεϊνών

Η ακολουθία των βημάτων για τον καθαρισμό μιας πρωτεΐνης **είναι μοναδική** γι' αυτήν την πρωτεΐνη (λόγω διαφορών στις φυσικοχημικές ιδιότητες)

Ωστόσο πολλά χαρακτηριστικά της διαδικασίας καθαρισμού είναι κοινά πχ εκκίνηση διαδικασίας με τη λύση / διάρρηξη των κυττάρων.



Διαχωρισμός/  
καθαρισμός  
πρωτεϊνών

με βάση  
ιδιότητες όπως:

- διαλυτότητα
- μέγεθος
- φορτίο
- ικανότητα δέσμευσης  
τους σε διάφορα μόρια

# Διάρρηξη / λύση κυττάρων και ομογενοποίηση δείγματος

- Με χρήση ομογενοποιητή υπερήχων
- Συχνότητα 20-50 kHz
- Συνήθως παλμική εφαρμογή υπερήχων
- Σύθλιψη κυττάρων και απλευθέρωση ενδοκυττάριου υλικού στο διάλυμα.
- Πρόβλημα αποτελεί η αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος.



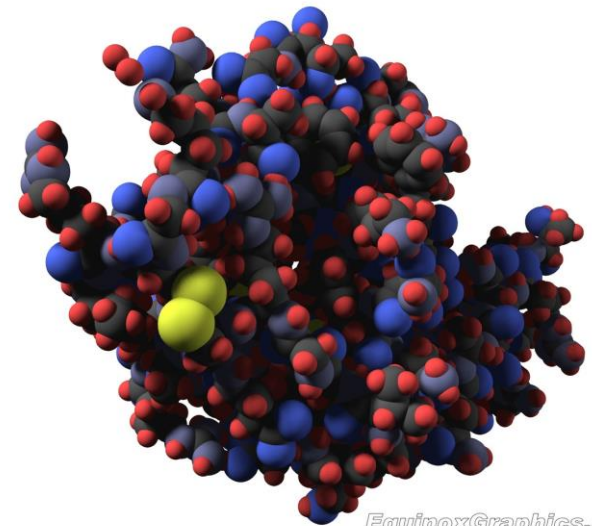
# Διάρρηξη /λύση κυττάρων και ομογενοποίηση δείγματος

- Με χρήση μηχανικού ομογενοποιητή
- Περιστροφή λεπίδων με ταχύτητα
- Γίνεται χρήση και εμβόλων (teflon) με λεπίδες.
- Σύνθληψη κυττάρων του ιστού και απλευθέρωση ενδοκυττάριου υλικού στο διάλυμα.



# Διάρρηξη / λύση κυττάρων και ομογενοποίηση δείγματος

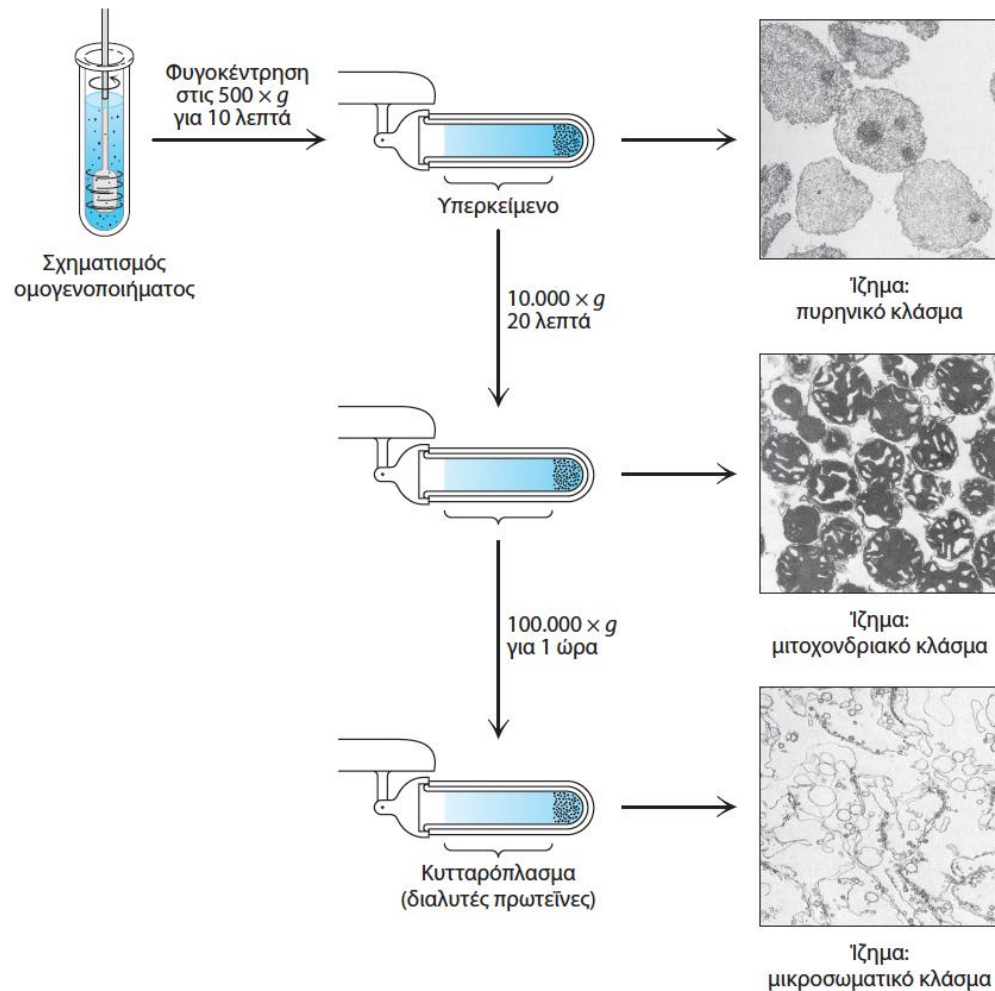
- **Με χρήση Ενζύμων**
- Τα ένζυμα επιδρούν στο κυτταρικό τοίχωμα
- Παραδείγματα εμπορικά διαθέσιμων ενζύμων λυσοζύμη, κυτταρίνες, πρωτεάσες, κοκ
- Εφαρμογή σε κατάλληλες συγκεντρώσεις στο δείγμα.





# Διαφορική φυγοκέντρηση

- Κλασμάτωση με φυγοκέντρηση
- Διαλυτό / αδιάλυτο κλάσμα



**Εικόνα 3.1 Διαφορική φυγοκέντρηση.** Τα κύτταρα διαλύονται στον ομογενοποιητή και το μείγμα που προκύπτει, που ονομάζεται ομογενοποίηση, υπόκειται σταδιακά σε συνεχώς αυξανόμενη φυγόκεντρο δύναμη. Όσο πυκνότερο είναι το υλικό τόσο μικρότερη φυγόκεντρος δύναμη απαιτείται για την καταβύθισή του ως ίζημα στον πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρησης. Διαχωρίζοντας τα κλάσματα της φυγοκέντρησης μπορούμε να συνεχίσουμε τον καθαρισμό των μορίων με άλλες μεθόδους. [Οι φωτογραφίες είναι ευγενική προσφορά των Dr. S. Fleischer και Dr. B. Fleischer.]

# Διαφορική φυγοκέντρηση



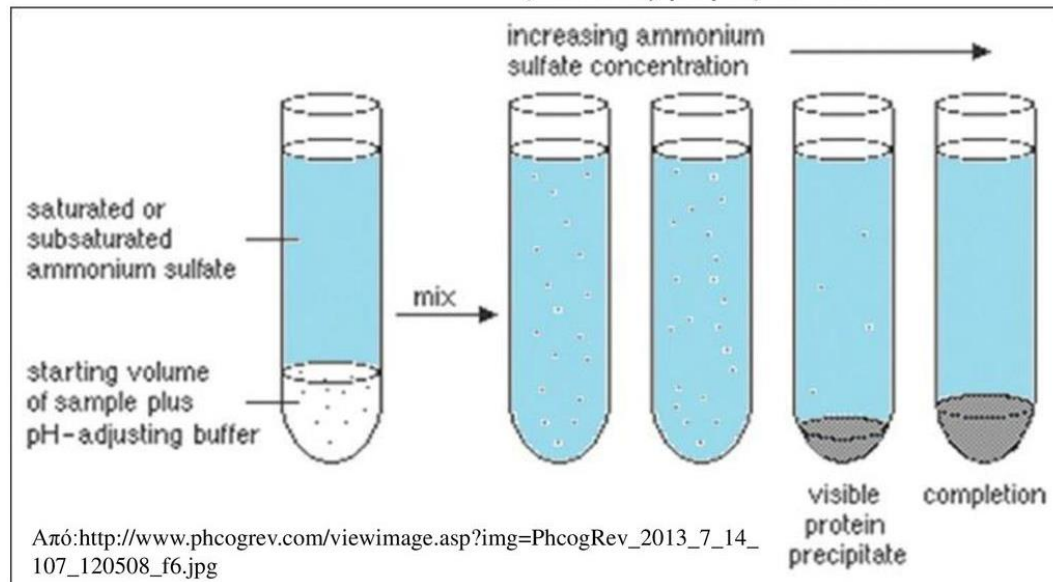
A microscopic image showing a cell being fractionated. The cell is a large, roughly spherical structure with a reddish-brown hue. It is surrounded by a dense cloud of smaller, dark brown particles, likely representing the released organelles or debris. The background is black, making the cell and its surrounding particles stand out. The text "Cell Fractionation" is overlaid in white on a dark horizontal band across the center of the image.

# Cell Fractionation

# Εξαλάτωση

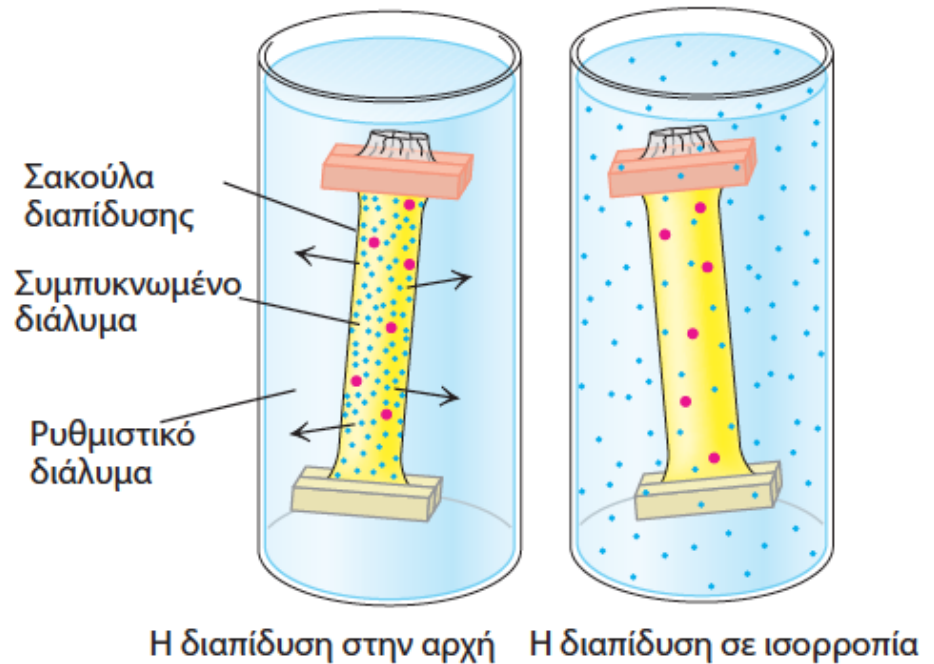
- Μείωση διαλυτότητας σε υψηλή συγκέντρωση άλατος
- Διαφορετική συγκέντρωση άλατος ανάλογα με την πρωτεΐνη
- Μέθοδος κλασμάτωσης (επιλεκτικής καταβύθισης) πρωτεϊνών
- Τρόπος αύξησης  $C_{\text{πρωτεΐνης}}$  σε αραιά διαλύματα
- Απομάκρυνση άλατος με διαπίδυση

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow 2 \text{NH}_4^+ + \text{SO}_4^{2-}$ , θειϊκό αμμώνιο, το πιο κοινό άλας για καθίζηση πρωτεϊνών



# Διαπίδυση

- Διαχωρισμός από μικρότερα μόρια/ιόντα μέσω ημιπερατής μεμβράνης.
- Μέθοδος απομάκρυνσης άλατος από ένα πρωτεϊνικό διάλυμα.
- Μη αποτελεσματική για διαχωρισμό πρωτεϊνών.



**Εικόνα 3.2 Διαπίδυση.** Τα μόρια της πρωτεΐνης (κόκκινα) παραμένουν μέσα στη σακούλα διαπίδυσης, ενώ τα μικρά μόρια (μπλε) διαχέονται κατά την κατεύθυνση της βαθμίδωσης συγκέντρωσής τους, προς το διάλυμα που περιβάλλει τη μεμβράνη.

# Χρωματογραφικές τεχνικές καθαρισμού πρωτεϊνών

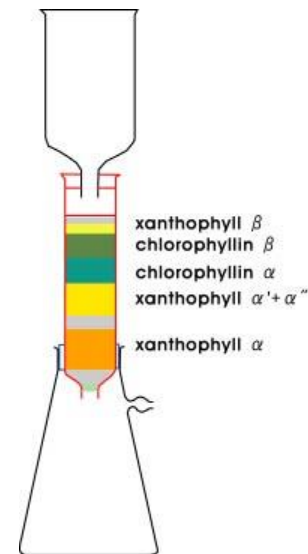
**Στόχος:** Απομόνωση πρωτεΐνης σε υψηλή καθαρότητα  
!! Απαιτούνται πολλά βήματα χρωματογραφίας.

# Χρωματογραφία

- Ο όρος καθιερώθηκε από τον Mikhail Semyonovich Tsvet το 1906.
- Χρησιμοποίησε σωλήνες γεμάτους με ανθρακικό ασβέστιο για να διαχωρίσει μείγμα χλωροφυλλών στα συστατικά τους.
- Καθώς το διάλυμα διέρχεται μέσα από τη στήλη του ανθρακικού ασβεστίου, τα συστατικά διαχωρίζονται δημιουργώντας έγχρωμες ζώνες. Έτσι προέκυψε ο όρος «χρωματογραφία».

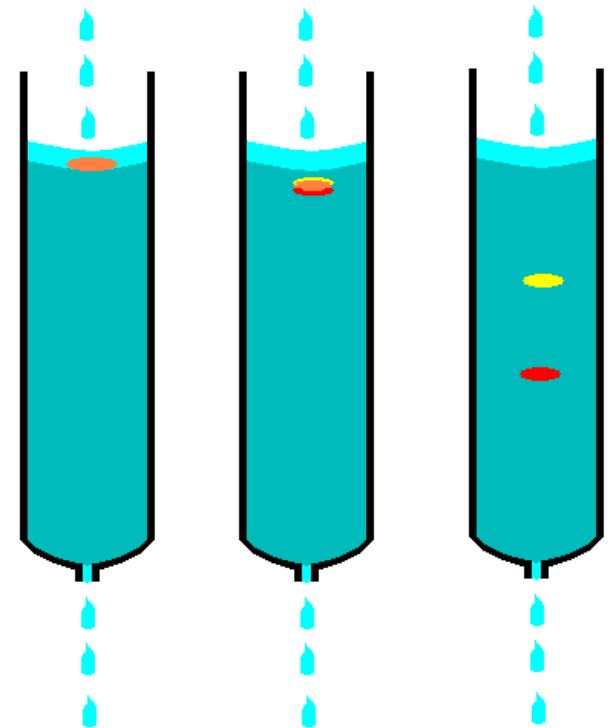


[tsvet chlorophyll chromatography - Bing images](#)



# Βασικοί όροι στη χρωματογραφία

- ❑ Τεχνική φυσικού διαχωρισμού συστατικών ενός μείγματος.
- ❑ Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κατανομή των συστατικών που μεταξύ δύο φάσεων
  - **Στατική φάση** (διάφορα υλικά όπως ανόργανα άλατα, οξείδια, κτλ)
  - **Κινητή (φέρουσα) φάση** (υδατικός ή οργανικός διαλύτης, αέριο)





# Ταξινόμηση με βάση τη φύση της κινητής και της στατικής φάσης

- Υγρή χρωματογραφία (LC) αν η κινητή φάση είναι υγρή.
- Αέρια χρωματογραφία (GC) αν η κινητή φάση είναι αέρια.

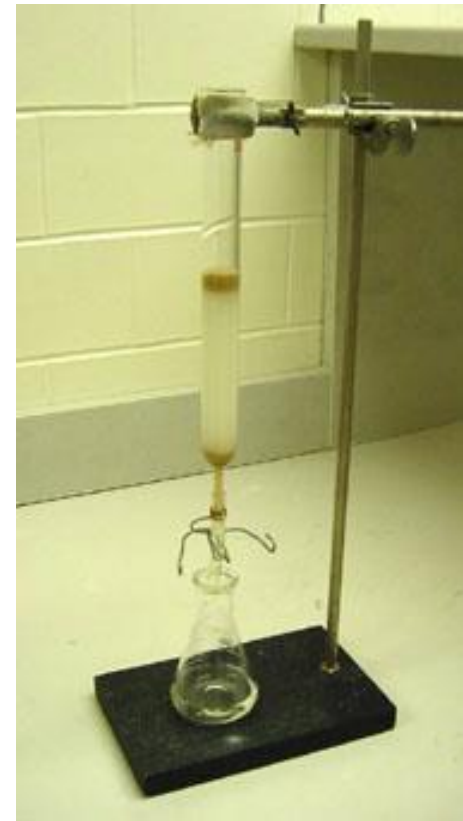
Οι χρωματογραφίες LC και GC υποδιαιρούνται περαιτέρω ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσης, η οποία μπορεί να είναι στερεή ή υγρή προσδεμένη σε στερεό αδρανές υπόστρωμα.

Έτσι διακρίνονται σε:

- Υγρή-στερεή χρωματογραφία (LSC)
- Υγρή-υγρή χρωματογραφία (LLC)
- Αέρια-στερεή χρωματογραφία (GSC)
- Αέρια-υγρή χρωματογραφία (GLC)

# Υγρή χρωματογραφία ανοιχτής στήλης

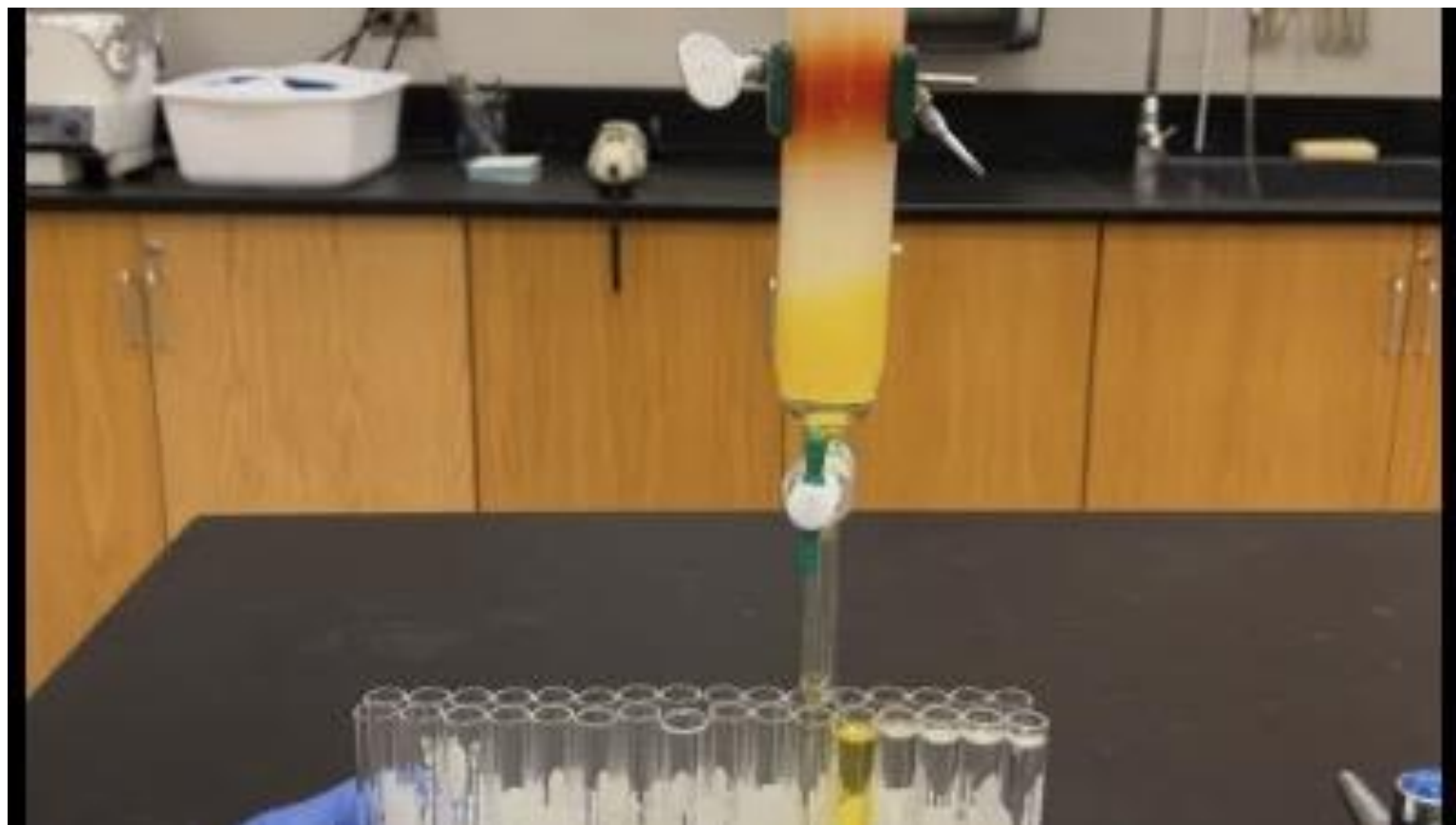
- Η χρωματογραφία ανοιχτής στήλης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού όπου **η στατική φάση βρίσκεται σε γυάλινη στήλη**. Το μίγμα εισάγεται εντός της στήλης και κινείται κατά μήκος της διαλυμένο σε κατάλληλο διαλύτη που ονομάζεται κινητή φάση.

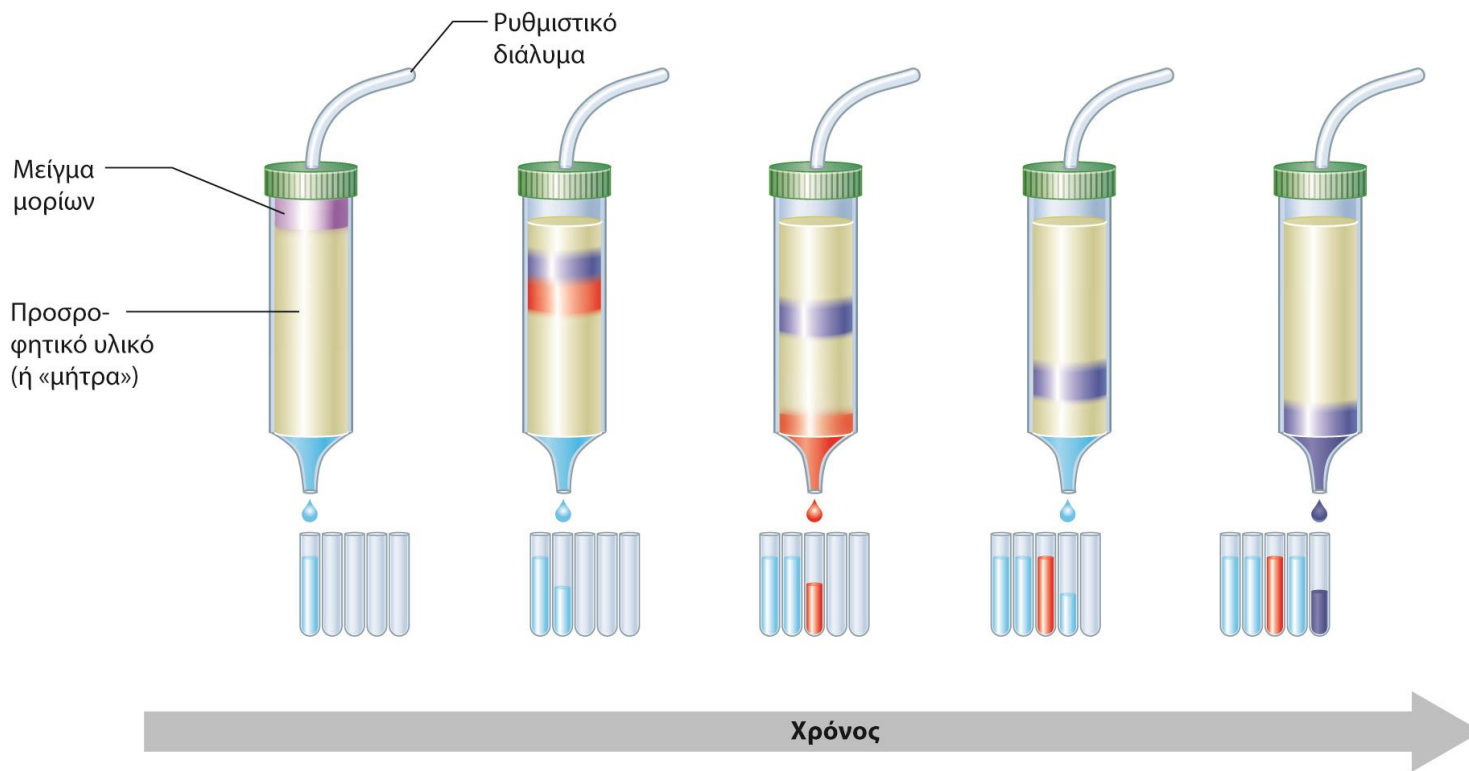


# Column chromatography



Khan Academy



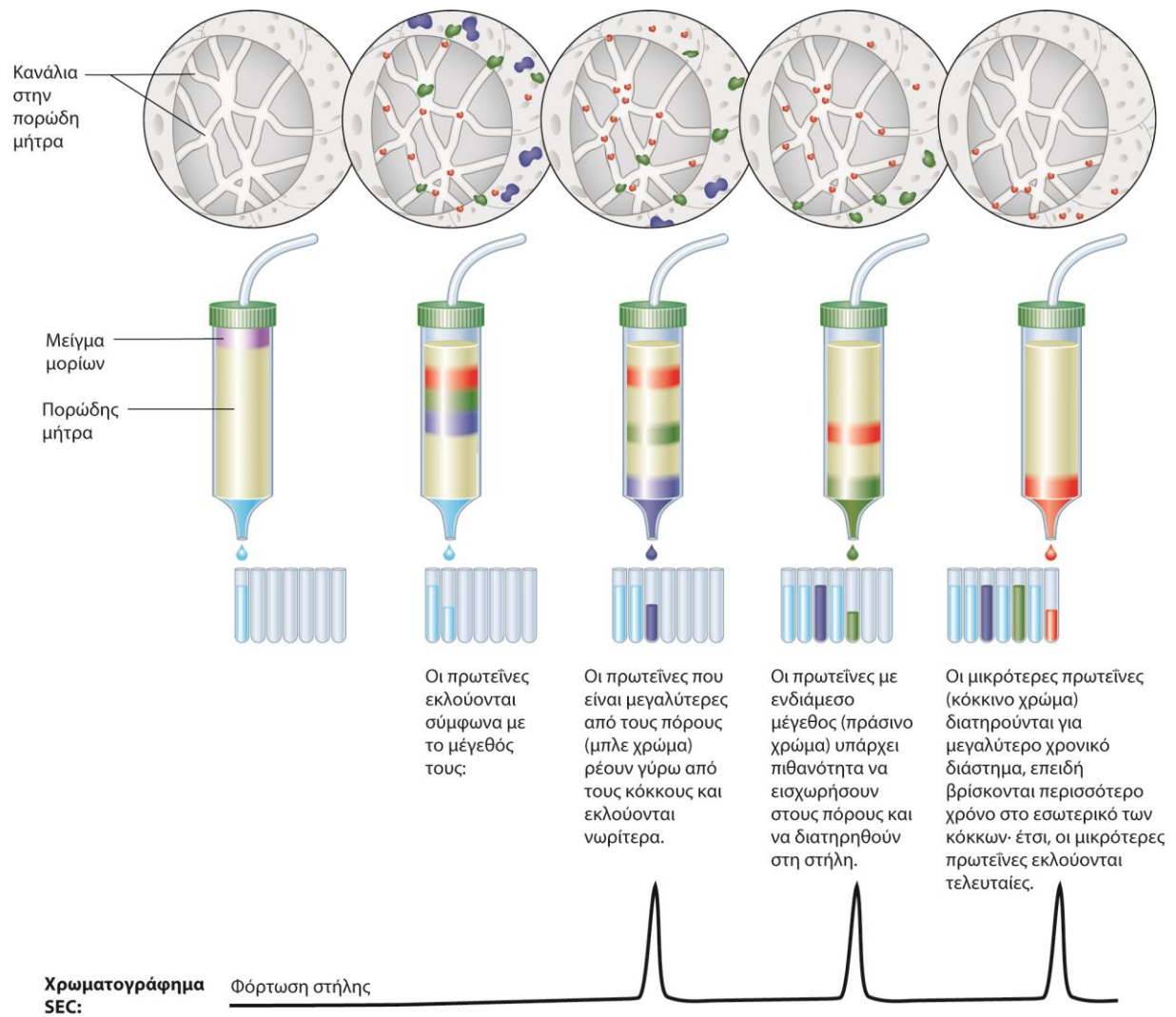


**ΕΙΚΟΝΑ 5Α.2**

Η αρχή της χρωματογραφίας στήλης. Ένα δείγμα πρωτεϊνών διαχωρίζεται ως αποτέλεσμα των διάφορων αλληλεπιδράσεων με το υλικό της στήλης. Όσο περισσότερο μια πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με το υλικό της στήλης, τόσο αργότερα θα εκλουστεί από τη στήλη.

# Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

## ή Μοριακού Αποκλεισμού



### ΕΙΚΟΝΑ 5A.7

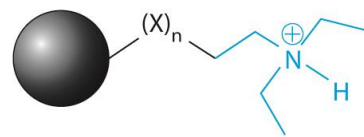
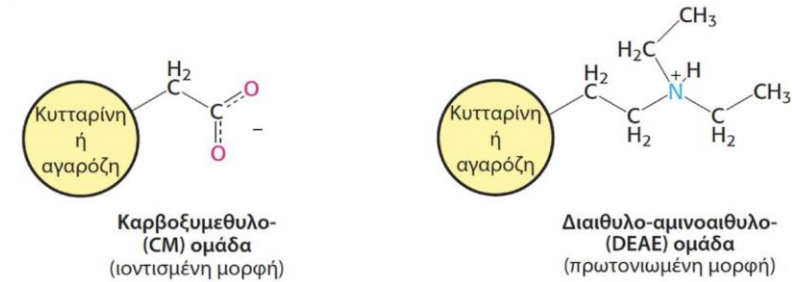
Συνοπτική παρουσίαση της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών. Πάνω: Η μήτρα της μεθόδου SEC (γκρι χρώμα με λευκά κανάλια) είναι πορώδης. Κάτω: Σχηματική αναπαράσταση ενός χρωματογραφήματος της μεθόδου SEC, όπου κάθε κορυφή αναπαριστά την απορροφητικότητα των πρωτεϊνών στα 280 nm. Σε αυτό το παράδειγμα, οι πρωτεΐνες εκλύονται κατά σειρά μειούμενου μοριακού βάρους.

Τα **μεγάλα** μόρια περνούν εύκολα -> πιο γρήγορα -> βγαίνουν πρώτα

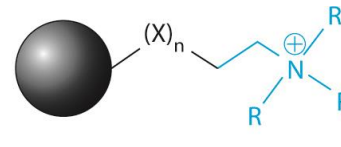
# Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής (IEC)

- Διαχωρισμός με βάση το επιφανειακό φορτίο της πρωτεΐνης
- Η ισχύς της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεΐνης και μήτρας εξαρτάται από (α) την πυκνότητα του φορτίου στην πρωτεΐνη και (β) την ιοντική ισχύ της κινητής φάσης
- Η πυκνότητα φορτίου μιας πρωτεΐνης διαμορφώνεται αλλάζοντας το pH του διαλύματος (αυξανόμενα αρνητικό με αύξηση του pH).
- Κατιοντοανταλλαγή/ Ανιοντοανταλλαγή

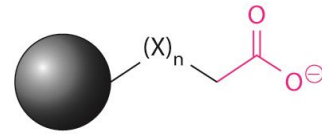
- CM-κυτταρίνη - Κατιοντοανταλλαγή
- DEAE-κυτταρίνη - Ανιοντοανταλλαγή



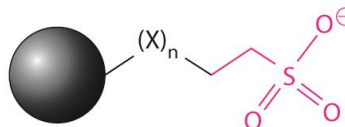
Ασθενής ανιονταλλάκτης (DEAE)



Ισχυρός ανιονταλλάκτης («Q»)



Ασθενής κατιονταλλάκτης (CM)



Ισχυρός κατιονταλλάκτης («S»)

Ρητίνες τεταρτοταγούς αμμωνίου

Ρητίνες σουλφονικού οξέος

Ασθενείς γιατί μπορούν να απωλέσουν το φορτίο τους σε pH > ~10 ή pH < ~4

## ΕΙΚΟΝΑ 5A.5

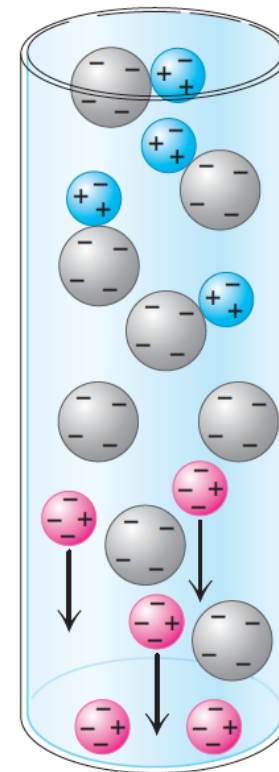
Οι χημικές δομές των συχνά χρησιμοποιούμενων μέσων ιοντοανταλλαγής.

# Κατιονανταλλαγή

- Το καθαρό φορτίο πρωτεΐνης που σε pH7 είναι θετικό δεσμεύεται σε στήλη που περιέχει καρβοξυλικά ιόντα.

## Έκλυση/ Απελευθέρωση

- με αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl στο buffer έκλυσης.
- Τα Na<sup>+</sup> συναγωνίζονται τα θετικά φορτία της πρωτεΐνης για τη δέσμευση στη στήλη.
- Αυτές με τα λιγότερα θετικά φορτία θα βγουν πρώτες.



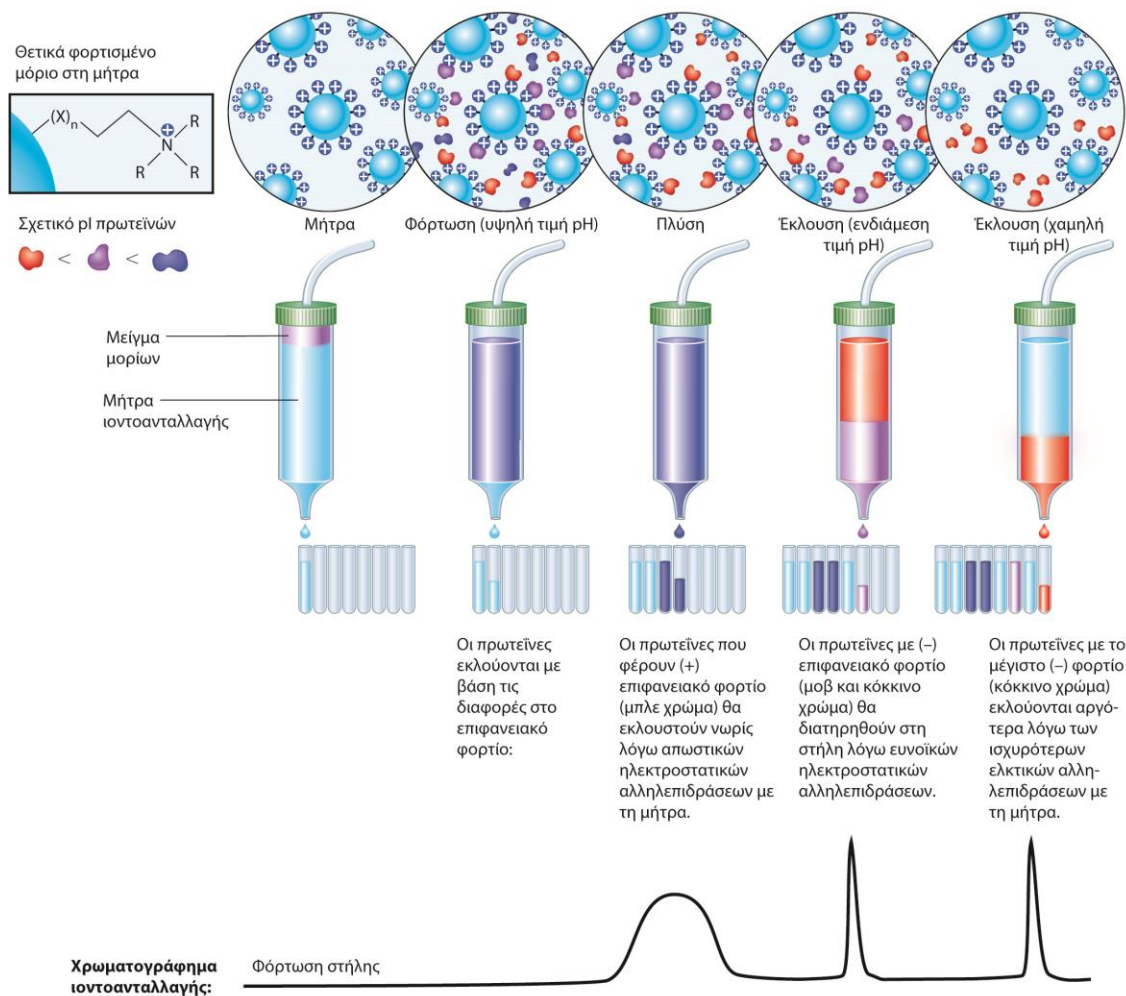
Μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη δεσμεύεται σε κόκκους με αρνητικό φορτίο

Μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη περνά με απλή ροή

**Εικόνα 3.4 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.** Με την τεχνική αυτή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του καθαρού φορτίου τους.



# Ανιονανταλλαγή



**ΕΙΚΟΝΑ 5A.6**

**Συνοπτική παρουσίαση της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής.** Πάνω: Εδώ φαίνεται μια θετικά φορτισμένη μήτρα. Καθώς το pH της κινητής φάσης ελατώνεται, ή καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνεται, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και της μήτρας εξασθενούν και οι πρωτεΐνες εκλύονται. Κάτω: Σχηματική αναπαράσταση ενός χρωματογραφήματος ιοντοανταλλαγής, όπου κάθε κορυφή αναπαριστά την απορροφητικότητα των πρωτεϊνών στα 280 nm. Σε αυτό το παράδειγμα, οι πρωτεΐνες εκλύονται κατά σειρά μειούμενου pI.

# Χρωματογραφία συγγένειας

## Διαχωρισμός με βάση τη χημική συγγένεια

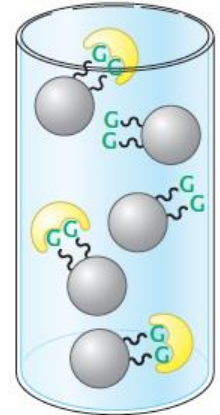
- Υψηλή συγγένεια πρωτεϊνών για ειδικές χημικές ομάδες **X** (υποστρώματα ή αναστολείς)
- Οι **X** συνδέονται ομοιοπολικά στη στήλη

## Μηχανισμός λειτουργίας

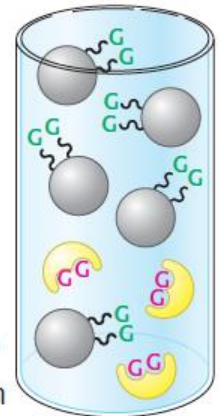
- Μίγμα πρωτεϊνών περνά από τη στήλη
- Δέσμευση συγκεκριμένης πρωτεΐνης
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν
- Έκλυση της πρωτεΐνης με προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης διαλυτής μορφής του X ή με αλλαγή συνθηκών για τη μείωση της συγγένειας πρόσδεσης της πρωτεΐνης.

- **Επιλεκτικός διαχωρισμός της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος**

Μια πρωτεΐνη που δεσμεύει γλυκόζη συνδέεται στην ομοιοπολικά συνδεόμενη γλυκόζη (G) των κόκκων

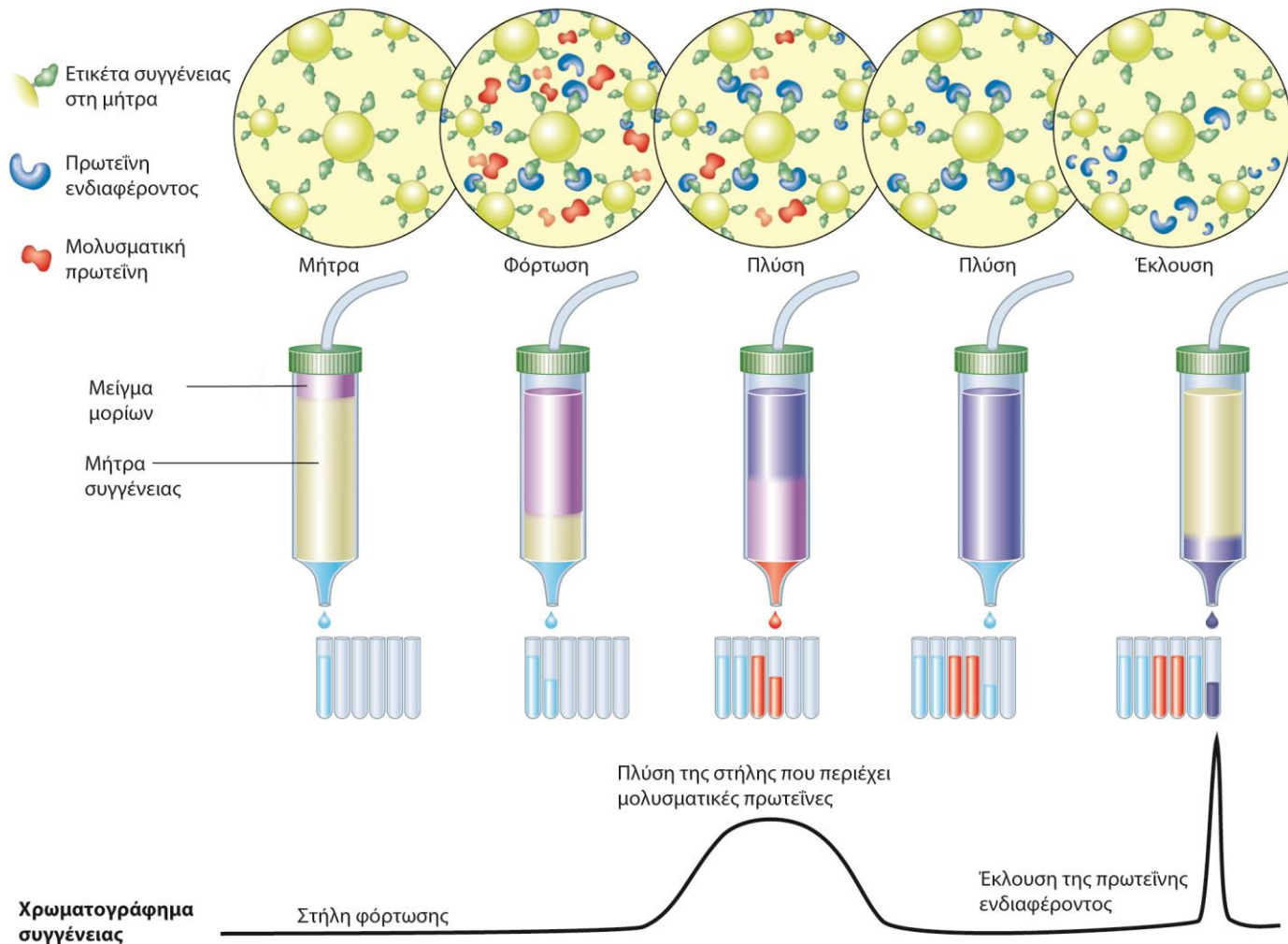


Προσθήκη γλυκόζης (G)



Προσθέτοντας διάλυμα γλυκόζης απελευθερώνονται οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν γλυκόζη

**Εικόνα 3.5 Χρωματογραφία συγγένειας.** Στο παράδειγμα, η κονκαναβαλίνη A (που φαίνεται κίτρινη) διαχωρίζεται λόγω συγγένειας με τη γλυκόζη (G) που βρίσκεται ομοιοπολικά δεσμευμένη στη στερεά φάση της στήλης.



Οι πρωτεΐνες οι οποίες δεν προσδένονται στη μήτρα συγγένειας απομακρύνονται με πλύση και εκλύονται γρήγορα, δίνοντας έτσι αύξηση σε μια μεγάλη πρωτεϊνική απορροφητικότητα (ευρεία κορυφή).

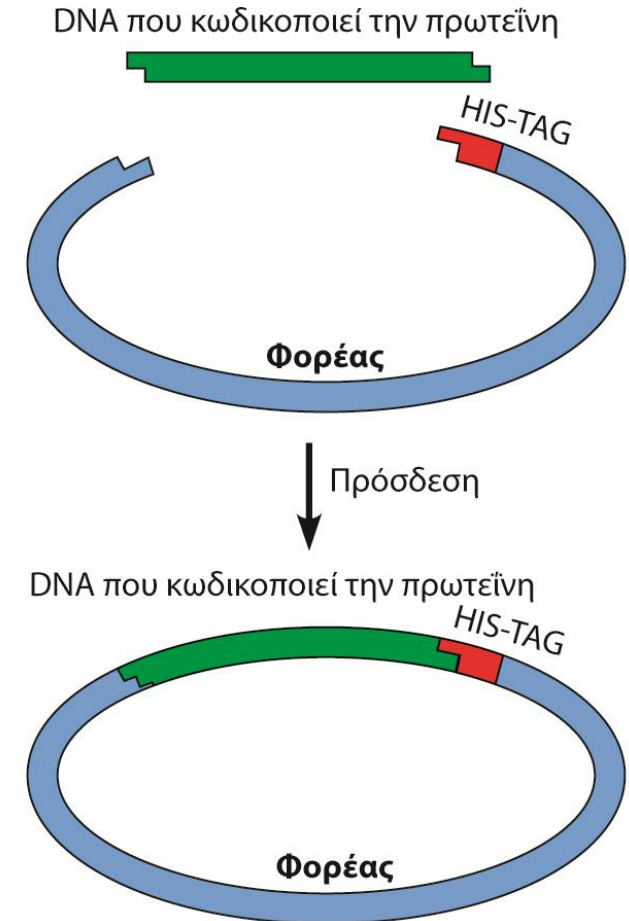
Μετά την απομάκρυνση των μολυσματικών παραγόντων, η επιθυμητή πρωτεΐνη εκλύεται, δίνοντας μικρότερη πρωτεϊνική απορροφητικότητα (στενή κορυφή).

### ΕΙΚΟΝΑ 5Α.3

**Συνοπτική παρουσίαση της χρωματογραφίας συγγένειας.** Πάνω: Φαίνεται η εξειδίκευση πρόσδεσης της επιθυμητής πρωτεΐνης (μπλε σχήματα) στη μήτρα συγγένειας. Οι μολυσματικές πρωτεΐνες (με κόκκινο χρώμα) απομακρύνονται με πλύση μέσα από τη στήλη χωρίς πρόσδεση κι έτσι καταλήγουμε σε σημαντικό καθαρισμό για την επιθυμητή πρωτεΐνη. Η δεσμευμένη πρωτεΐνη μπορεί τότε να εκλουστεί με μία από τις πολλές μεθόδους που συζητήθηκαν στο κείμενο. Κάτω: Σχηματική αναπαράσταση ενός χρωματογραφήματος συγγένειας, όπου κάθε κορυφή αναπαριστάει την απορροφητικότητα των πρωτεϊνών στα 280 nm.

# Χρωματογραφία συγγένειας ακίνητοποιημένου μετάλλου (IMAC, immobilized metal affinity chromatography)

- Εκμεταλλεύεται τις ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός ιόντος  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  και μιας αλυσίδας από 6 διαδοχικά κατάλοιπα ιστοδίνης (hexahistidine-tag: His-tag)
- Σπάνια η αλληλουχία αυτή στη φύση.
- Με χρήση τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA γίνεται επισύναψη της His-tag στο γονίδιο που κωδικοποιεί την επιθυμητή πρωτεΐνη.
- Όταν η πρωτεΐνη εκφραστεί θα περιλαμβάνει και την αλληλουχία His-tag και θα προσδεθεί ισχυρά στη μήτρα IMAC.
- Έκλυση από τη στήλη IMAC γίνεται με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει ιμιδαζόλη (ανάλογο της πλευρικής ομάδας της His)




## **EIKONA 5A.4**

Η εισαγωγή ενός γονιδίου πρωτεΐνης σε έναν από τους πολλούς εμπορικά διαθέσιμους φορείς έκφρασης καταλήγει στην προσθήκη, κατά τη μέθοδο συγγένειας, της His-tag (μιας αλληλουχίας από έξι κατάλοιπα His) στην αλληλουχία της πρωτεΐνης.



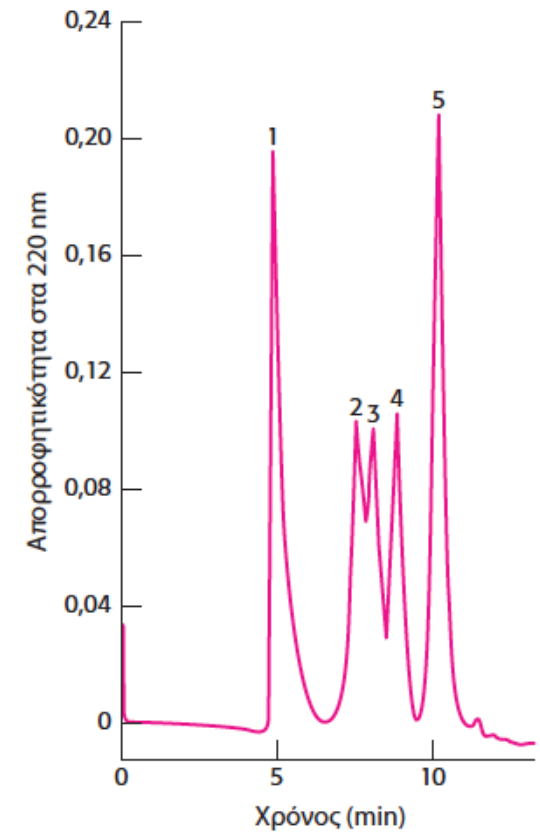
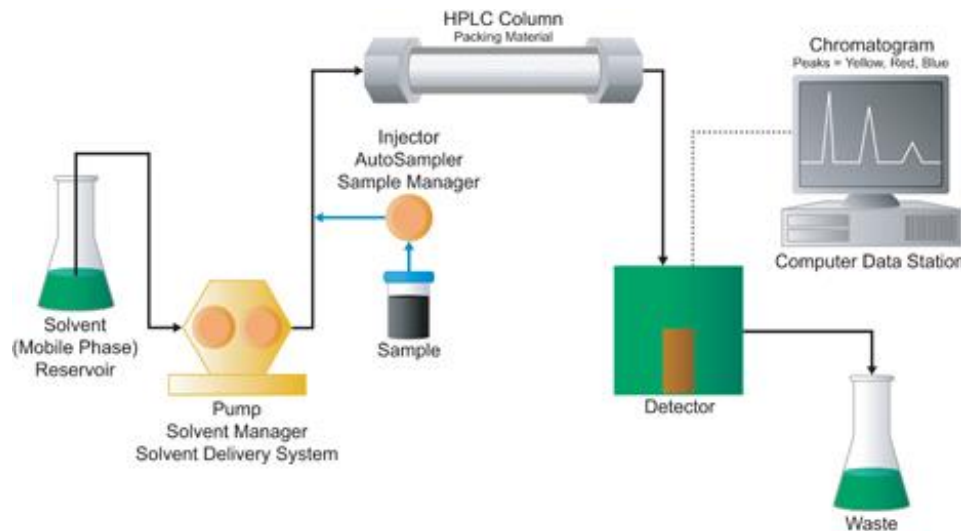
Protein  
purification  
techniques  
EXPLAINED

 Cube Biotech

<https://www.youtube.com/watch?v=MvcJuEaPiNQ>

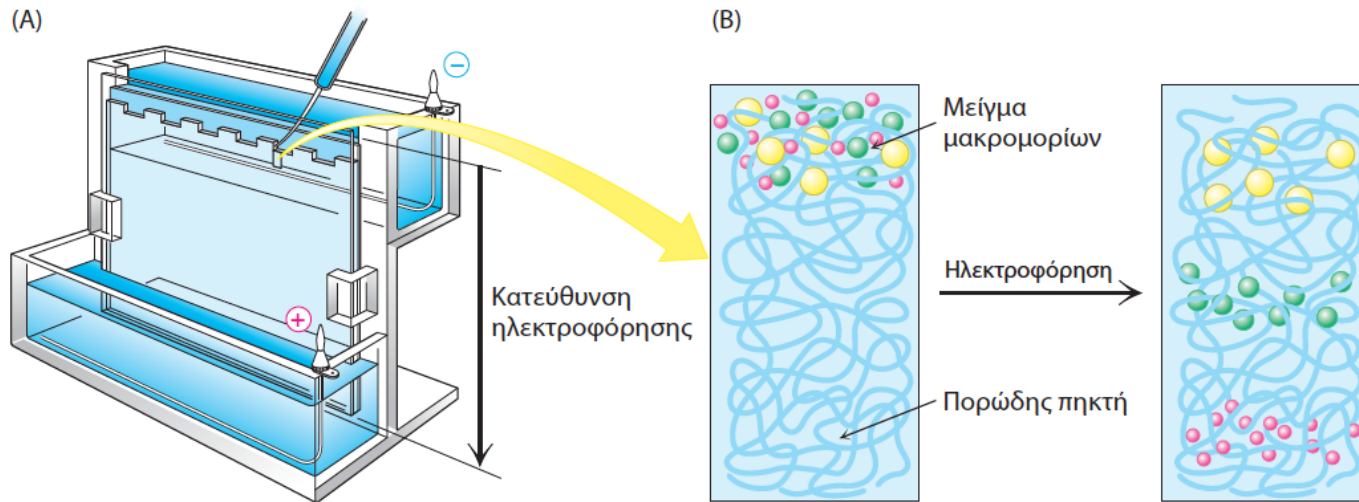
# HPLC

- Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης/ απόδοσης
- Λεπτόκοκκο υλικό πλήρωσης
- Καλό πακετάρισμα
- Εφαρμογή υψηλής πίεσης
- Μεγάλη διαχωριστική ικανότητα
- Ταχεία μέθοδος διαχωρισμού
- Ανίχνευση στο UV στα 220nm (απορρόφηση πεπτιδικού δεσμού) ή στα 280nm (Tyr, Trp).



**Εικόνα 3.6 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).** Η διήθηση σε πηκτή με την τεχνική HPLC έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα και μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε με ακρίβεια τις πρωτεΐνες: (1) θυρεοσφαιρίνη (669 kDa), (2) καταλάση (232 kDa), (3) βόεια λευκωματίνη ορού (67 kDa), (4) ωλοευκωματίνη (43 kDa) και ριβονουκλεάση (13,4 kDa). [Κατά K.J. Wilson and T.D. Schlabach, στο: *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 2, suppl. 41, F. M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, Eds. (Wiley, 1998), p.10.14.1.]

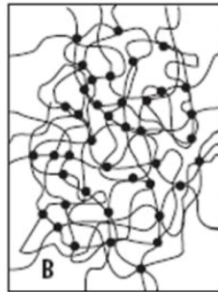
# Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυμιδίου



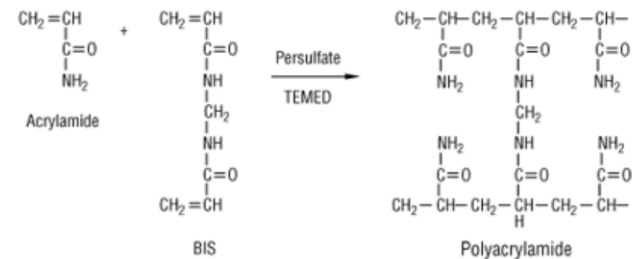
## ΠΗΚΤΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

➤ Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών μεγέθους 5 ως 2000kDa

➤ Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA 5-500bp



Η δις-ακρυλαμίδη πολυμερίζεται με την ακρυλαμίδη σχηματίζοντας διασυνδέσεις μεταξύ των αλυσίδων ακρυλαμίδης σχηματίζοντας ένα **δίκτυο πολυακρυλαμίδης**



**APS** (ammonium persulfate): παράγοντας πολυμερισμού: οξειδωτικός παράγοντας και πηγή ριζών  
**TEMED** (N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine): καταλύει τον πολυμερισμό ενισχύοντας την παραγωγή ελεύθερων ριζών από το APS

# Native PAGE-Ηλεκτροφόρηση σε φυσική κατάσταση

- Μόριο με καθαρό φορτίο κινείται σε ηλεκτρικό πεδίο με χρήση συγκεκριμένου ρυθμιστικού διαλύματος
- Οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν αρνητικό φορτίο σε αλκαλικά διαλύματα.
- Χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου ως ηθμό
- Διαχωρισμός λόγω διαφορετικών ταχυτήτων
- Ταχύτητα  $\sim$  ηλεκτρικού πεδίου, καθαρού φορτίου πρωτεΐνης (**πυκνότητα φορτίου**=φορτίο/μάζα), συντελεστή τριβής λόγω **μεγέθους** και **σχήματος** πρωτεΐνης.
- ***Οι πρωτεΐνες παραμένουν στην φυσική τους μορφή (τριτοταγή διαμόρφωση) –χωρίς αποδιάταξη.***
- *Η εύρεση του κατάλληλου ρυθμιστικού είναι δύσκολη και απαιτούνται αρκετές δοκιμές*



# Native PAGE (Εγγενής ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμιδίου)

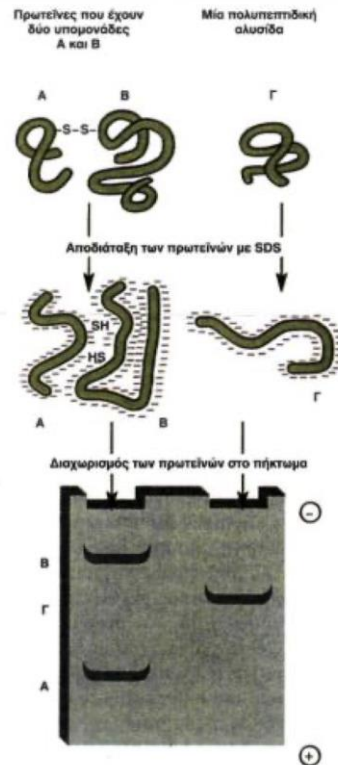


<https://www.youtube.com/watch?v=5obiHqeYEc0>

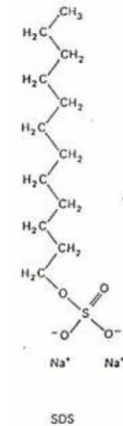
# Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

- Προσθήκη SDS για καταστροφή μη ομοιοπολικών δεσμών
- Σύμπλοκο με 1 μόριο SDS ανά 2 αμινοξέα. Σημαντική αύξηση αρνητικού φορτίου – καθαρό φορτίο ~ με μάζα πρωτεΐνης
- Προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης για αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών

**Κάτω από συνθήκες αποδιάταξης οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει της μάζας τους με τις μικρότερες να φθάνουν πρώτες.**



**SDS:** καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών και αποκτούν μεγάλο αρνητικό φορτίο



**Μερκαπτοαιθανόλη:** ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς

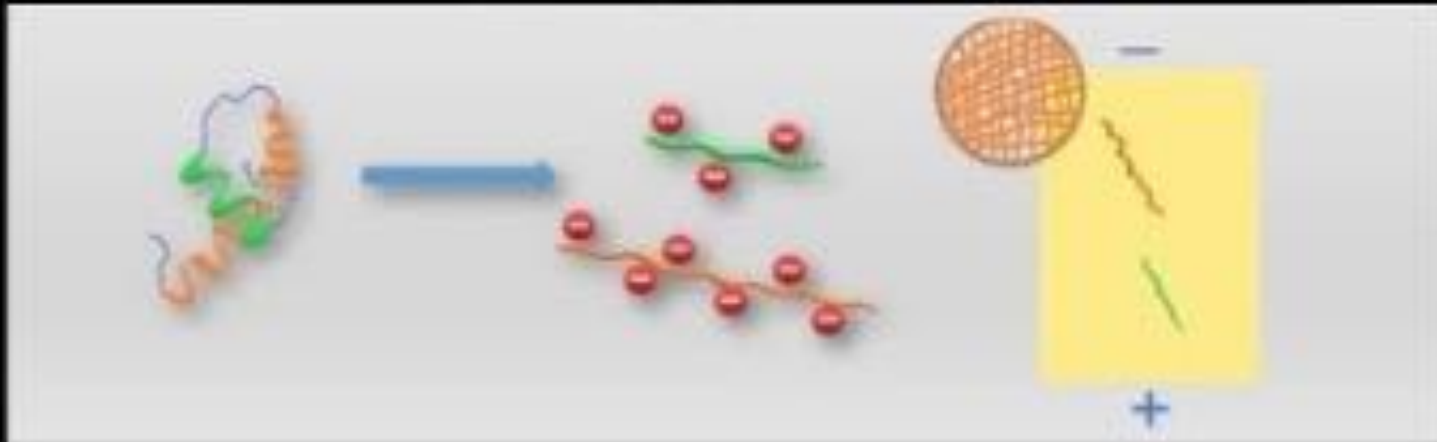
**Βράσιμο** των δειγμάτων στους 95 βαθμούς για 3-5 λεπτά

# SDS PAGE



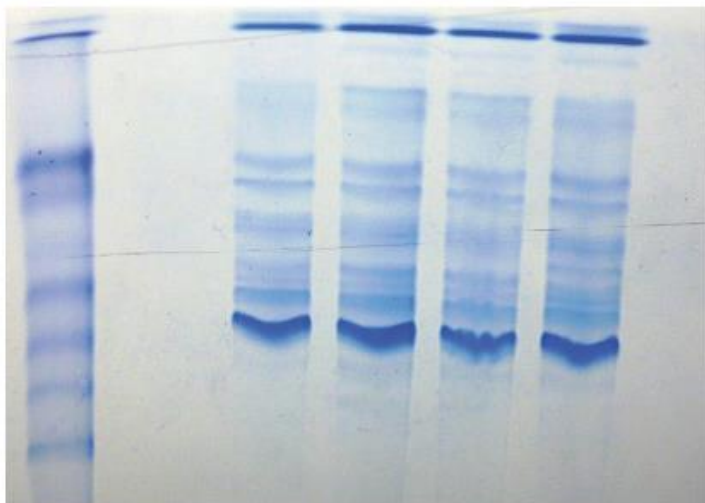
## SDS-PAGE

Principle of the technique



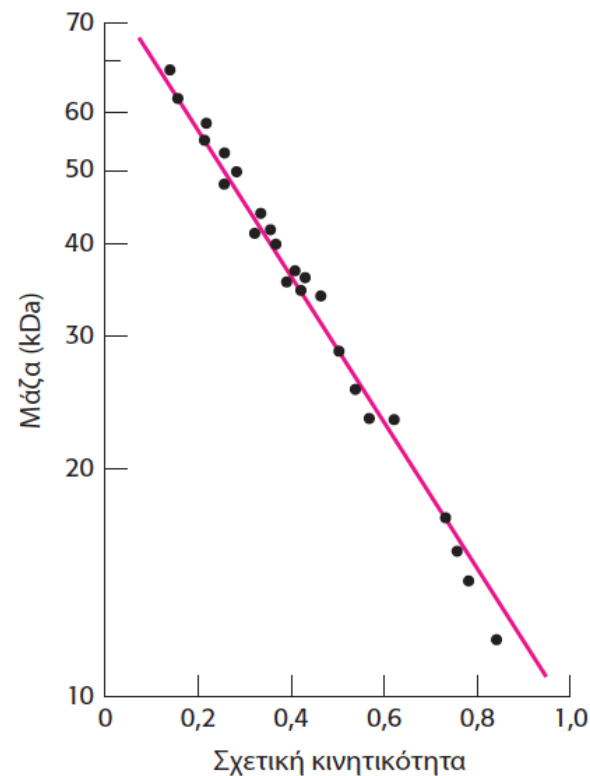
<https://www.youtube.com/watch?v=DDOGADWIHBw>

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση μπορούν να εμφανιστούν με χρώση.  
Χρώση και προσδιορισμός μάζας (με SDS-PAGE)



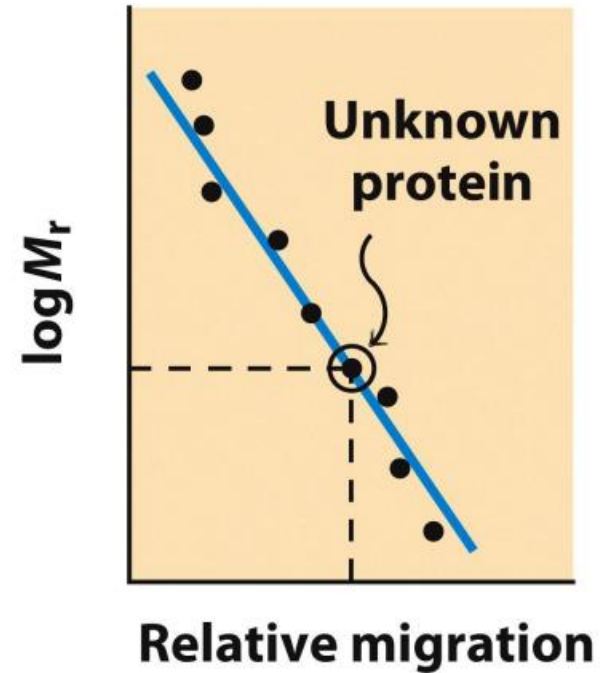
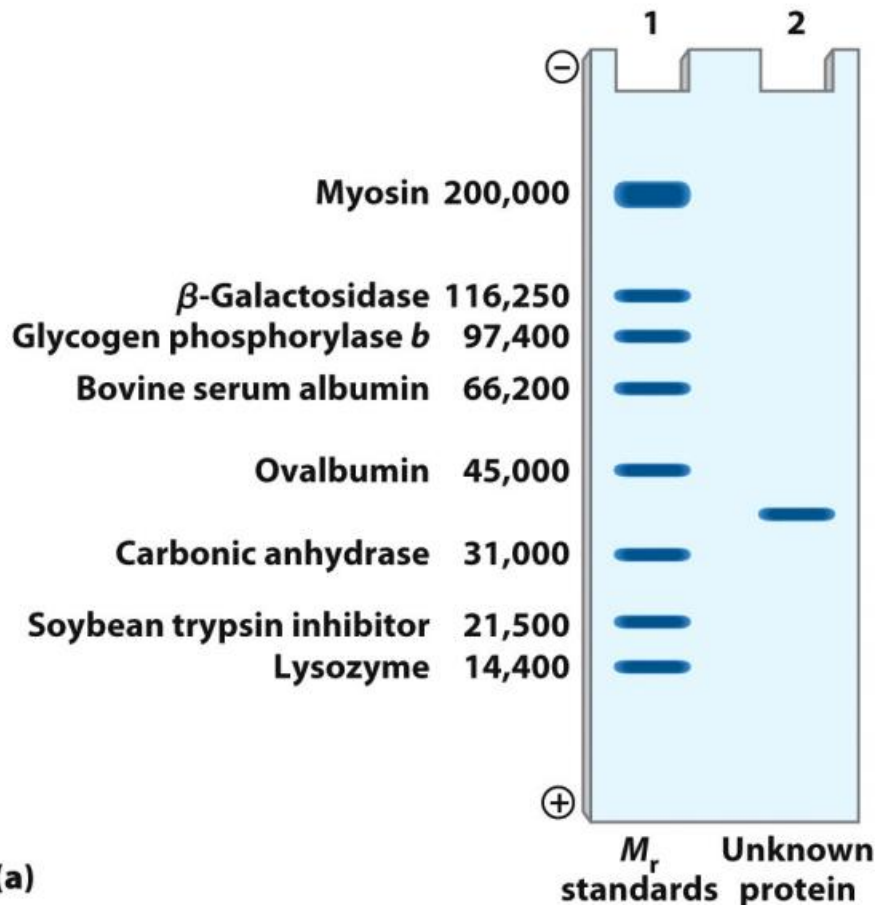
**Εικόνα 3.9** Χρώση των πρωτεϊνών μετά την ηλεκτροφόρηση. Μείγματα πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα που διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου μπορούν να εμφανιστούν με χρώση με κυανούν του Coomassie. Η πρώτη λωρίδα περιέχει μείγμα πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά βάρη, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση του μεγέθους των ζωνών στα δείγματα. [©Dr Robert Farrell.]

*Πρόσδεση σε αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών αλλάζοντας το χρώμα από κόκκινο-καφέ έως έντονο μπλε*



**Εικόνα 3.10** Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να προσδιορίσει τη μάζα των πρωτεϊνών. Η κινητικότητα πολλών πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τον λογάριθμο της μάζας τους. [Κατά K. Weber and M. Osborn, *The Proteins*, vol. 1, 3<sup>d</sup> ed. (Academic Press, 1975), p. 179.]

# Προσδιορισμός ΜΒ άγνωστης πρωτεΐνης



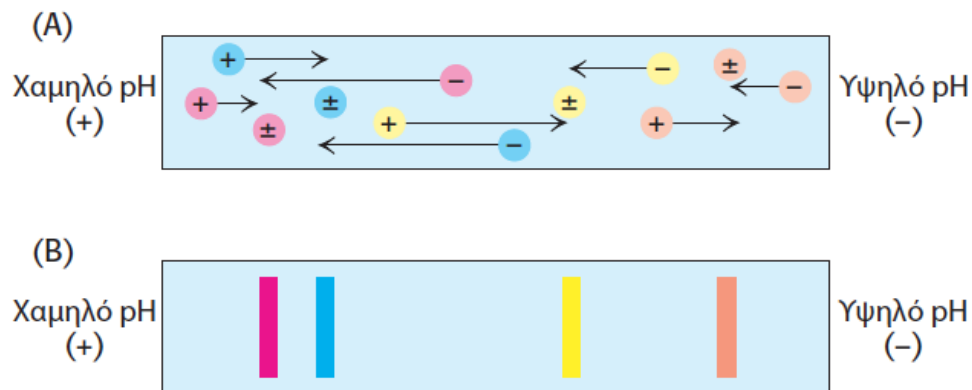
(a)

# Ισοηλεκτρική εστίαση

- Ηλεκτροφόρηση σε μια βαθμίδωση pH σε πηκτή χωρίς SDS (όχι αποδιάταξη)
- Διαχωρισμός βάσει του σχετικού περιεχομένου σε όξινα και βασικά αμινοξέα.
- **Ισοηλεκτρικό σημείο (pI) μιας πρωτεΐνης είναι το pH όπου το ολικό φορτίο της είναι μηδέν.**
- Δεν μετακινείται σε ηλεκτρικό πεδίο
- Κάθε πρωτεΐνη σταματά στη θέση της πηκτής όπου το  $pH = pI$ .

## Εικόνα 3.11 Η αρχή της ισοηλεκτρικής

**εστίασης.** Στην πηκτή διαμορφώνεται πρώτα μια βαθμίδωση pH και μετά τοποθετείται το δείγμα.

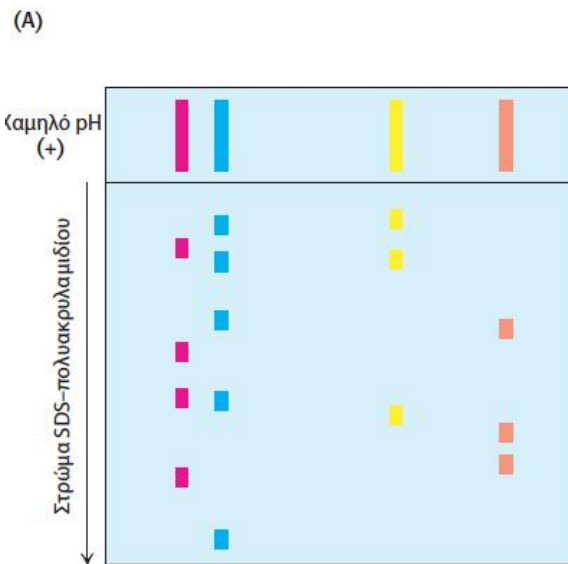


(A) Κάθε πρωτεΐνη, που αντιπροσωπεύεται από τους κύκλους διαφορετικού χρώματος, διαθέτει καθαρό θετικό φορτίο στις περιοχές της πηκτής όπου το pH είναι μικρότερο από την αντίστοιχη τιμή του pI της και καθαρό αρνητικό φορτίο όπου το pH είναι μεγαλύτερο από το pI της. Όταν εφαρμοστεί το ηλεκτρικό πεδίο στην πηκτή, κάθε πρωτεΐνη θα μετακινηθεί στο ισοηλεκτρικό σημείο της, τη θέση όπου δεν έχει φορτίο.

(B) Οι πρωτεΐνες σχηματίζουν ζώνες οι οποίες μπορούν να αποκοπούν και να χρησιμοποιηθούν για άλλα πειράματα.

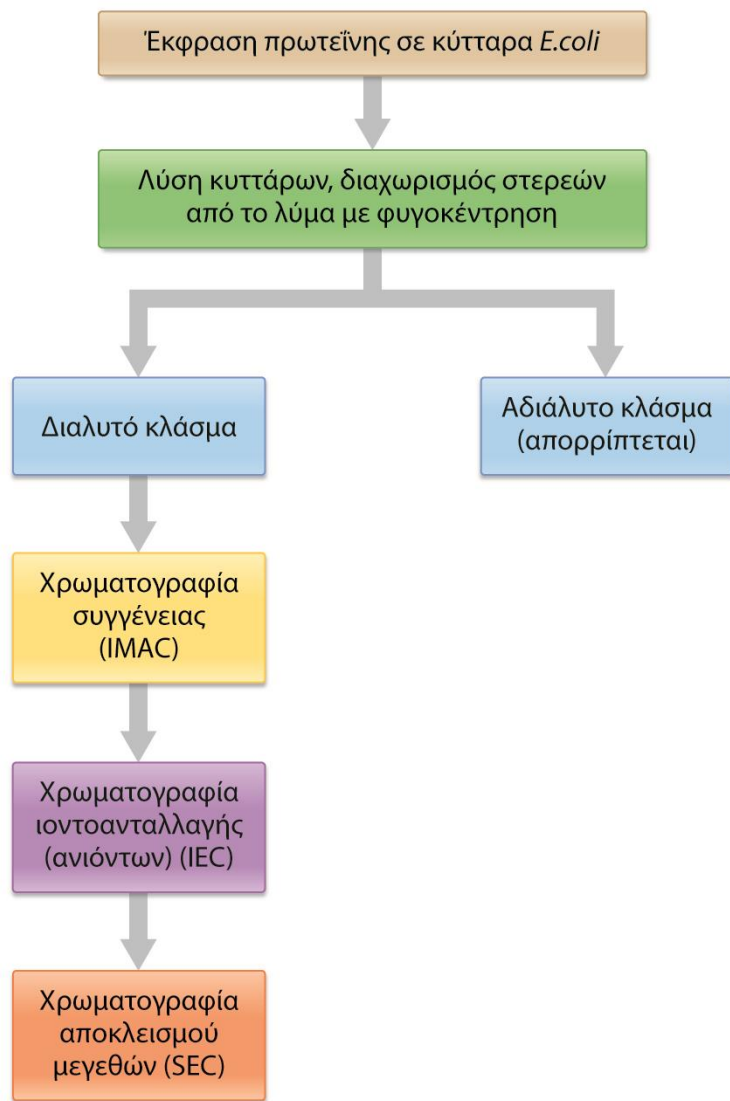
# Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων

- Συνδυασμός ισοηλεκτρικής εστίασης και ηλεκτροφόρησης σε πηκτή SDS- πολυακρυλαμιδίου
- Επίτευξη διαχωρισμών υψηλής διακριτικής ικανότητας
- Α/ Διαχωρισμός βάσει ισοηλεκτρικού σημείου (οριζόντια) &
- Β/ διαχωρισμός βάσει της μάζας τους (κάθετα)
- Δύσκολη η ταυτοποίηση όλων (χρήση φασματομετρίας μάζας)



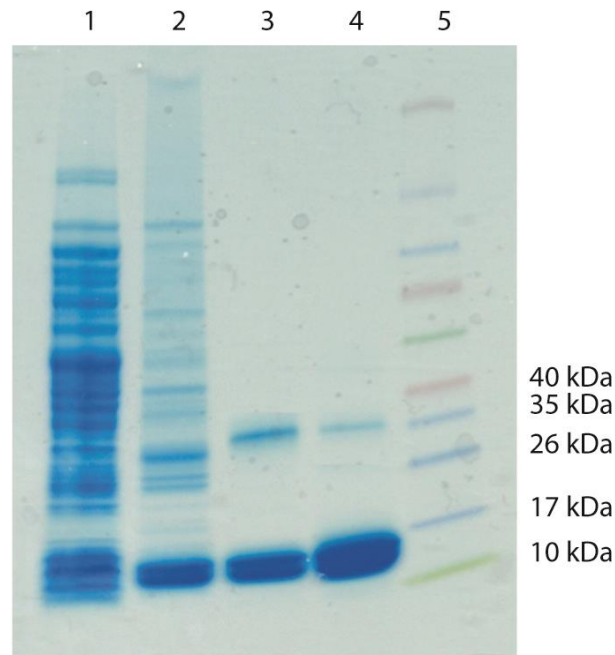
**Εικόνα 3.12 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σε πηκτή.** (Α) Ένα πρωτεϊνικό δείγμα διαχωρίζεται αρχικά στην οριζόντια κατεύθυνση, ανάλογα με το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών που περιέχει, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.11. Η πηκτή τοποθετείται στη συνέχεια επάνω σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου και ηλεκτροφορεύεται κατακόρυφα, οπότε πρωτεΐνες με το ίδιο ισοηλεκτρικό σημείο αλλά διαφορετική μάζα θα διαχωριστούν τώρα βάσει της μάζας τους. (Β) Οι πρωτεΐνες της *E. coli*, όταν διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, δίνουν ένα αποτύπωμα από χίλιες τουλάχιστον διαφορετικές πρωτεΐνες. [B. Ευγενική προσφορά Dr. Patrick H. O'Farrell.]

## Σχεδιάγραμμα για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένης αιμοσφαιρίνης



### ΕΙΚΟΝΑ 5A.8

Διάγραμμα ροής για τον καθαρισμό της ανασυνδυασμένης αιμοσφαιρίνης.

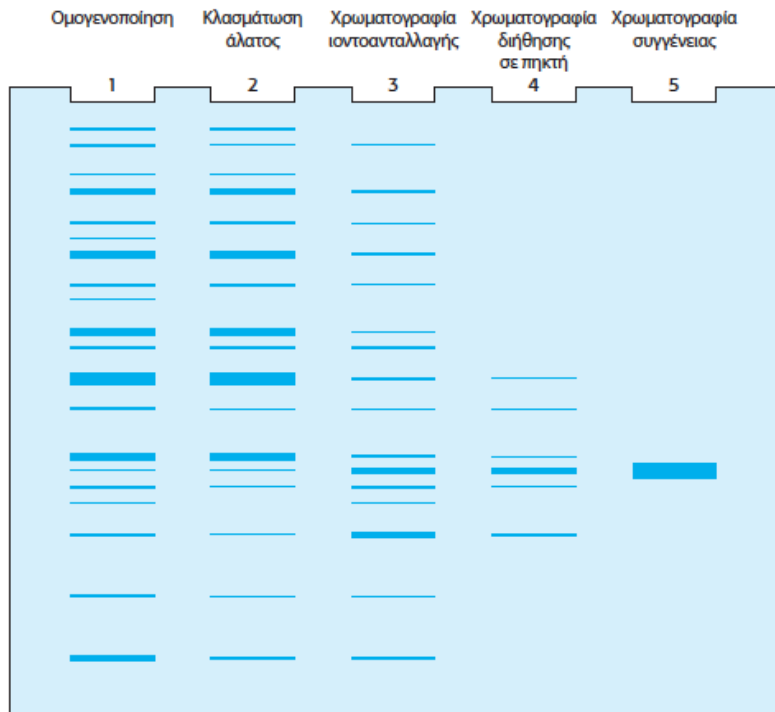


### ΕΙΚΟΝΑ 5A.9

Ηλεκτροφόρηση γέλης δειγμάτων που λήφθηκαν σε διαφορετικά στάδια του καθαρισμού πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη της αιμοσφαιρίνης καθαρίζεται περισσότερο από το 95% σε ομοιογένεια από μια διαδικασία τριών στηλών (βλ. Εικόνα 5A.8). Εδώ βλέπουμε μια SDS-PAGE γέλη χρωματισμένη με το κυανό του Coomassie. Λωρίδα 1: Λύμα *E.coli* (μετά τη φυγοκέντρηση). Λωρίδα 2: Καθαρισμένες πρωτεΐνες με IMAC· οι προεξέχουσες ταινίες είναι οι αλυσίδες της  $\alpha$ -σφαιρίνης και της  $\beta$ -σφαιρίνης που απαρτίζουν τη μεταλλαγμένη αιμοσφαιρίνη. Λωρίδα 3: Πρωτεΐνη καθαρισμένη με IEC. Λωρίδα 4: Υπερφόρτωση δείγματος μετά τη μέθοδο SEC. Λωρίδα 5: Οι δείκτες μοριακού βάρους των πρωτεϊνών. Ευγενική παραχώρηση του Cory Hamada, Western Washington University.



# Ποσοτικοποίηση πρωτοκόλλου καθαρισμού



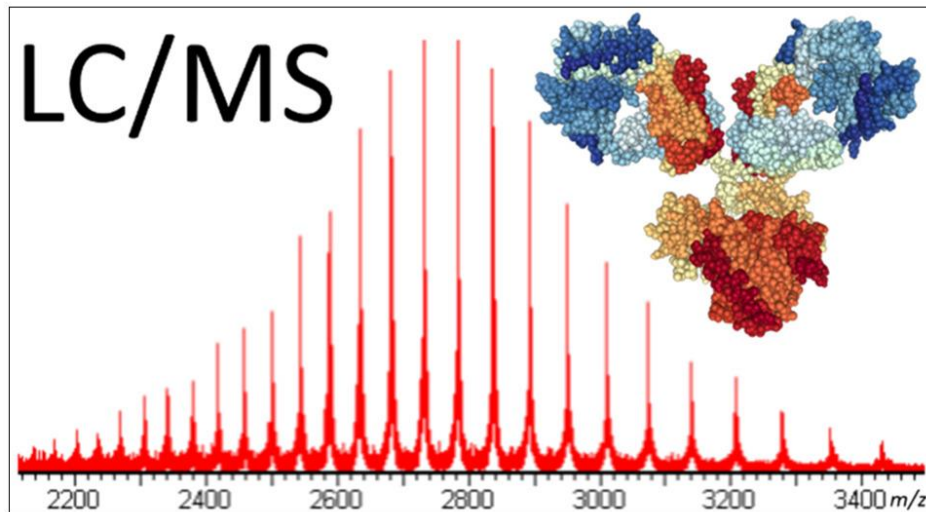
**ΕΙΚΟΝΑ 3.14 Ηλεκτροφορητική ανάλυση του καθαρισμού μιας πρωτεΐνης.** Τα αποτελέσματα του καθαρισμού της υποθετικής πρωτεΐνης που αναλύθηκε στον Πίνακα 3.1 ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου. Κάθε διαδρομή περιέχει 50 μg δείγματος. Η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού αποδεικνύεται από το γεγονός ότι η ζώνη της πρωτεΐνης που καθαρίστηκε είναι πιο εμφανής σε σχέση με τις άλλες ζώνες.

**Πίνακας 3.1** Ποσοτικοποίηση του πρωτοκόλλου καθαρισμού μιας υποθετικής πρωτεΐνης

Στάδιο	A	B	$C=B/A$	$D=B_x/B_1$	$E=C_x/C_1$
	Ολική πρωτεΐνη (mg)	Ολική δραστηριότητα (μονάδες)	Ειδική δραστηριότητα (μονάδες $mg^{-1}$ )	Απόδοση (%)	Επίπεδο καθαρισμού
Ομογενοποίηση	15.000	150.000	10	100	1
Εξαλάτωση	4.600	138.000	30	92	3
Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής	1.278	115.500	90	77	9
Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή	68,8	75.000	1.100	50	110
Χρωματογραφία συγγένειας	1,75	52.500	30.000	35	3.000

# Φασματομετρία μαζών

- Από την SDS-PAGE λαμβάνουμε ένδειξη για την καθαρότητα της πρωτεΐνης και κατά προσέγγιση το MB σε σύγκριση με πρότυπα πρωτεϊνικά MB.
- Η πραγματική μάζα μπορεί να διαφέρει μερικές εκατοντάδες Dalton.
- Δεδομένα υψηλής ακρίβειας μέσω MS



## Φασματομετρία μάζας

---

Αποτελεί τεχνική αναλυτικής χημείας. Βοηθά στην ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων σε ένα δείγμα, μετρώντας τα ιόντα που παράγονται (το πηλίκιο  $m/z$ ).

---

**Ένα φασματομέτρο μαζών παράγει ένα φάσμα μάζας χαρακτηριστικό για κάθε συστατικό του μίγματος.**

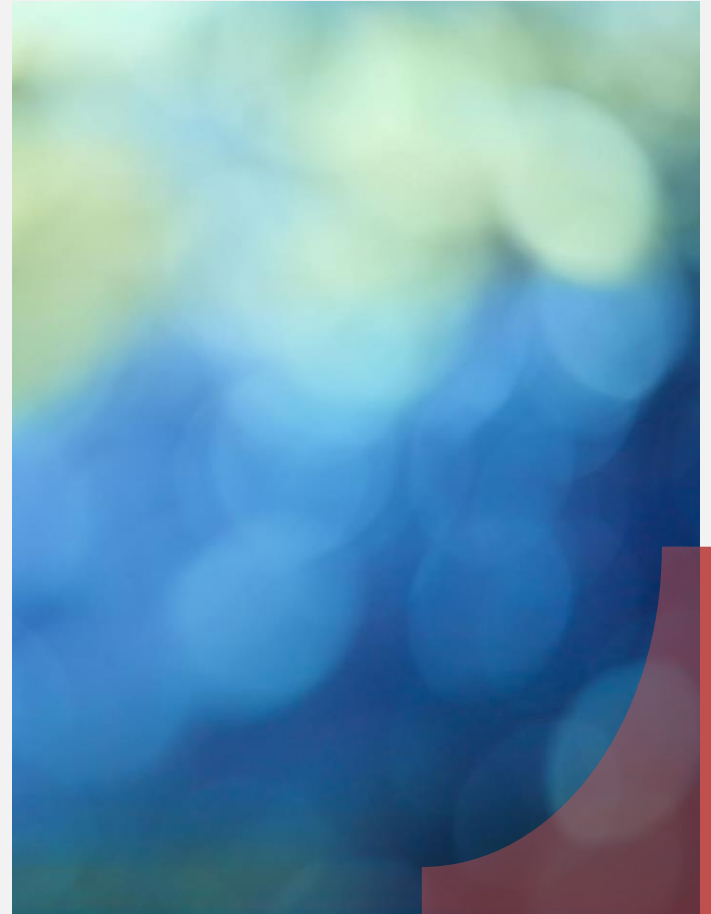
---

Η αρχή λειτουργίας του στηρίζεται στον ιοντισμό των χημικών ενώσεων και την παραγωγή φορτισμένων μορίων ή θραυσμάτων τους.

# ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MS)

Τα διαχωρισμένα μόρια  
βομβαρδίζονται με μία δέσμη  
ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας

Ιοντίζονται και διασπώνται  
προς πολλά θραύσματα, τα  
οποία είναι θετικά ή αρνητικά  
ίόντα ανάλογα με τη μέθοδο.



## ΛΟΓΟΣ ΜΑΖΑ-ΠΡΟΣ-ΦΟΡΤΙΟ

Ο λόγος μάζα-προς φορτίο ( $m/z$ ) :

Λαμβάνεται με διαίρεση της ατομικής ή μοριακής μάζας ενός ιόντος ( $m$ ) με τον αριθμό ( $z$ ) των φορτίων που φέρει

$$^{12}\text{C}^1\text{H}_4^+ : m/z = 16,035 / 1 = 16,035$$

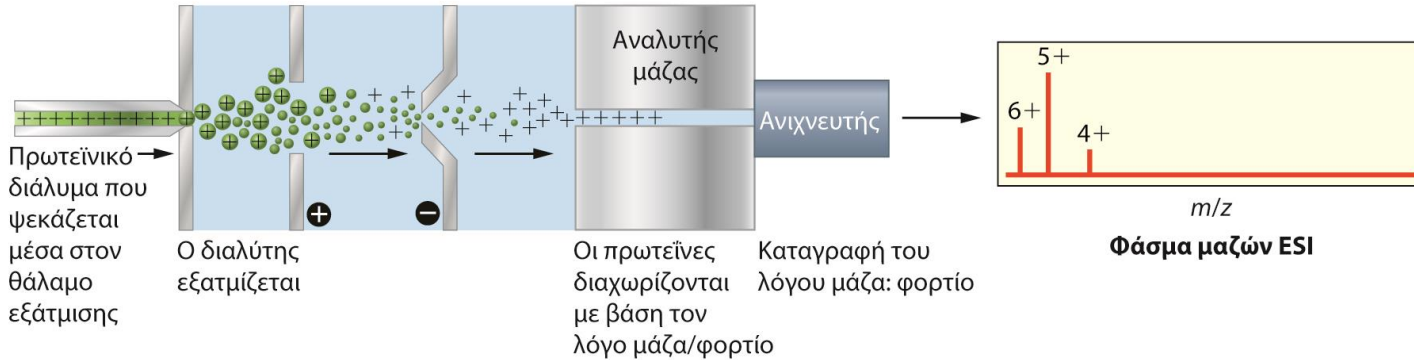
$$^{12}\text{C}^1\text{H}_4^{2+} : m/z = 16,035 / 2 = 8,018$$

(χωρίς μονάδες)

•Κάθε ιόν έχει μια **συγκεκριμένη σχέση μάζας προς φορτίο**, την τιμή  $m/z$ . Για τα περισσότερα ιόντα το φορτίο είναι +1 με αποτέλεσμα η τιμή  $m/z$  είναι η μάζα του ιόντος.

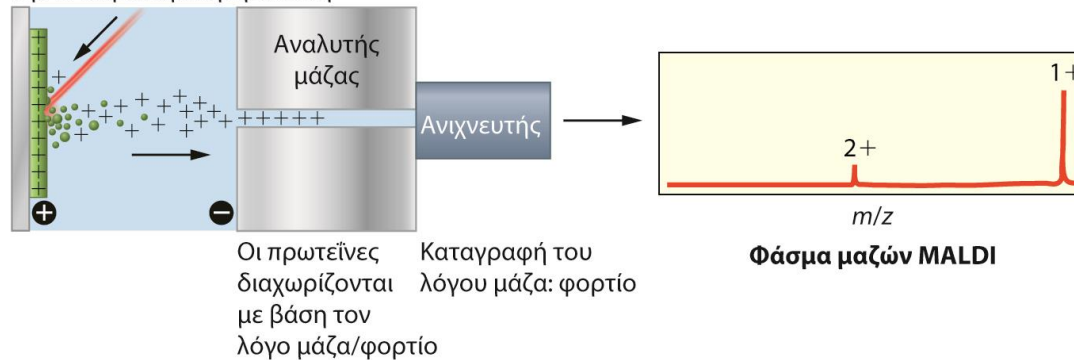
# Τεχνικές φασματομετρίας μαζών

## Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)



## Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI)

Ο παλμός λέιζερ (πορτοκαλί χρώμα) εξατμίζει τη μήτρα που περιέχει την ενσωματωμένη πρωτεΐνη

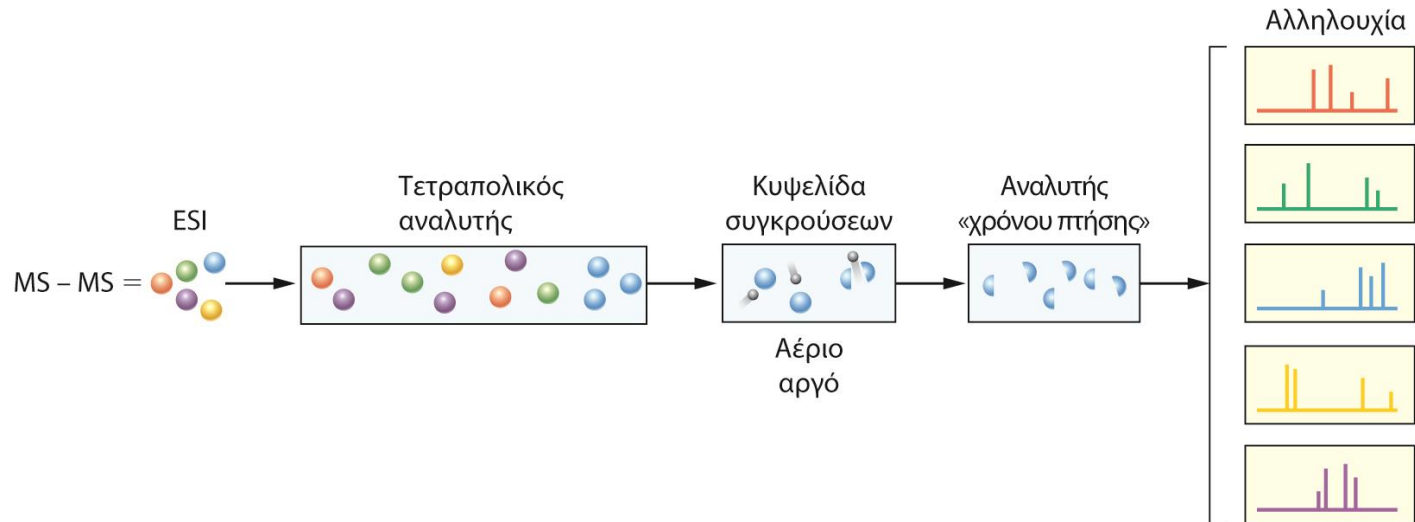


- Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών
- Μετατροπή σε ιόντα σε αέρια φάση
- MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) (εκρόφηση - ιοντισμός από μήτρα με laser)
- TOF - Αναλυτής μάζας μέσω χρόνου πτήσης

### ΕΙΚΟΝΑ 5B.1

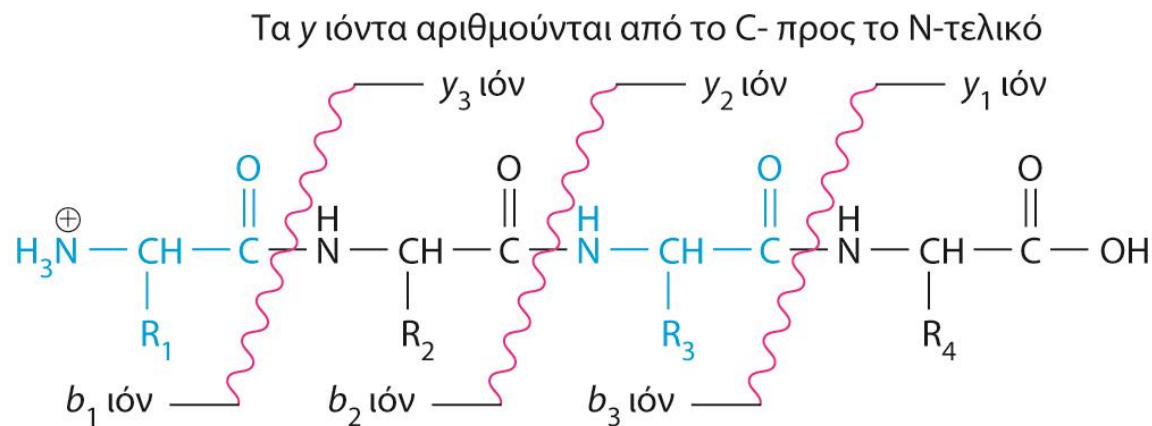
Οι τεχνικές του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και του ιοντισμού εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI).

# Προσδιορισμός πεπτιδικής αλληλουχίας



## ΕΙΚΟΝΑ 5B.2

Προσδιορισμός πεπτιδικής αλληλουχίας με τη μέθοδο MS-MS. Κάθε πεπτιδικό θραύσμα το οποίο εισέρχεται στον τετραπολικό αναλυτή κατευθύνεται μέσα στην κυψελίδα συγκρούσεων, ένα τη φορά. Τα θραύσματα που παράγονται στην κυψελίδα συγκρούσεων δημιουργούν κορυφές στο φάσμα μαζών (που φαίνεται στα δεξιά). Επομένως, κάθε θραύσμα που εισέρχεται στον τετραπολικό αναλυτή θα αποδώσει ένα διακριτό φάσμα μάζας στον αναλυτή «χρόνου πτήσης».



Τα  $b$  ιόντα αριθμούνται από το N- προς το C- τελικό

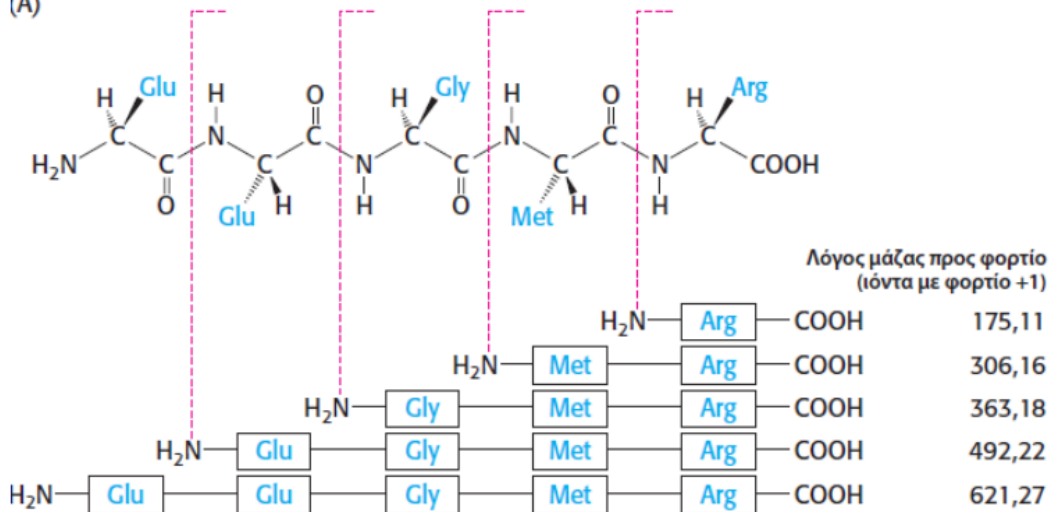
### ΕΙΚΟΝΑ 5B.3

Τα κύρια ιόντα που δημιουργούνται από επαγόμενη θραυσματοποίηση με χαμηλής ενέργειας συγκρούσεις. Οι κυματιστές κόκκινες γραμμές δείχνουν τις θέσεις διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού μέσα στην κυψελίδα συγκρούσεων (βλ. Εικόνα 5B.2).

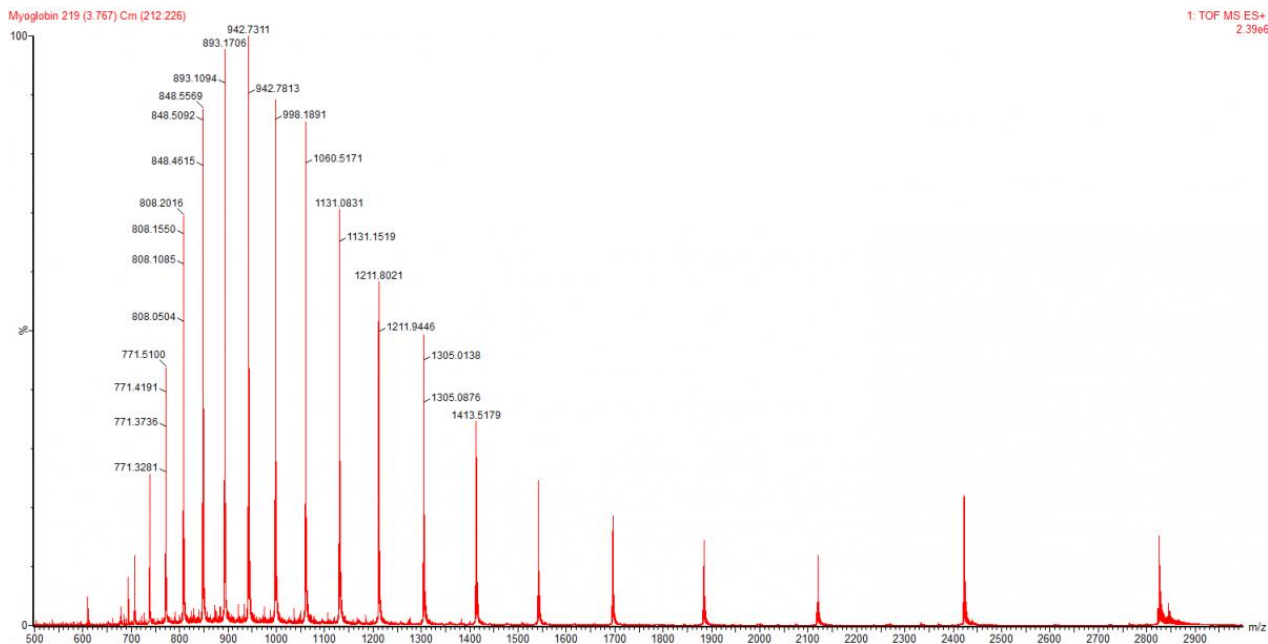
N-τελικά θραύσματα:  $b$  ιόντα  
C-τελικά θραύσματα:  $\gamma$  ιόντα



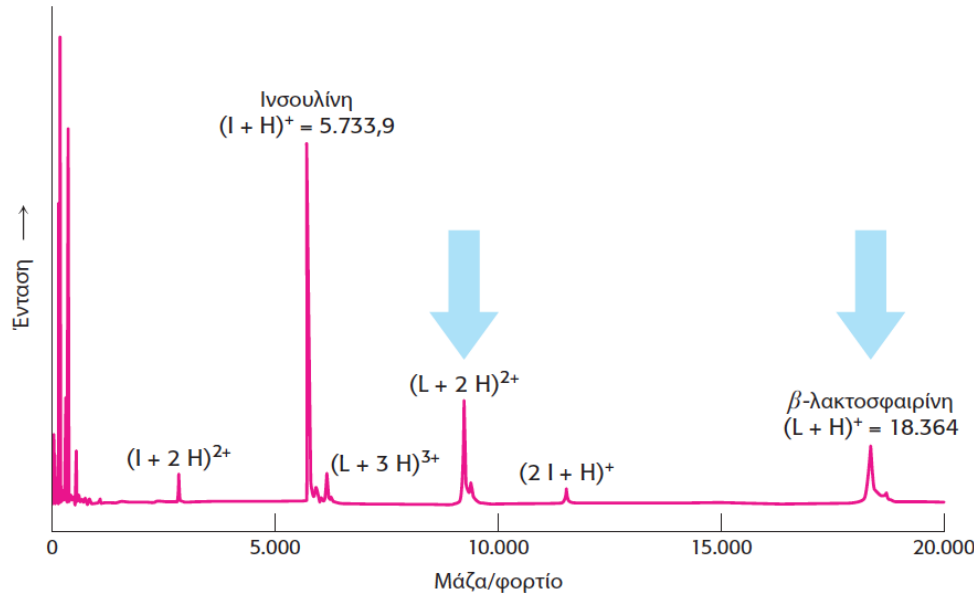
(A)



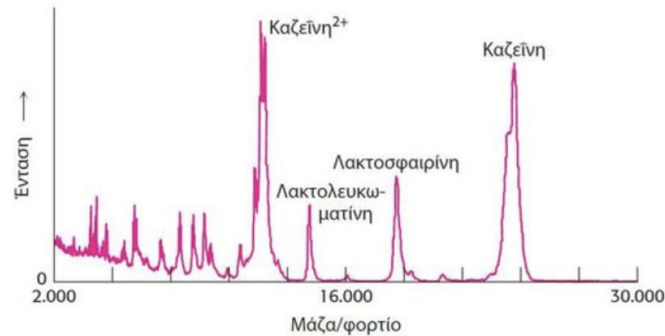
Η αλληλουχία των αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη μπορεί να προσδιοριστεί από τα φάσματα μάζας. Θραυσμάτωση AA από το άκρο της πρωτεΐνης.



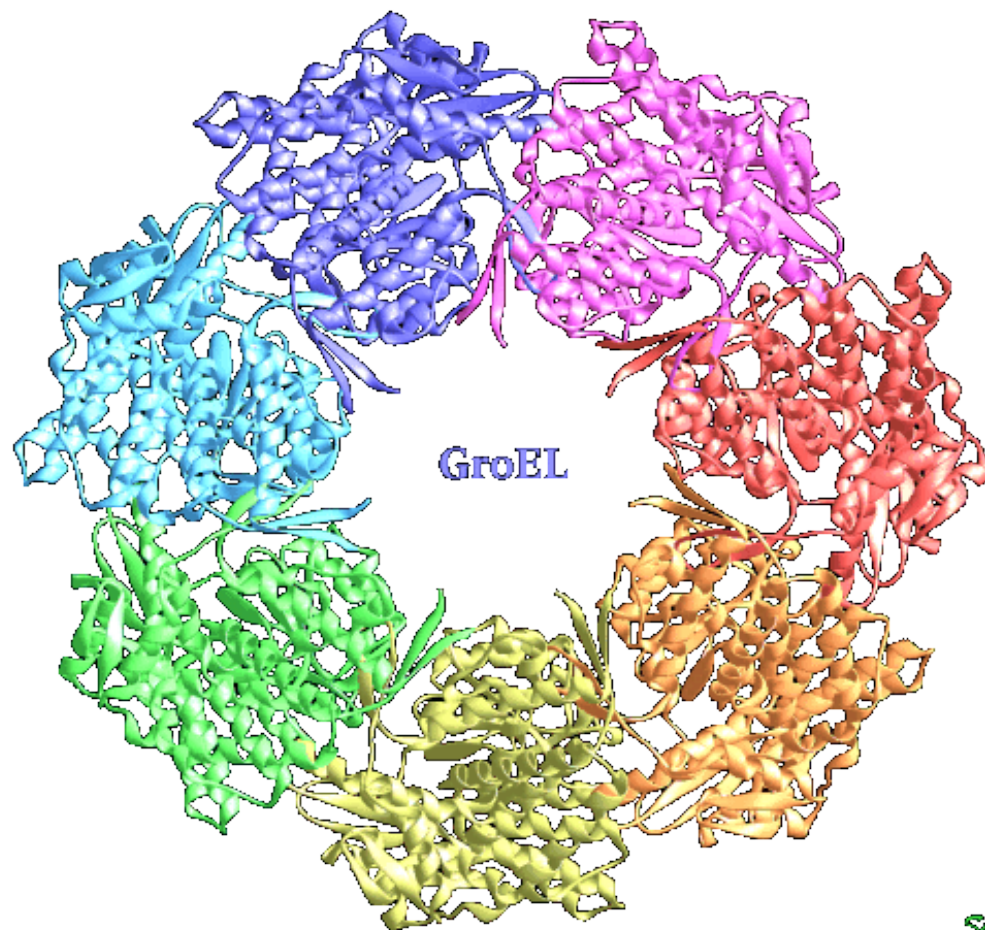
# Φάσμα μάζας πρωτεϊνών



Εικόνα 3.28 Φάσμα μάζας MALDI-TOF της ινσουλίνης και της β-λακτοσφαιρίνης. Μείγμα ινσουλίνης (I) και β-λακτοσφαιρίνης (L), 5 pmol από την κάθε μία, ιοντίζεται με MALDI, που παράγει κυρίως μονήρη φορτισμένα μοριακά ιόντα από πεπτίδια και πρωτεΐνες (I + H<sup>+</sup> για την ινσουλίνη και L + H<sup>+</sup> για τη λακτοσφαιρίνη). Επίσης, παράγονται μόρια με πολλαπλά φορτία, όπως εκείνα της β-λακτοσφαιρίνης που φαίνονται με μπλε βέλη, καθώς και μικρές ποσότητες διμερούς ινσουλίνης με ένα φορτίο (2 I + H<sup>+</sup>). [Κατά J.T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3rd ed. (Lippincott – Raven, 1997), p. 282.]



Το γάλα, η πηγή τροφής όλων των θηλαστικών αποτελείται εν μέρει από μια ποικιλία πρωτεϊνών. Η μελέτη των πρωτεϊνών του γάλακτος που βλέπουμε στο σχήμα έγινε με την τεχνική φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF, που διαχωρίζει τα μόρια βάσει του λόγου της μάζας προς το φορτίο τους. [(Αριστερά) Okea/istockphoto.com. (Δεξιά) ευγενική προσφορά Brian Chait.]



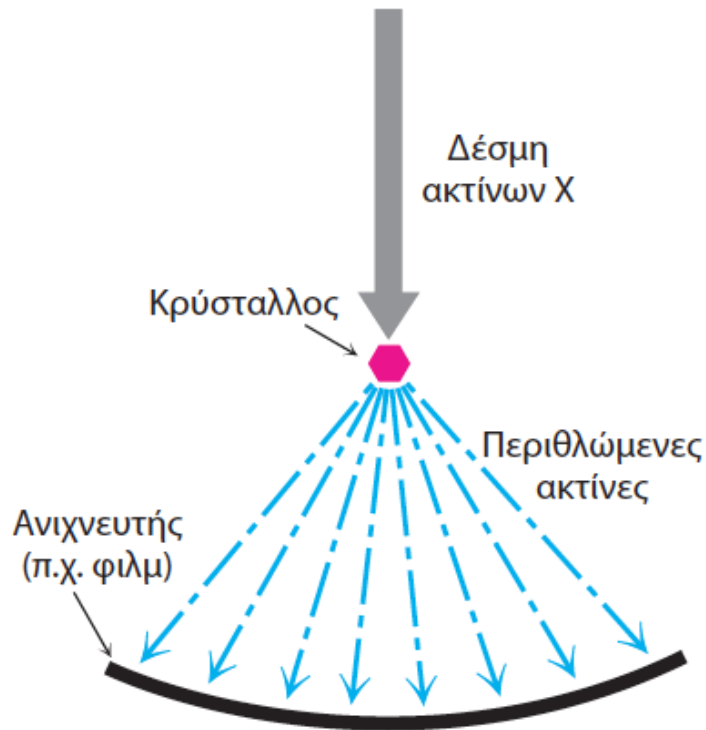
Επίλυση  
δομής  
πρωτεϊνών



[https://www.google.com/search?q=x+ray+protein+crystallography&client=safari&sca\\_esv=586873451&rls=en&biw=1467&bih=907&tbm=vid&ei=PXdpZb\\_WNe2Nxc8PmtmfQA&ved=0ahUKEwj\\_6O-9yO2CAxXtRvEDHZrsBwgQ4dUDCAw&uact=5&oq=x+ray+protein+crys tallography&gs\\_lp=Eg1nd3Mtd2l6LXZpZGVvIh14IHJheSBwcm90ZWlulGNyeXN0YWxsb2dyYXBoeTIIEAAYgAQYogQyCBAAGIAEGKIEMggQABiABBiiBDIIEAAYgAQYogRloRhQ1gVYkBZwAXgAkAEAmAF7oAGTC KoBAzMuN7gBA8gBAPgBAclCChAAGIAEGloFGEPcAgYQABgHGB7 CAgUQABiABMICBBAAGB7CAgcQABiABBgNwglIEAAYCBgHGB7CAg YQABgeGA3CAgoQABgIGAcYHhgTiAYB&scient=gws-wiz- video#fpstate=ive&vld=cid:3b3bf7d8,vid:LioYrxinn28,st:0](https://www.google.com/search?q=x+ray+protein+crystallography&client=safari&sca_esv=586873451&rls=en&biw=1467&bih=907&tbm=vid&ei=PXdpZb_WNe2Nxc8PmtmfQA&ved=0ahUKEwj_6O-9yO2CAxXtRvEDHZrsBwgQ4dUDCAw&uact=5&oq=x+ray+protein+crys tallography&gs_lp=Eg1nd3Mtd2l6LXZpZGVvIh14IHJheSBwcm90ZWlulGNyeXN0YWxsb2dyYXBoeTIIEAAYgAQYogQyCBAAGIAEGKIEMggQABiABBiiBDIIEAAYgAQYogRloRhQ1gVYkBZwAXgAkAEAmAF7oAGTC KoBAzMuN7gBA8gBAPgBAclCChAAGIAEGloFGEPcAgYQABgHGB7 CAgUQABiABMICBBAAGB7CAgcQABiABBgNwglIEAAYCBgHGB7CAg YQABgeGA3CAgoQABgIGAcYHhgTiAYB&scient=gws-wiz- video#fpstate=ive&vld=cid:3b3bf7d8,vid:LioYrxinn28,st:0)

<https://www.youtube.com/watch?v=8SN1kmfhWcs>

# Κρυσταλλογραφία ακτίνων X



**Εικόνα 3.38 Ένα πείραμα κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X.** Μια πηγή ακτίνων X παράγει την αντίστοιχη δέσμη, η οποία περιθλάται από έναν κρύσταλλο. Το προκύπτον σχήμα περίθλασης συλλέγεται από έναν ανιχνευτή.

- Κρύσταλλος πρωτεΐνης
- Πηγή ακτίνων X
- Ανιχνευτής

## A. (Συν)κρυστάλλωση (μέγεθος – ποιότητα)

Εξαλάτωση – κρυστάλλωση

Μεγάλη πρόκληση

Έλεγχος πληθώρας συνθηκών

Ρομποτικά συστήματα κρυστάλλωσης

## B. Πηγή ακτίνων X

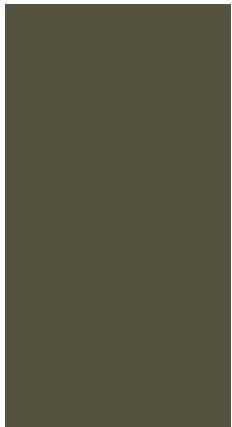
Ηλεκτρόνια σε στόχο χαλκού

Σύγχροτρο (πολύ μεγαλύτερης έντασης)

## Γ. Ανιχνευτής

Ακτινογραφικό φιλμ

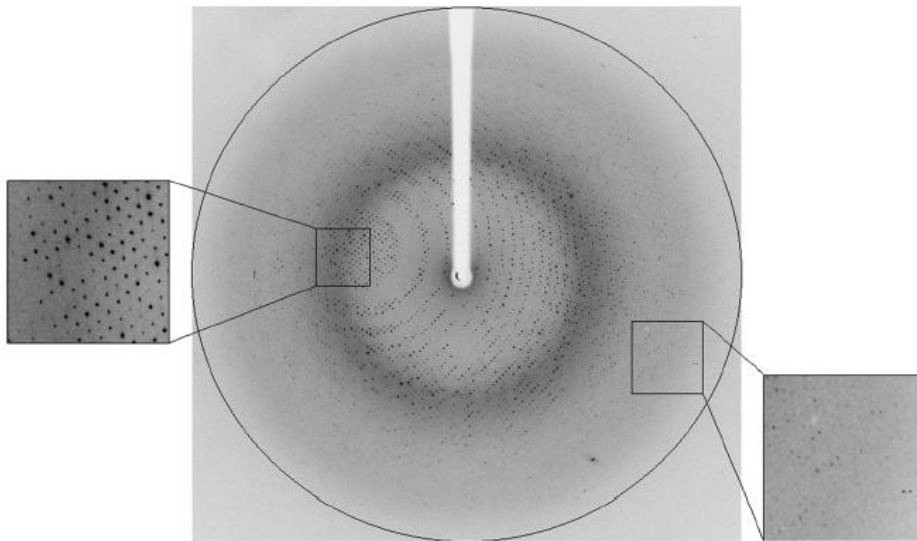
Ηλεκτρονικός ανιχνευτής στερεάς κατάστασης





[Elettra and FERMI - The two lightsources for science and research - YouTube](#)

# Περιθλασίγραμμα



**Εικόνα 3.39 Περιθλασίγραμμα ακτίνων Χ.**

Ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος σκεδάζει τις ακτίνες Χ δημιουργώντας ένα σχήμα από σημεία, ή αντανάκλασεις, στην επιφάνεια του ανιχνευτή. Η λευκή περιοχή στο κέντρο της εικόνας οφείλεται σε ένα εμπόδιο που προστατεύει τον ανιχνευτή από τις ισχυρές μη σκεδασμένες ακτίνες Χ. [S. Lansky, O. Alalouf, V. Solomon, A. Alhassid, L. Govada, N. E. Chayan, H. Belrhali, Y. Shoham, and G. Shoham. *Acta Cryst*, F69: 430-434, Fig. 2.]

- Η ένταση και η θέση των αντανάκλασεων είναι τα βασικά πειραματικά δεδομένα

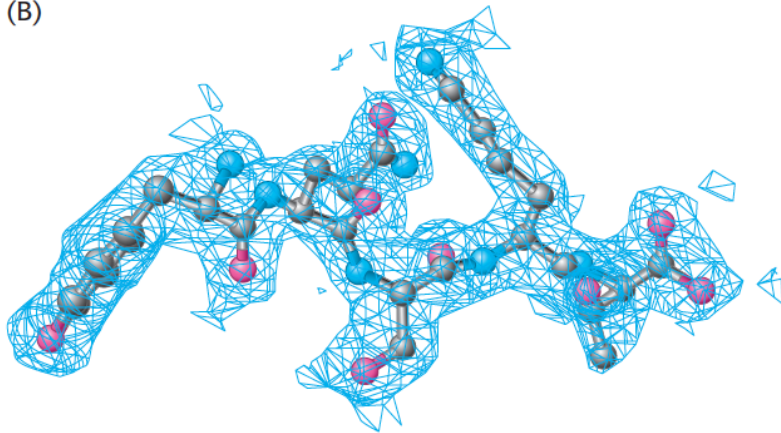


# Ανασύνθεση εικόνας & διακριτική ικανότητα

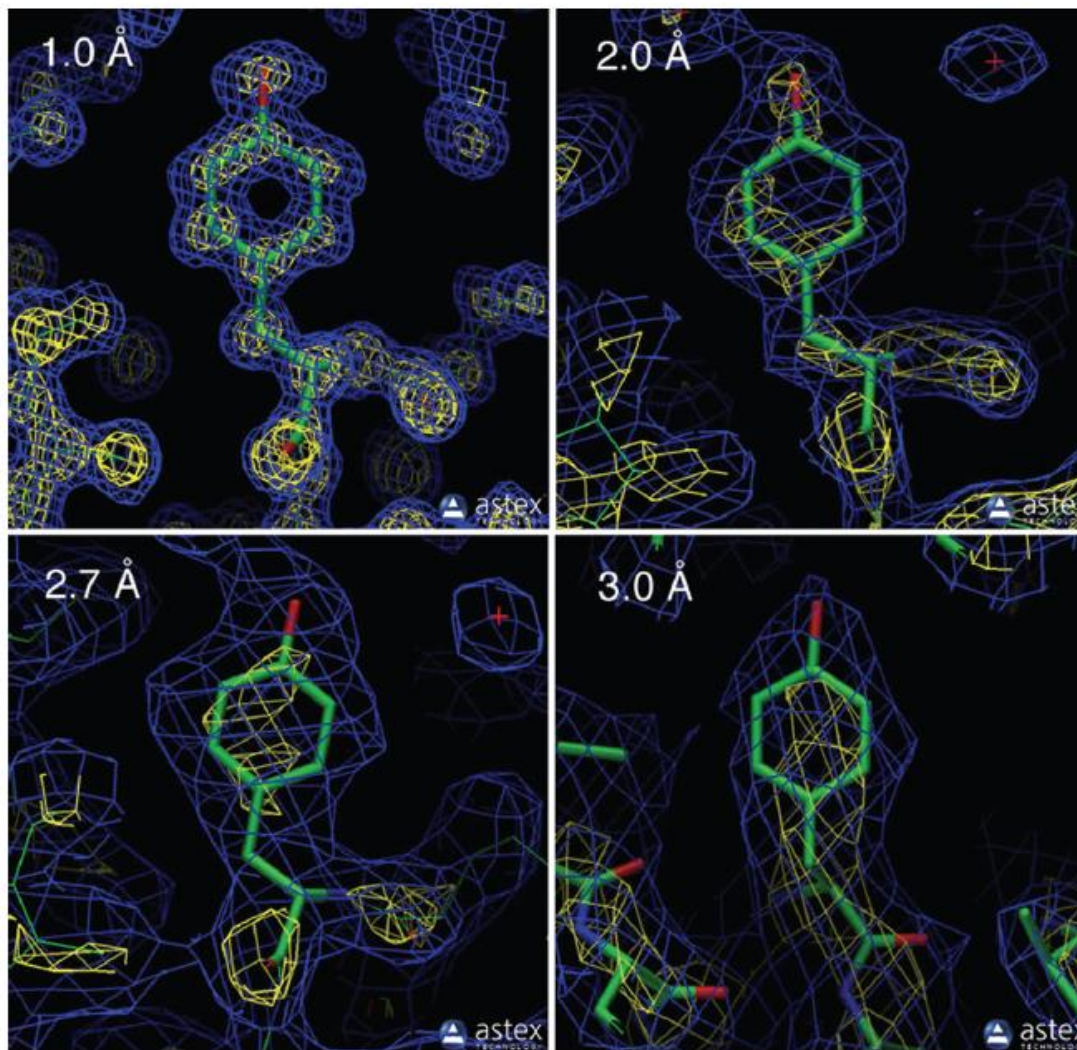
(A)



(B)



**Εικόνα 3.40** Ερμηνεία ενός χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. (A) Τμήμα ενός χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας το οποίο σχεδιάζεται ως τριδιάστατος χάρτης με ισοϋψείς γραμμές, όπου οι περιοχές μέσα στον διαφανόμενο «κλωβό» αντιπροσωπεύουν τις περιοχές της πιο υψηλής ηλεκτρονιακής πυκνότητας. (B) Επάνω στον χάρτη αυτό χτίζεται ένα προσομοίωμα της πρωτεΐνης ώστε να μεγιστοποιηθεί η τοποθέτηση των ατόμων εκεί όπου η πυκνότητα είναι μέγιστη. [Σχεδιασμένο από 1FCH-pdb.]



**Εικόνα 3.42 Η διακριτική ικανότητα επηρεάζει την ποιότητα του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας.** Χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας καταλοίπου τυροσίνης σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα διακριτικής ικανότητας (1,0 Å, 2,0 Å, 2,7 Å και 3,0 Å). Στα χαμηλότερα επίπεδα διακριτικής ικανότητας (2,7 Å και 3,0 Å) διακρίνεται μόνο μια ομάδα ατόμων που αντιστοιχεί στην πλευρική αλυσίδα, ενώ στην ύψιστη διακριτική ικανότητα (1,0 Å) διακρίνονται μεμονωμένα άτομα μέσα στην πλευρική αλυσίδα. [Δεδομένα από [www.rcsb.org/pdb/101/static101.do?p=education\\_discussion/Looking-at-Structures/resolution.html](http://www.rcsb.org/pdb/101/static101.do?p=education_discussion/Looking-at-Structures/resolution.html)]

# Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR - Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

- Φαινόμενο κατά το οποίο οι πυρήνες ατόμων με αυτοστροφομή (spin) υπό την επίδραση ισχυρού στατικού μαγνητικού πεδίου, όταν ακτινοβολούνται διεγείρονται και κατά την αποδιέγερσή τους δίνουν σήμα.



Η φασματοσκοπία NMR αφορά τους πυρήνες των ατόμων και όχι τα  $e^-$

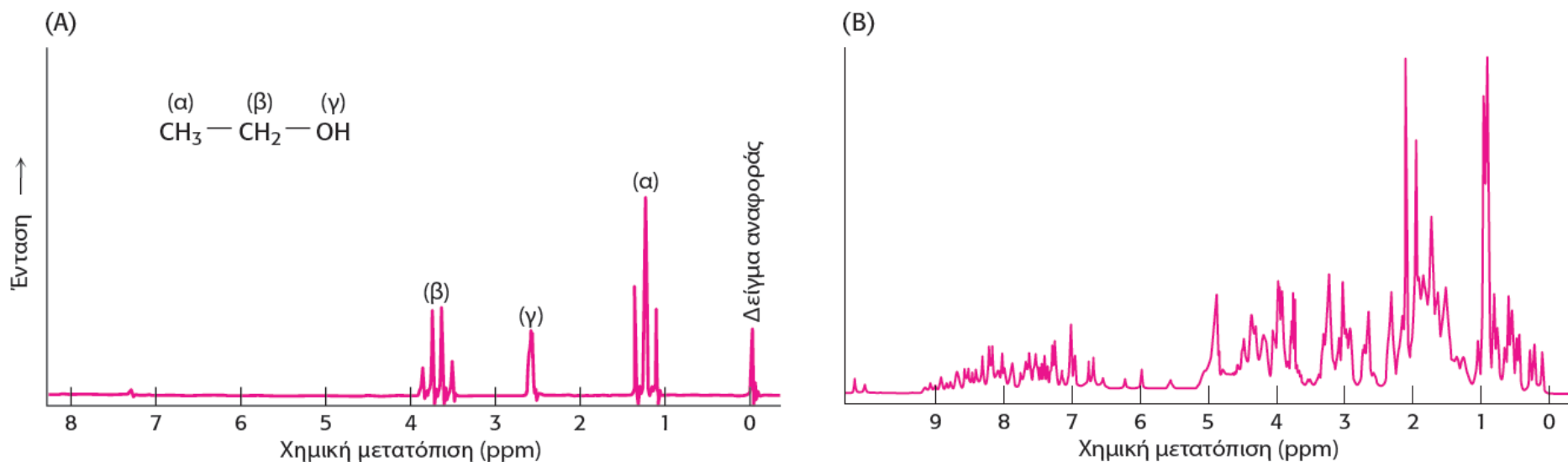
# Πυρηνικός – Μαγνητικός – Συντονισμός

- **Πυρηνικός:** Ανίχνευση πυρήνων με spin.
- **Μαγνητικός:** Λήψη φασμάτων εντός μαγνητικού πεδίου.
- **Συντονισμός:** Οι πυρήνες διεγείρονται με την εκπομπή παλμών υψηλής συχνότητας προς το δείγμα και κατά την αποδιέγερση λαμβάνεται και καταγράφεται το σήμα.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4 Βιολογικά σημαντικοί πυρήνες που δίνουν σήμα NMR

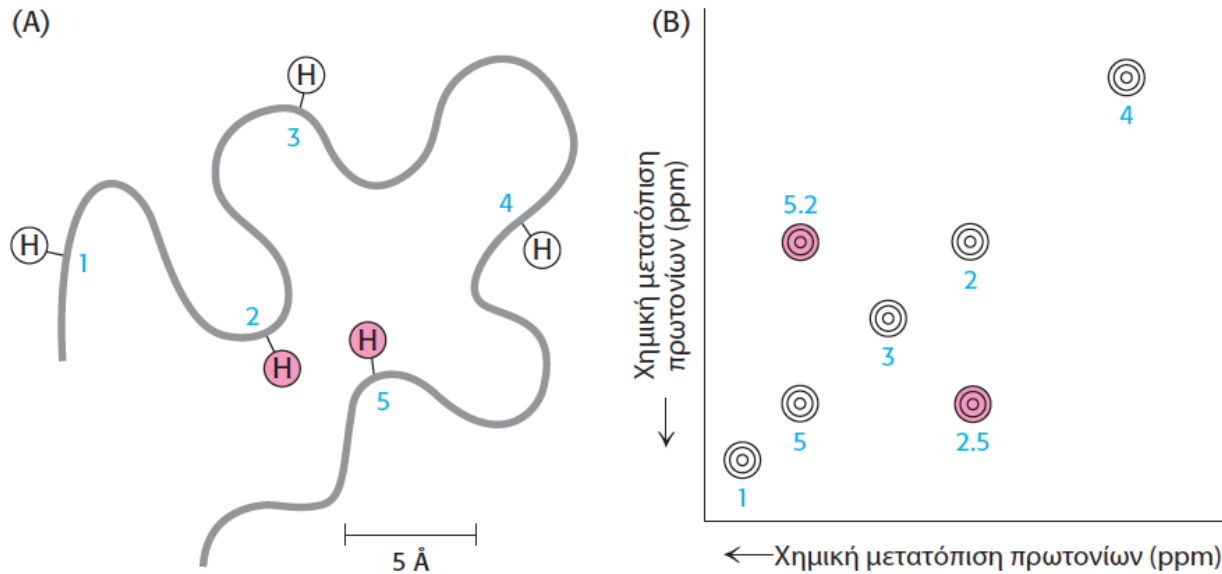
Πυρήνας	Φυσική αφθονία (% κατά μάζα του στοιχείου)
$^1\text{H}$	99,984
$^2\text{H}$	0,016
$^{13}\text{C}$	1,108
$^{14}\text{N}$	99,635
$^{15}\text{N}$	0,365
$^{17}\text{O}$	0,037
$^{23}\text{Na}$	100,0
$^{25}\text{Mg}$	10,05
$^{31}\text{P}$	100,0
$^{35}\text{Cl}$	75,4
$^{39}\text{K}$	93,1

# Χαρακτηριστικά φάσματα NMR



**Εικόνα 3.44 Μονοδιάστατα φάσματα NMR.** (A) Το φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της αιθανόλης (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) παρουσιάζει σαφή διαχωρισμό των χημικών μετατοπίσεων των υδρογόνων. (B) Το φάσμα <sup>1</sup>H-NMR για το θραύσμα μιας πρωτεΐνης 55 αμινοξέων που συμμετέχει στη συρραφή του RNA εμφανίζει μια πιο πολύπλοκη εικόνα. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός κορυφών και πολλές από αυτές αλληλεπικαλύπτονται. [(A) Κατά C. Branden and J. Tooze, *Introduction to Protein Structure* (Garland, 1991), p. 280. (B) Ευγενική προσφορά Dr. Barbara Amann, Dr. Wesley McDermott.]

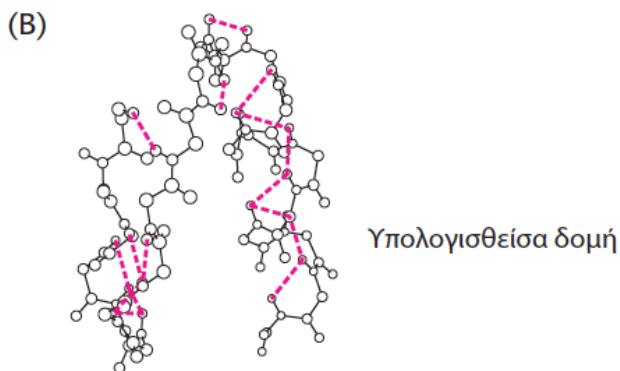
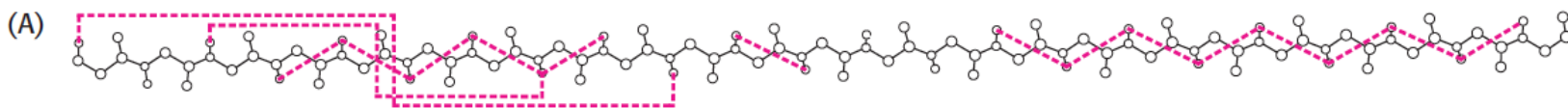
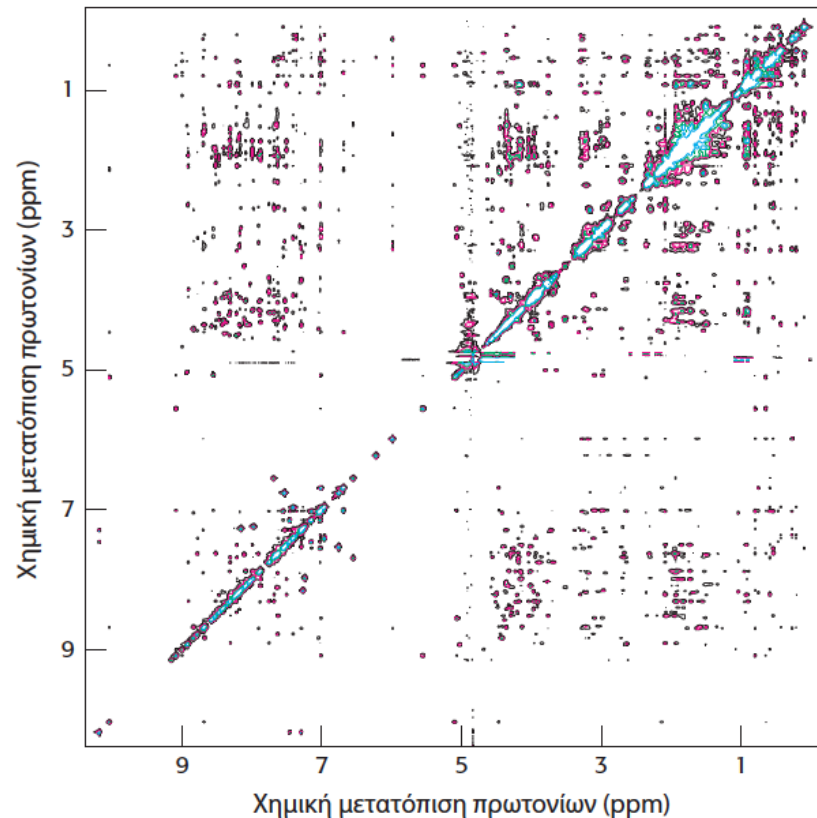
# Φάσματα 2D NOE



**Εικόνα 3.45 Το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser.** Το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser (NOE) ταυτοποιεί ζεύγη πρωτονίων που βρίσκονται το ένα κοντά στο άλλο. (A) Σχηματική απεικόνιση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας που χαρακτηρίζει πέντε συγκεκριμένα πρωτόνια. Τα πρωτόνια 2 και 5 βρίσκονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο (~4 Å απόσταση), ενώ τα άλλα πρωτόνια είναι σε μεγαλύτερη απόσταση το ένα από το άλλο. (B) Ένα υπεραπλουστευμένο φάσμα NOESY. Τα πρωτόνια που είδαμε στο μέρος A εμφανίζονται ως οι πέντε κορυφές που σχηματίζουν μια διαγώνιο γραμμή. Οι άλλες δύο κορυφές, συμμετρικά επάνω και κάτω από τη διαγώνιο, αποκαλύπτουν ότι τα πρωτόνια 2 και 5 βρίσκονται κοντά το ένα στο άλλο.

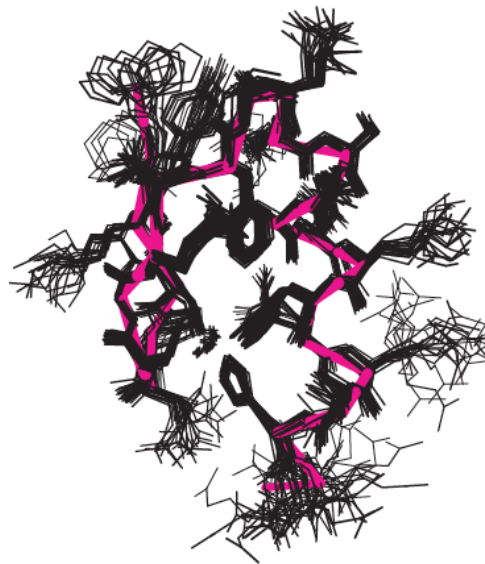
**Ο μαγνητισμός μεταφέρεται από τον διεγερμένο πυρήνα σε άλλον μη διεγερμένο, όταν η μεταξύ τους απόσταση είναι <5 Å**

**Εικόνα 3.46** Ανιχνεύοντας μικρές αποστάσεις μεταξύ πρωτονίων. Φάσμα NOESY για τη δομική περιοχή μιας πρωτεΐνης της συρραφής RNA (55 αμινοξέα). Κάθε κορυφή που βλέπουμε εκτός της διαγωνίου αντιπροσωπεύει μια κοντινή απόσταση μεταξύ δύο πρωτονίων. Το φάσμα αυτό αποκαλύπτει εκατοντάδες τέτοιες κοντινές αποστάσεις μεταξύ πρωτονίων, που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε για να καθορίσουμε την τριδιάστατη δομή αυτής της δομικής περιοχής. [Ευγενική προσφορά Dr. Barbara Amann και Dr. Wesley McDermott.]



**Εικόνα 3.47** Δομές που υπολογίζονται με βάση τους περιορισμούς των φασμάτων NMR. (A) Οι παρατηρήσεις NOESY δείχνουν ότι τα πρωτόνια (που συνδέονται με διακεκομμένες κόκκινες γραμμές) βρίσκονται το ένα κοντά στο άλλο. (B) Η τριδιάστατη δομή υπολογίστηκε έτσι ώστε τα συγκεκριμένα ζεύγη πρωτονίων να βρίσκονται το ένα κοντά στο άλλο.





**Εικόνα 3.48 Μια οικογένεια δομών.** Σύνολο 15 δομών για μια δομική περιοχή 28 αμινοξέων που ανήκει σε πρωτεΐνη δακτύλιου μευδαργύρου η οποία δεσμεύεται στο DNA. Η κόκκινη γραμμή απεικονίζει τον μέσο όρο των θέσεων του πολυπεπτιδικού κορμού της πρωτεΐνης. Κάθε δομή ταιριάζει με τις περιοριστικές συνθήκες που προέκυψαν από πειράματα NMR. Οι διαφορές στις δομές οφείλονται σε συνδυασμό δύο παραγόντων όπως οι ατέλειες στα πειραματικά δεδομένα και η δυναμική φύση των πρωτεϊνών σε διάλυμα. [Ευγενική προσφορά Dr. Barbara Lammann.]

## Οικογένειες δομών

- Περιοριστικές αποστάσεις δεν είναι αρκετές
- Κατ' εκτίμηση ποσοτικοποίηση σημάτων – αποστάσεων
- Στο δείγμα βρίσκονται πολλά μόρια με μικρές διαφορές στη δομή τους