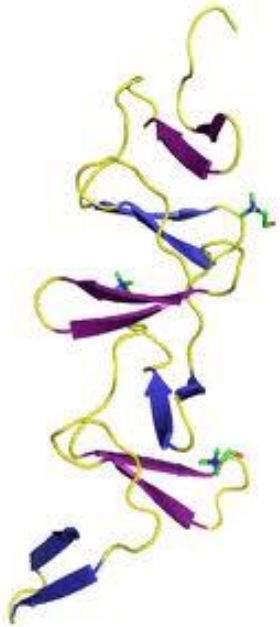
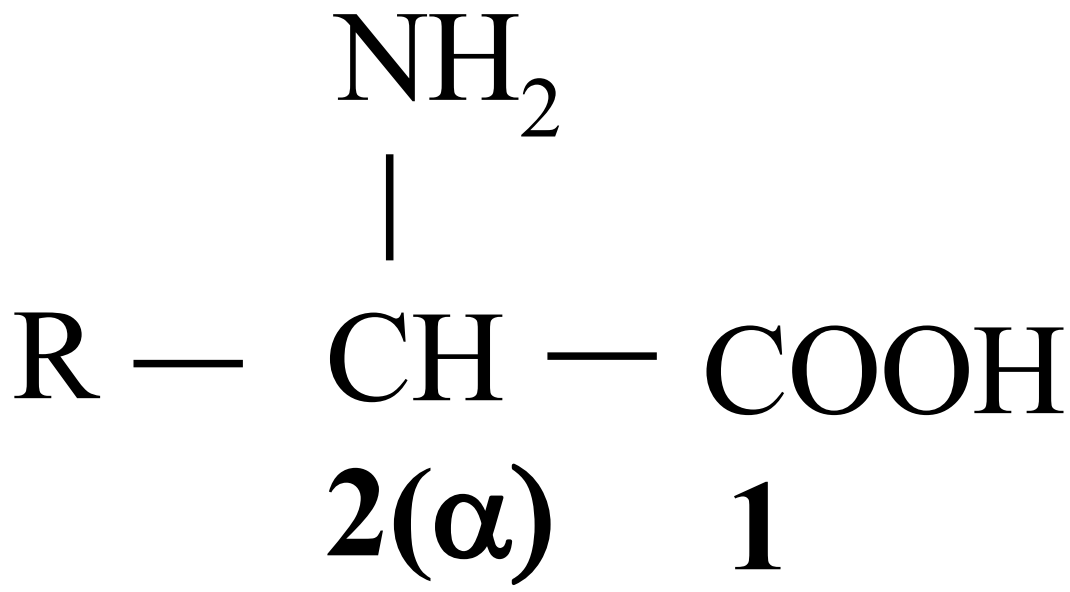


# PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

**Prof. Dr. Nuriye AKEV**
**Biokimya Anabilim Dalı**
**(2013)**

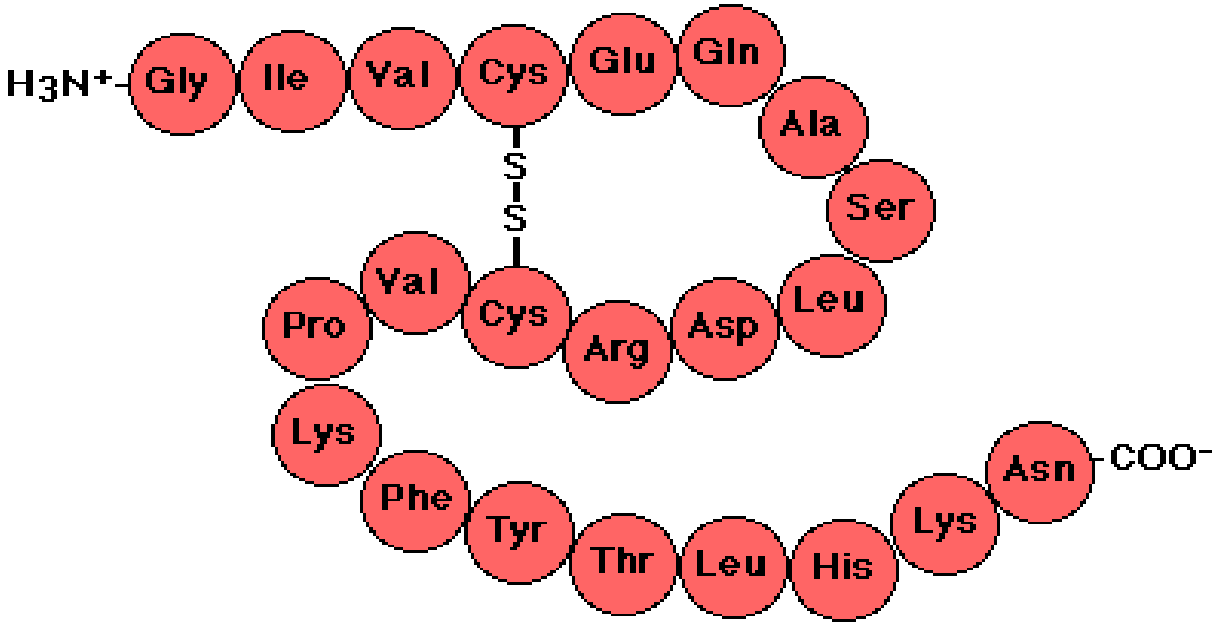
# PROTEİNLERİN YAPISI



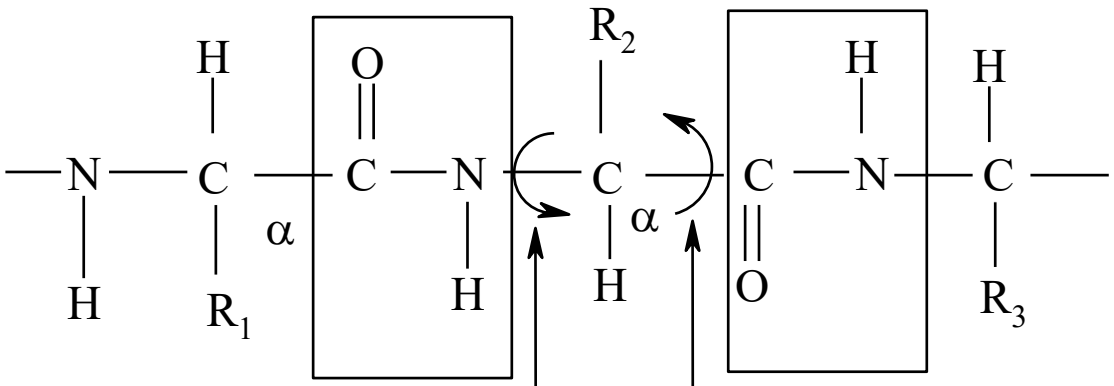

Amino asid genel formülü
(R: alkil kökü)

| **R grubuna göre sınıflandırma** | **Amino asidin adı** | **Kısaltamış adı 3 harfli** | **Kısaltmış adı tek harfli** |
|---|---|---|---|
| ***Alifatik*** | | | |
| Monoamino monokarbosiklik | Glisin<br>Alanin<br>Valin<br>Lösin<br>İzolösin<br>Serin<br>Treonin | Gli<br>Ala<br>Val<br>Leu<br>Ile<br>Ser<br>Thr | G<br>A<br>V<br>L<br>l<br>S<br>T |
| Monoamino dikarboksilik | Aspartik asid<br>Glutamik asid<br>Asparagin<br>Glutamin | Asp<br>Glu<br>Asn<br>Glu | D<br>E<br>N<br>Q |
| Diamino monokarboksilik | Lizin | Lys | K |
| Kükürtlü | Sistein<br>Metionin | Cys<br>Met | C<br>M |
| Guanido gruplu | Arginin | Arg | R |
| ***Siklik*** | | | |
| Karbosiklik | Fenilalanin<br>Tirozin | Phe<br>Tyr | F<br>Y |
| Heterosiklik | Triptofan<br>Histidin<br>Prolin | Trp<br>His<br>Pro | W<br>H<br>P |

# Proteinlerin birincil yapısı



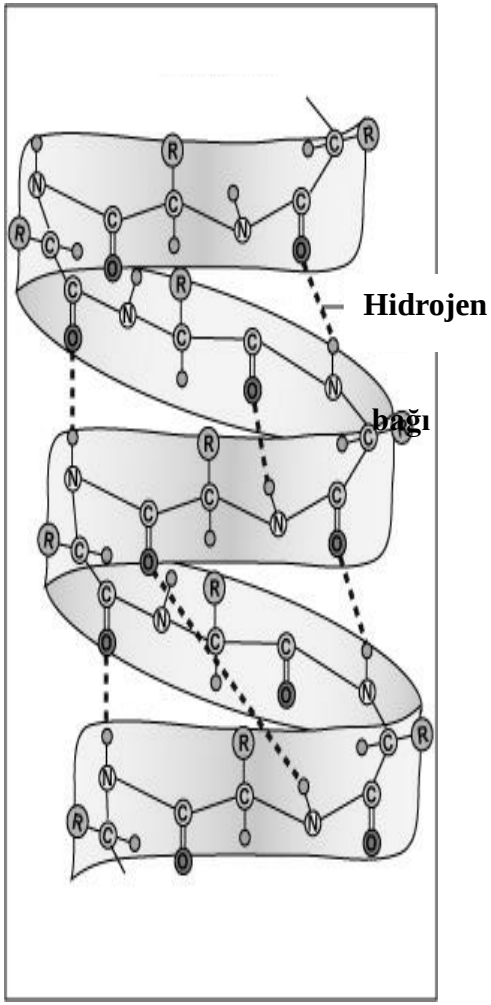
Bir düzlem üzerindeki sabit peptid bağları



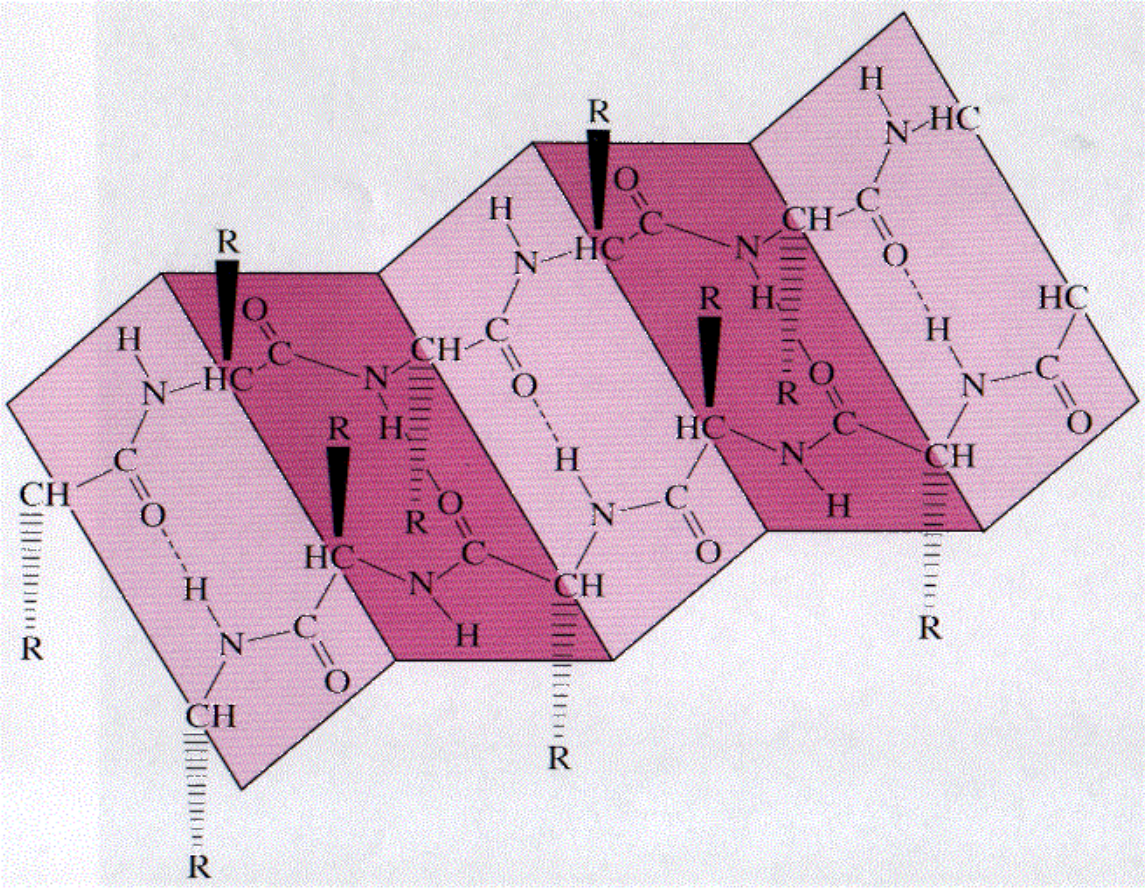

$N\text{-}C_\alpha$ bağı serbestçe dönebilir
Dönme açısı: $\phi$

$C_\alpha\text{-}C$ bağı serbestçe dönebilir
Dönme açısı: $\psi$

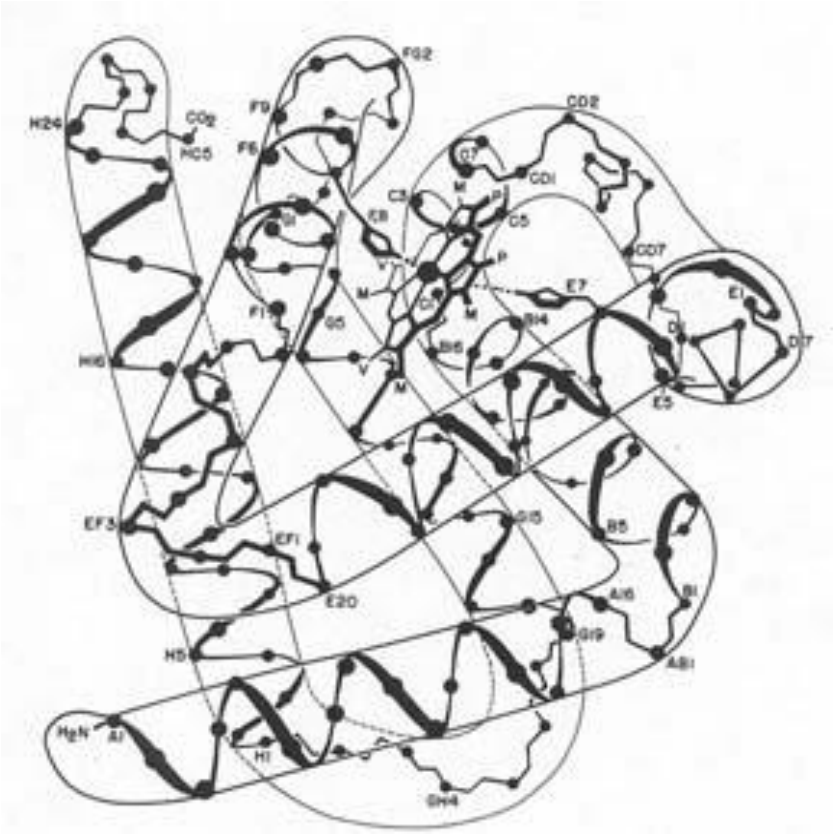
# Proteinlerin ikincil yapısının α-helezon konformasyonu

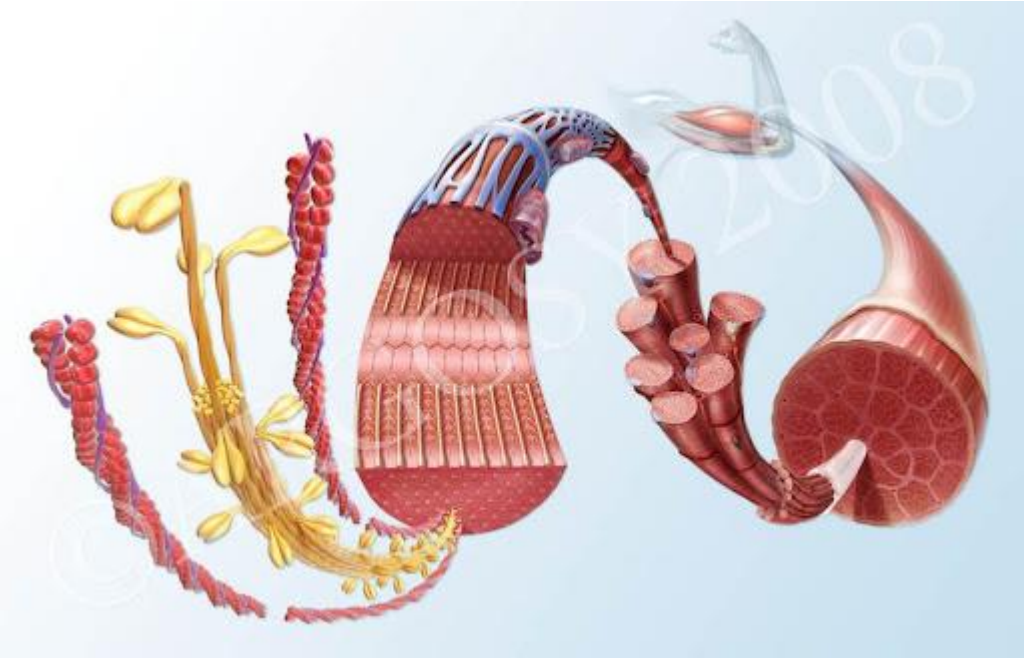


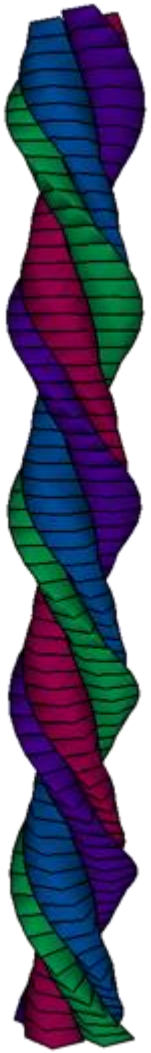
# Proteinlerin ikincil yapısında β-kırmalı tabaka yapısı



# Miyoglobin molekülünün üçüncül yapısı.



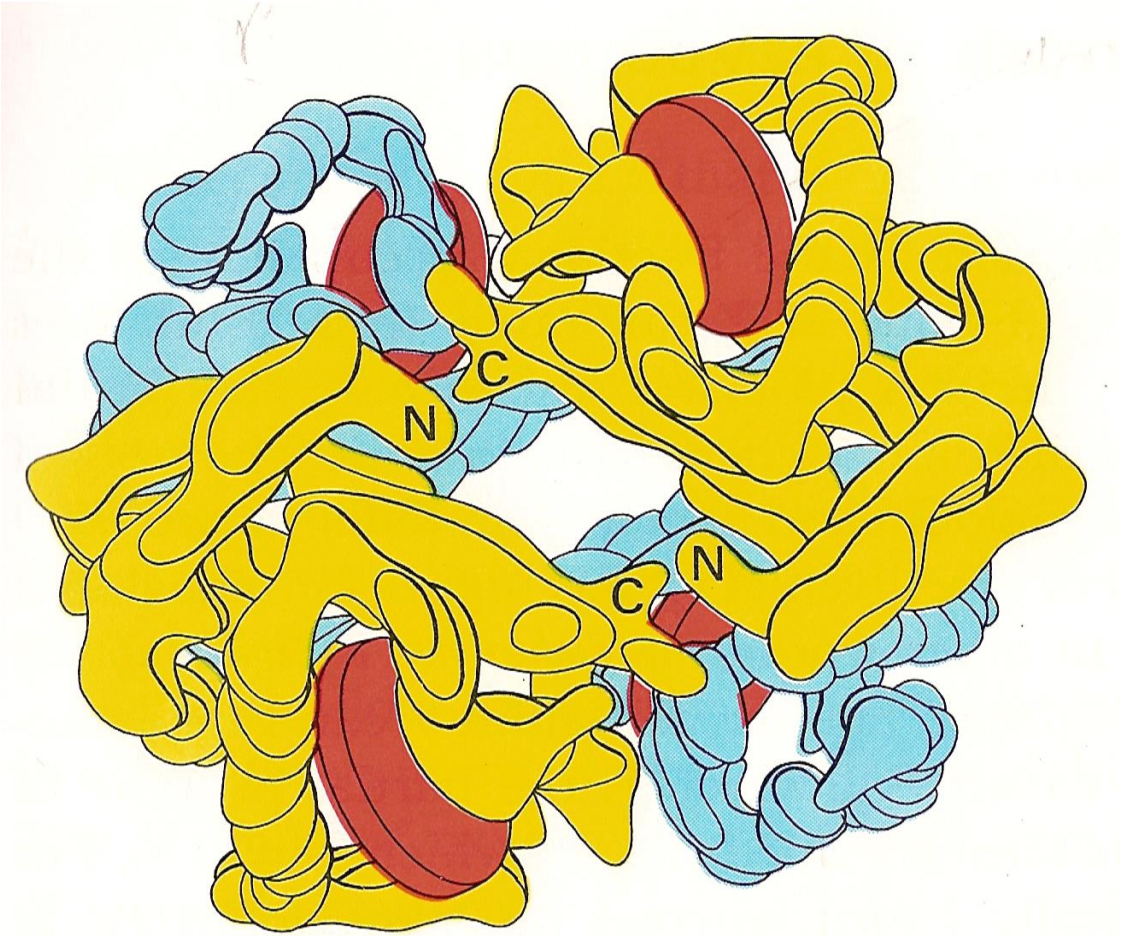




# Kollajenin fibriler yapısı

# (Üçüncül yapı)

# Hemoglobin molekülü, dördüncül yapı

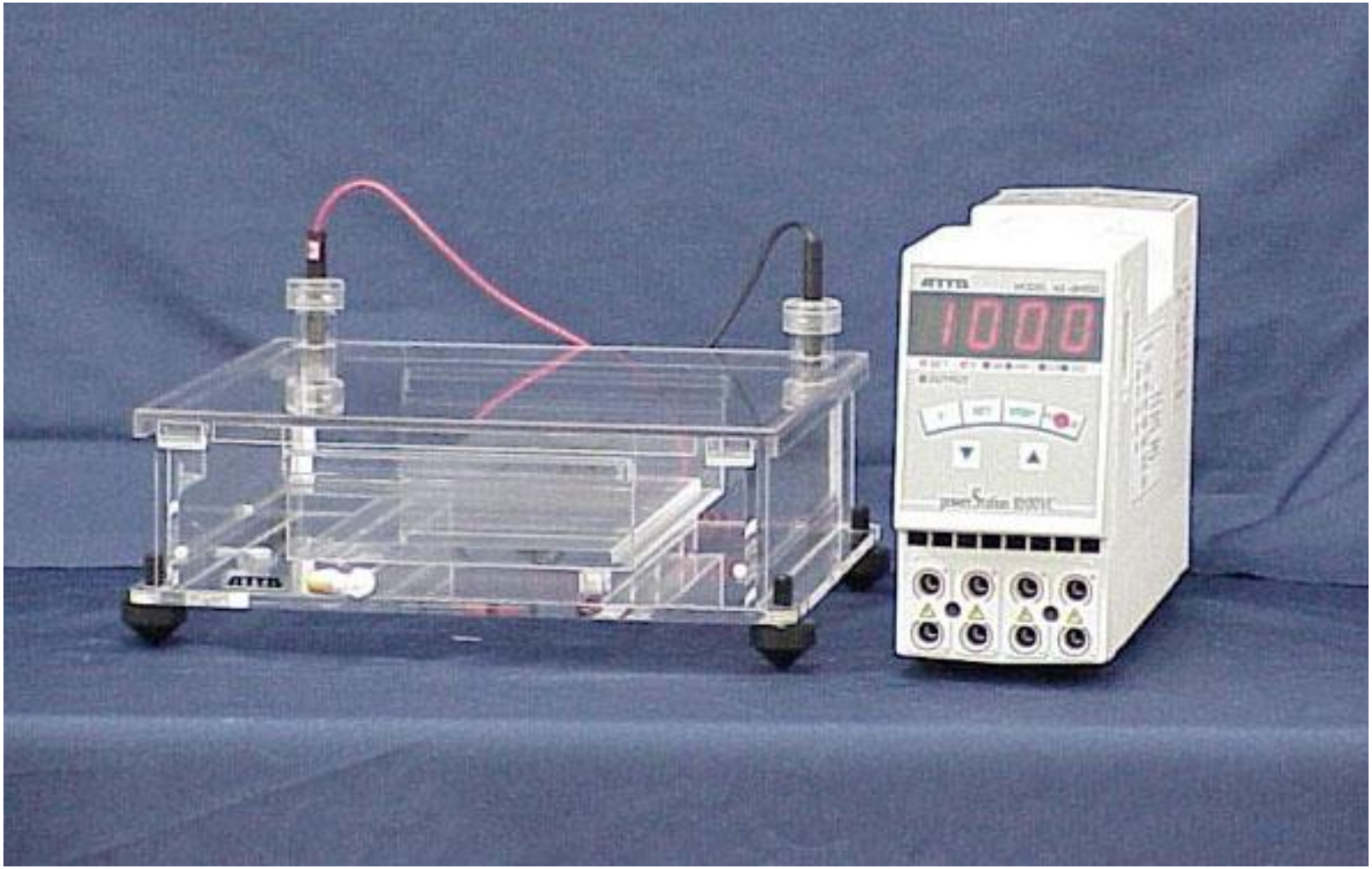


# Post-translasyonel (tercüme sonrası) değişiklikler

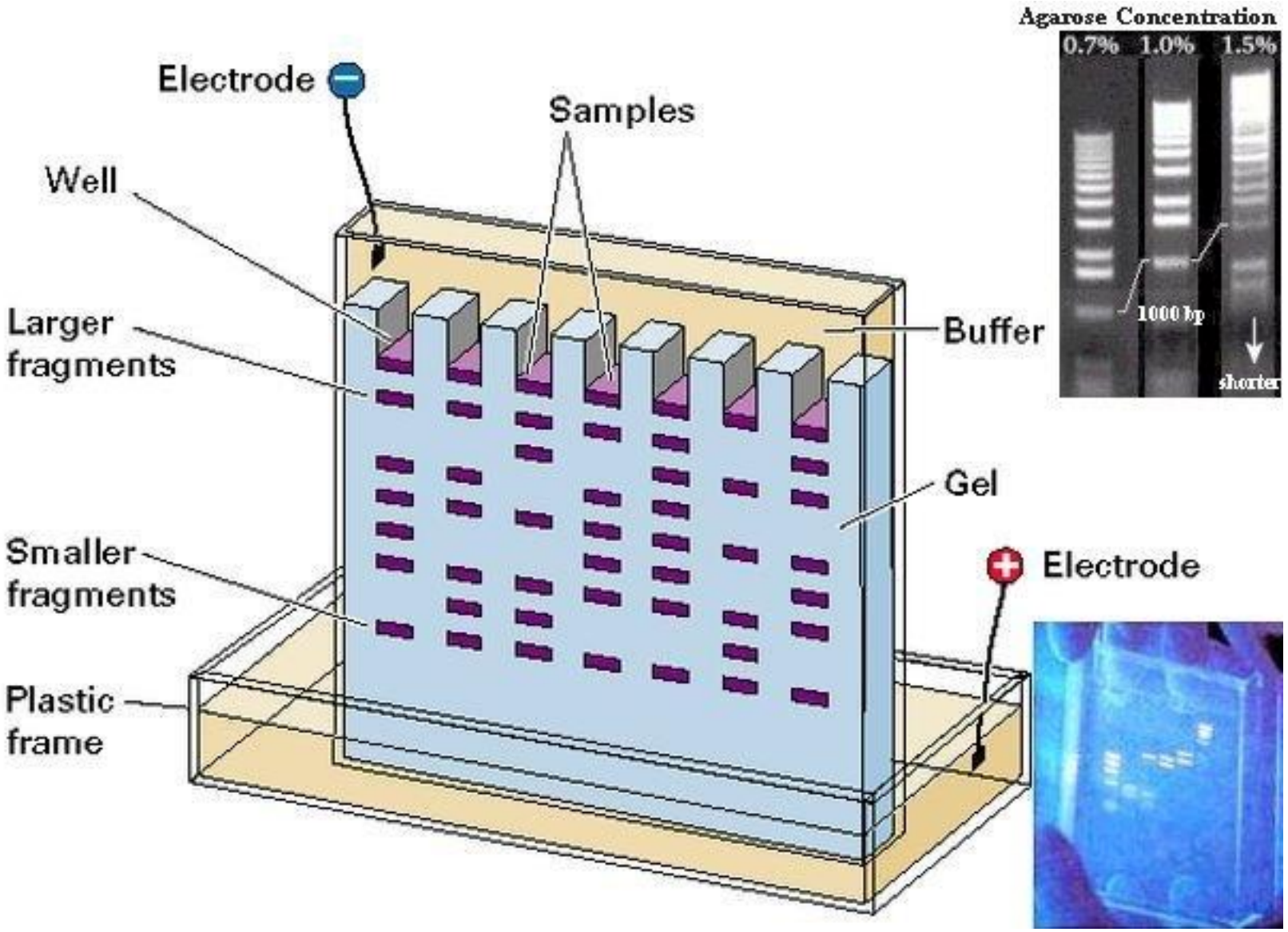
- **Proteolitik işlemleme** (processing): sindirim enzimleri ve kan pıhtılaşmasında rolü olan enzimler, proteolize uğradıktan sonra aktive olurlar.
- **Glikozilasyon:** Karbohidrat birimlerinin eklenmesiyle bazı proteinlerin çözünürlüğü artar, bazıları ise aktive olurlar. Karbohidrat birimlerini ekleyen enzimler olan *glikoziltransferazlar* hücrenin endoplazmik retikulumunda bulunurlar.
- **Fosforilasyon:** Polipeptid yapısındaki çeşitli hormonların aktivitelerini düzenler.
- **Asetilasyon:** İşlevi bilinmiyor.
- **Açilasyon:** Bazı proteinlerin biyolojik zarlara gömülmesini sağlayabilir.
- **Amidasyon:** Proteinlerin stabilitesini ve aktivitesini etkiler.
- **Sülfasyon:** Bazı nöropeptidlerin biyolojik aktivitesini etkiler.
- **Hidroksilasyon:** Bazı proteinlerin yapı bütünlüğü için önemlidir.
- **γ-Karboksiglutamat oluşması:** Bazı kan proteinlerinin kalsiyumu bağlayabilmesi için önemlidir.
- **ADP-ribozilasyon:** Birçok proteinin biyolojik aktivitesini düzenler.
- **Disülfür bağlarının oluşması:** Bazı proteinlerin konformasyonlarını stabilize eder (skleroproteinlerin dayanıklılığı bunlardan ileri gelir).

# PROTEİNLERİN ÖZELLİKLERİ

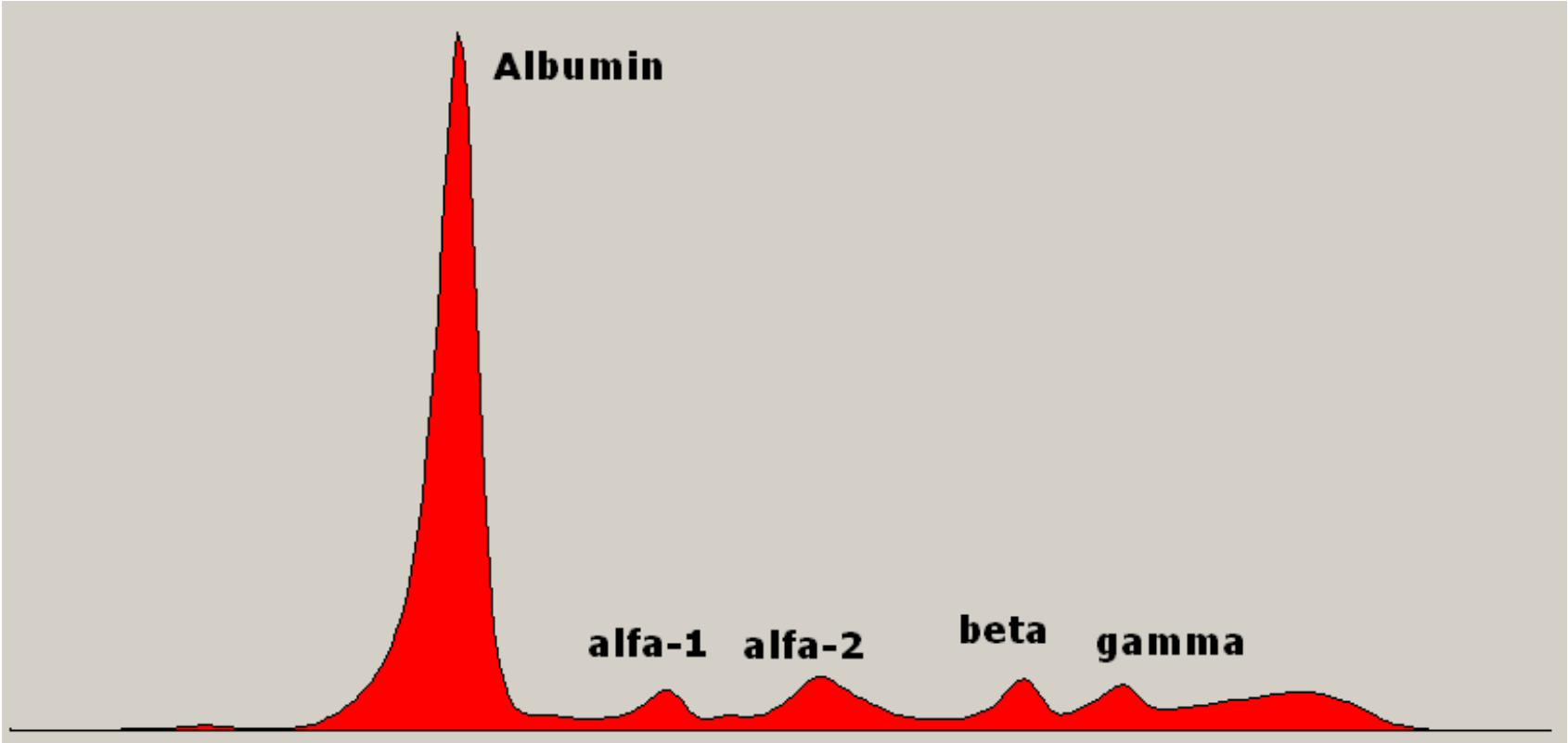
- **Molekül ağırlıkları**
- **Denatürasyonları**
- **Amfolit özellikleri**
- **Elektroforez**
- **Çöktürülmeleri**
- 1S1
- çeşitli tuzlar (amonyum sülfat, magnezyum sülfat, sodyum sülfat)
- organik çözücüler
- 1S1
- asid ve bazlar



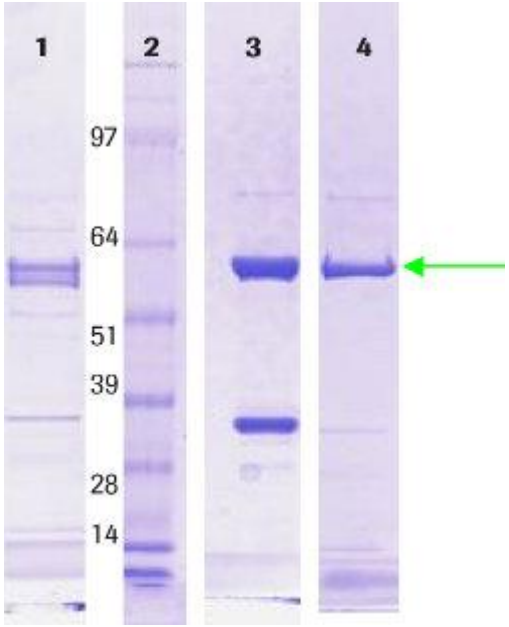

**Elektroforez cihazı**

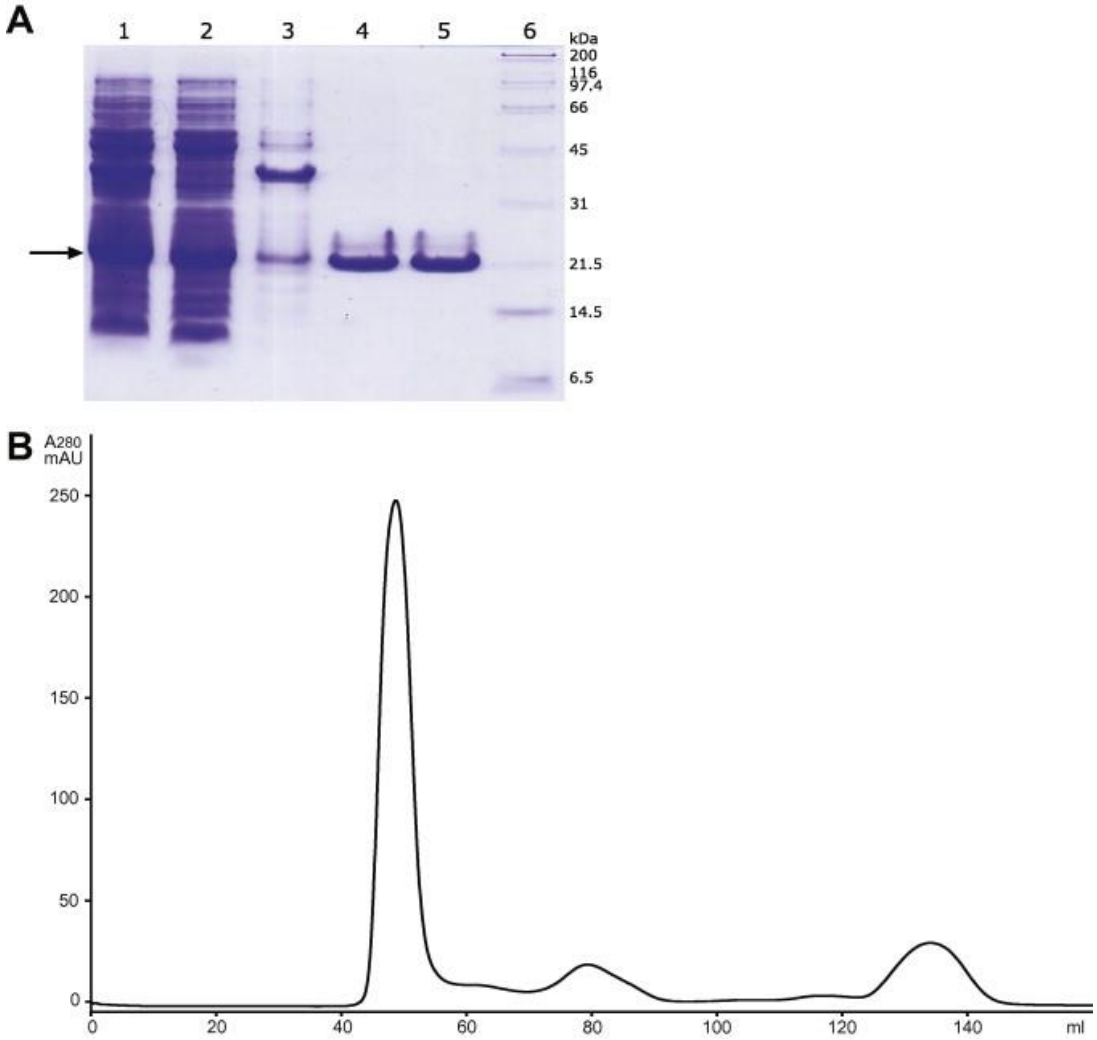



# Elektroforez ve elektroferogramlar




**Normal insan serumu elektroferogramı**

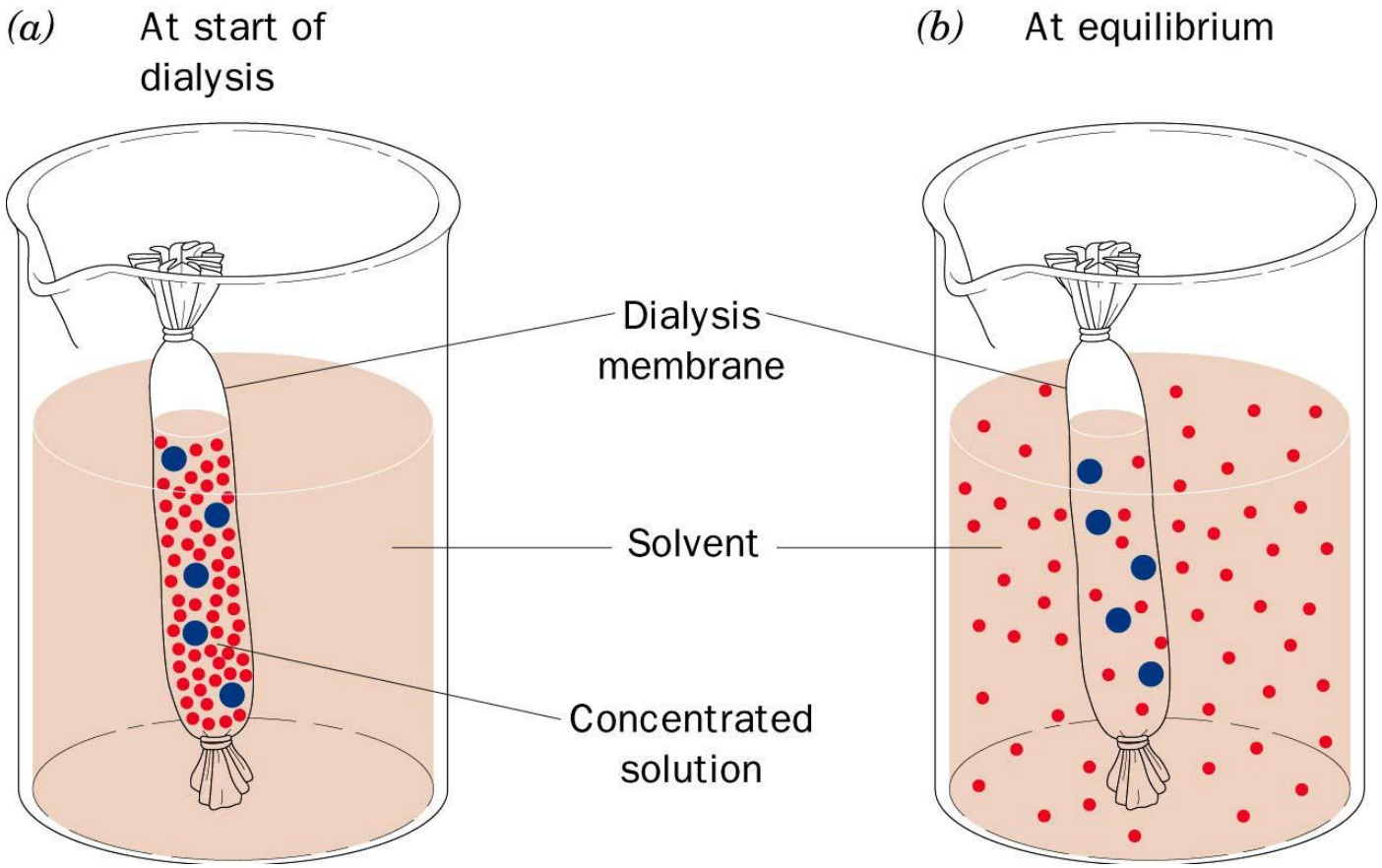



**Poliakrilamid jel elektroforezinde (PAGE) Comassie brilliant blue ile boyanmış protein bandları**

# Dializ tüpleri

# Protein çözeltisinin dializi



# Proteinlerin amino asid dizilişinin (sekansının) belirlenmesi

Kimyasal dizi analizi (**Edman degradasyonu**)

Fiziksel parçalamadan sonra analiz: **Kütle spektrometrisi** (Mass spectrometry)

**Gen sekanslama**

# Swiss-Prot Databazı



| | |
|---|---|
| **General information about the entry** | |
| Entry name | INS_HUMAN |
| Primary accession number | P01308 |
| Secondary accession number(s) | None |
| Entered in SWISS-PROT in | Release 01, July 1986 |
| Sequence was last modified in | Release 01, July 1986 |
| Annotations were last modified in | Release 39, May 2000 |
| **Name and origin of the protein** | |
| Protein name | INSULIN [Precursor] |
| Synonym(s) | None |
| Gene name(s) | INS |
| From | *Homo sapiens (Human)* [TaxID: 9606] |
| Taxonomy | Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo. |

**Features**

| | | | |
|---|---|---|---|
| SIGNAL | 1 | 24 | |
| CHAIN | 25 | 54 | INSULIN B CHAIN. |
| PROPEP | 57 | 87 | C PEPTIDE. |
| CHAIN | 90 | 110 | INSULIN A CHAIN. |
| DISULFID | 31 | 96 | INTERCHAIN. |
| DISULFID | 43 | 109 | INTERCHAIN. |
| DISULFID | 95 | 100 | |
| VARIANT | 34 | 34 | N → D (IN PROVIDENCE; FAMILIAL HYPERPROINSULINEMIA). /FTID = VAR_003971. |
| VARIANT | 48 | 48 | F → S (IN LOS-ANGELES; TYPE-II DIABETES MELLITUS). /FTID = VAR_003972. |
| VARIANT | 49 | 49 | F → L (IN CHICAGO). /FTID = VAR_003973. |
| VARIANT | 89 | 89 | R → H (IN FAMILIAL HYPERPROINSULINEMIA; IMPAIRS POSTTRANSLATIONAL CLEAVAGE). /FTID = VAR_003974. |
| VARIANT | 89 | 89 | R → L (IN KYOTO; FAMILIAL HYPERPROINSULINEMIA). /FTID = VAR_003975. |
| VARIANT | 92 | 92 | V → L (IN WAKAYAMA). /FTID = VAR_003976. |
| TURN | 32 | 32 | |
| HELIX | 33 | 46 | |
| STRAND | 48 | 50 | |
| HELIX | 91 | 95 | |
| TURN | 98 | 97 | |
| HELIX | 102 | 108 | |
| STRAND | 109 | 109 | |

Feature table viewer

**Sequence information**

| | | |
|---|---|---|
| Length: **110 AA** [This is the length of the unproceesed precursor] | Molecular weight: **11981 Da** [This is the Mw of the unprocessed precursor] | CRC64: **C2C3B23B85E520E5** [This is a checksum on the sequence] |

```
        10        20        30        40        50        60
         |         |         |         |         |         |
MALWMRLLPL LALLALWGPD PAAAFVNQHL CGSHLVEALY LVCGERGFFY TPKTRREAED
        70        80        90       100       110
         |         |         |         |         |
LQVGQVELGG GPGAGSLQPL ALEGSLQKRG IVEQCCTSIC SLYQLENYCN
```

P01308 in *FASTA format*

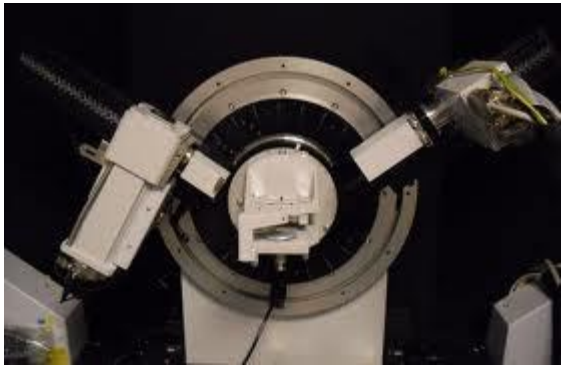
**Figure 2.4** Sample entry for human insulin as present in the Swiss-Prot database. Refer to text for further details. Reproduced from the Swiss-Prot database on the Uniprot website htt://www.ebi.uniprot.org/

### 2.2.4 Polypeptide synthesis

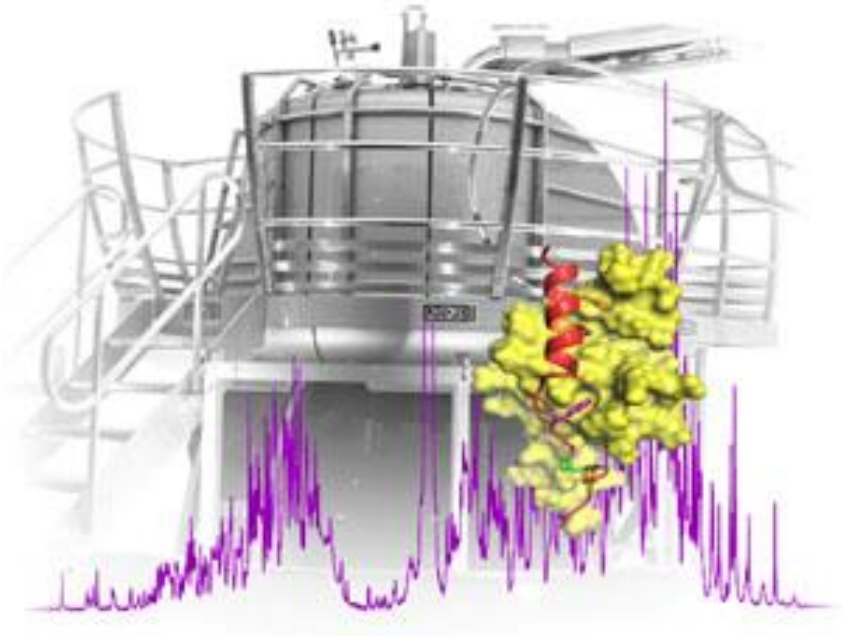
Full-scale polypeptide characterization usually requires modest/large (milligram to gram) amounts of the purified target polypeptide. Even larger quantities are then generally required

# Proteinin üç boyutlu yapısının belirlenmesi

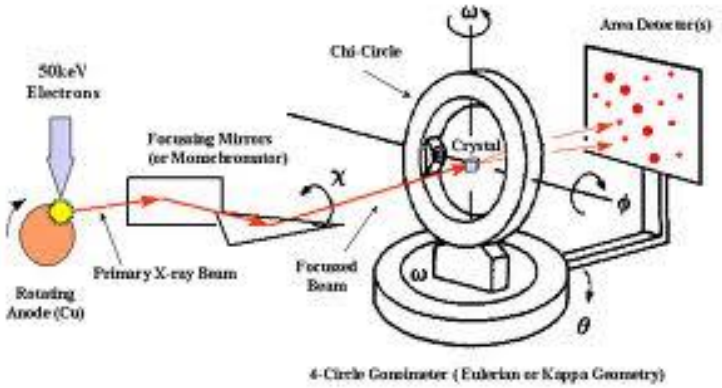
- X-ışını difraksiyonu
- NMR
- Elektron mikroskopisi

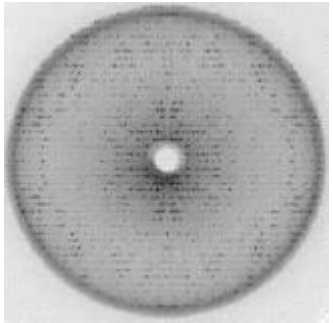


X-ışını difraksiyonu



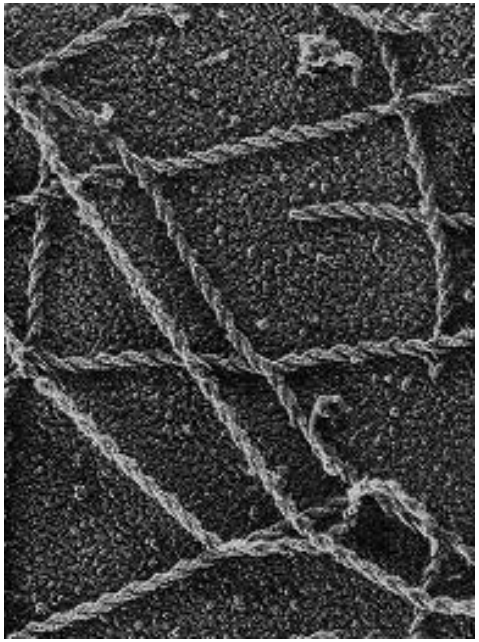
NMR cihazı



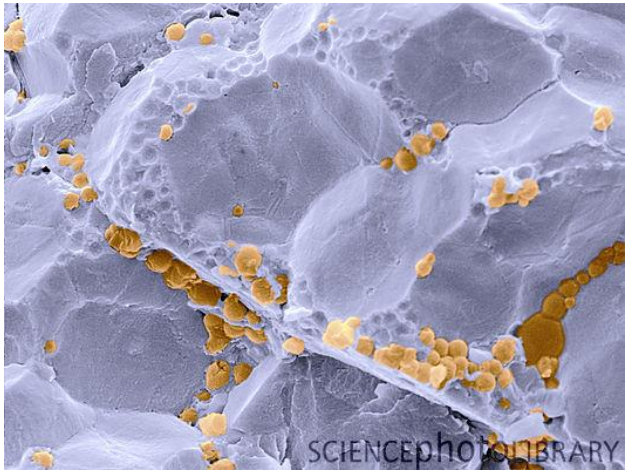



X-ışını difraksiyonu

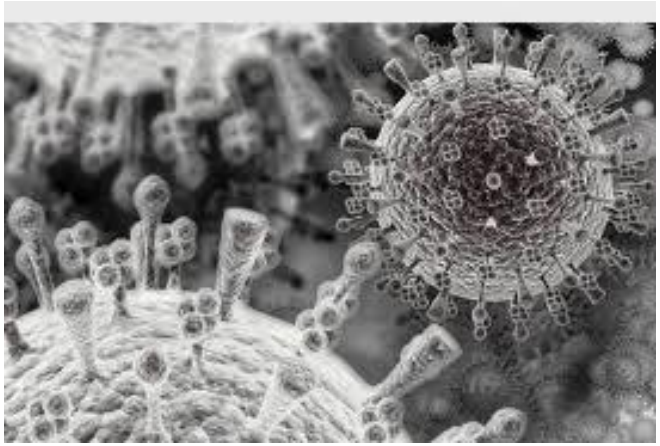
**SEM Scanning electron microscope**



**Aktin filamentleri**




**Pirinç tanesi**



**Kuş gribi virusu**

# PROTEİNİN BELİRLENMESİ VE MİKTAR TAYİNİ

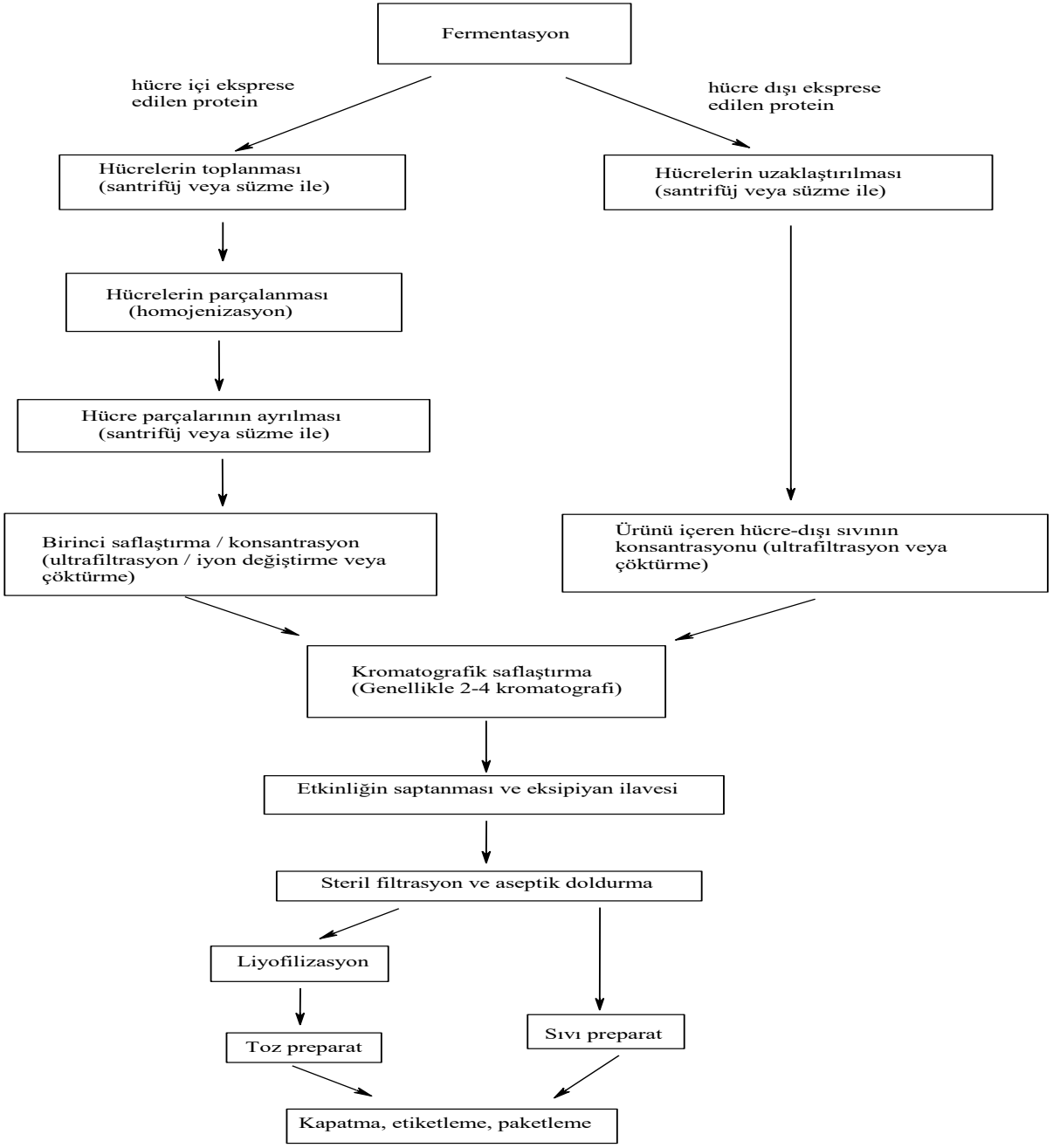
| Yöntem | Etki tarzı |
|---|---|
| 280 nm'de absorbans (UV) | Aromatik amino asidlerin R gruplarının 280 nm'deki absorbansına dayanır. |
| 205 nm'de absorbans (uzak UV) | Peptid bağları bu dalga boyunda absorbsiyon verir. |
| Ninhidrin | Proteinler d. $H_2SO_4$ ile 100$^o$Cde inkübe edilerek hidroliz edilir. Amino asidlerin ninhidrin ile verdikleri pembe renk 570 nm'de absorbsiyon gösterir. |
| Biuret | Bakır ayıracının proteinlerle verdiği menekşe renkli bileşik 550 nm'de absorbans gösterir. |

| Yöntem | Etki tarzı |
| --- | --- |
| Bradford | Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması esasına dayanır. Maksimum absorbans 595 nm. |
| Lowry | Bakır/fosfomolibdik/fosfotungstik asid ayıracı proteinle etkileşerek 750 nm'de absorbans gösteren bir bileşik verir. |
| Gümüşle boyama | Gümüş iyonlarının proteinlere bağlanması esasına dayanır. |

# Geleneksel olarak hayvansal kaynaklardan elde edilen ve tedavide kullanılan bazı proteinler.

| Protein | Kaynak | Kullanılışı |
|---|---|---|
| **İnsulin** | Domuz/sığır pankreası | Tip 1 diabet tedavisi |
| **Glukagon** | Domuz/sığır pankreası | İnsulinin oluşturduğu hipogliseminin giderilmesi |
| **FSH** | Domuz hipofizi veya menopoz sonrasındaki kadın idrarı | Hayvanlarda süperovülasyon oluşturulması |

| Protein | Kaynak | Kullanılışı |
| --- | --- | --- |
| **İnsan korionik gonadotropin (hcG)** | Gebe kadın idrarı | İnfertilite tedavisi |
| **Eritropoietin** | İdrar | Anemi tedavisi |
| **Kan pıhtılaşması faktörleri** | İnsan plazması | Hemofili tedavisi |


Fermentasyon
hücre içi eksprese edilen protein
hücre dışı eksprese edilen protein
Hücrelerin toplanması (santrifüj veya süzme ile)
Hücrelerin uzaklaştırılması (santrifüj veya süzme ile)
Hücrelerin parçalanması (homojenizasyon)
Hücre parçalarının ayrılması (santrifüj veya süzme ile)
Birinci saflaştırma / konsantrasyon (ultrafiltrasyon / iyon değiştirme veya çöktürme)
Ürünü içeren hücre-dışı sıvının konsantrasyonu (ultrafiltrasyon veya çöktürme)
Kromatografik saflaştırma (Genellikle 2-4 kromatografi)
Etkinliğin saptanması ve eksipiyan ilavesi
Steril filtrasyon ve aseptik doldurma
Liyofilizasyon
Toz preparat
Sıvı preparat
Kapatma, etiketleme, paketleme

# Fermentasyon

hücre içi ekspresse edilen protein

hücre dışı ekspresse edilen protein

Hücrelerin toplanması (santrifüj veya süzme ile)

Hücrelerin uzaklaştırılması (santrifüj veya süzme ile)

Hücrelerin parçalanması
(homojenizasyon)

↓

Hücre parçalarının ayrılması
(santrifüj veya süzme ile)

↓

Birinci saflaştırma / konsantrasyon
(ultrafiltrasyon / iyon değiştirme veya
çöktürme)

Ürünü içeren hücre-dışı sıvının
konsantrasyonu (ultrafiltrasyon veya
çöktürme)

Kromatografik saflaştırma
(Genellikle 2-4 kromatografi)

# Bakteri hücrelerinin parçalanmasında kullanılan tekniklerden bazıları.

**Kimyasal muamele:**

- Deterjanlar
- Antibiyotikler
- Organik çözücüler (örn: aseton, toluen)
- Denatüre edici ajanlar (örn: üre, guanidin)

**Alkali ile muamele**

**Sonikasyon**

**Homojenizasyon**

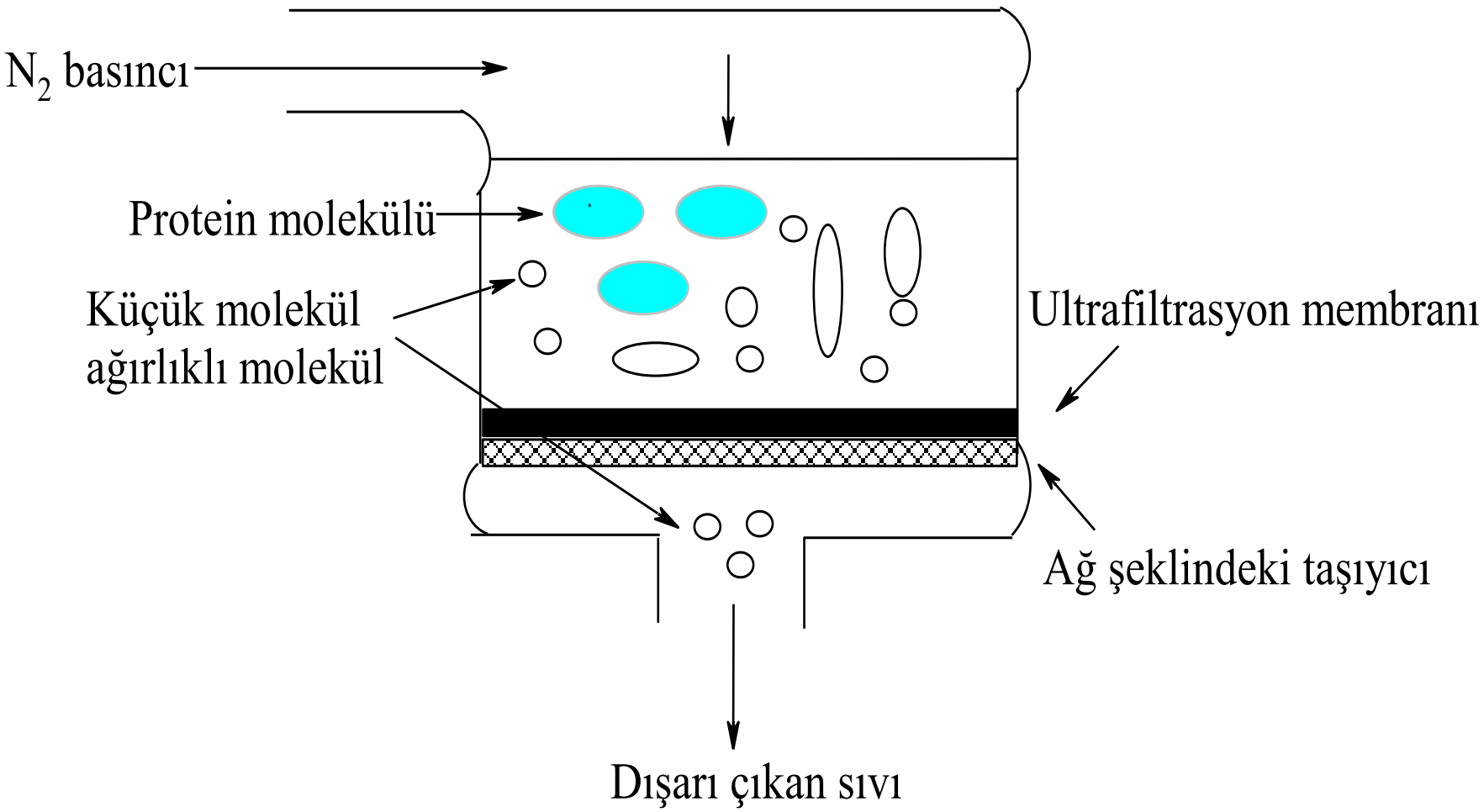
**Abraziflerle çalkalama** (cam bilyeler)

**Lizozim ile muamele**

# Nukleik asidlerin uzaklaştırılması

- **Çöktürme:** Bu amaçla en çok kullanılan madde, uzun zincirli katyonik bir polimer olan **polietilenimin**'dir. Ancak bu maddenin reaksiyona girmeyen monomerinin çok az da olsa saflaştırma ortamında kalması, kanserojen etki yaratabileceğinden kullanımında çekince doğmuştur.
- **Nukleazlarla muamele:** son zamanlarda etkin, ucuz olması dolayısıyla tercih edilen yöntemdir. Nukleazların kendileri de insan organizması için zararsız maddelerdir.

# Ultrafiltrasyon



# Ultrafiltrasyon membranları

- Selüloz asetat
- Selüloz nitrat
- Polivinil klorür
- Polivinil karbonat

# Kromatografi ile İleri Saflaştırma

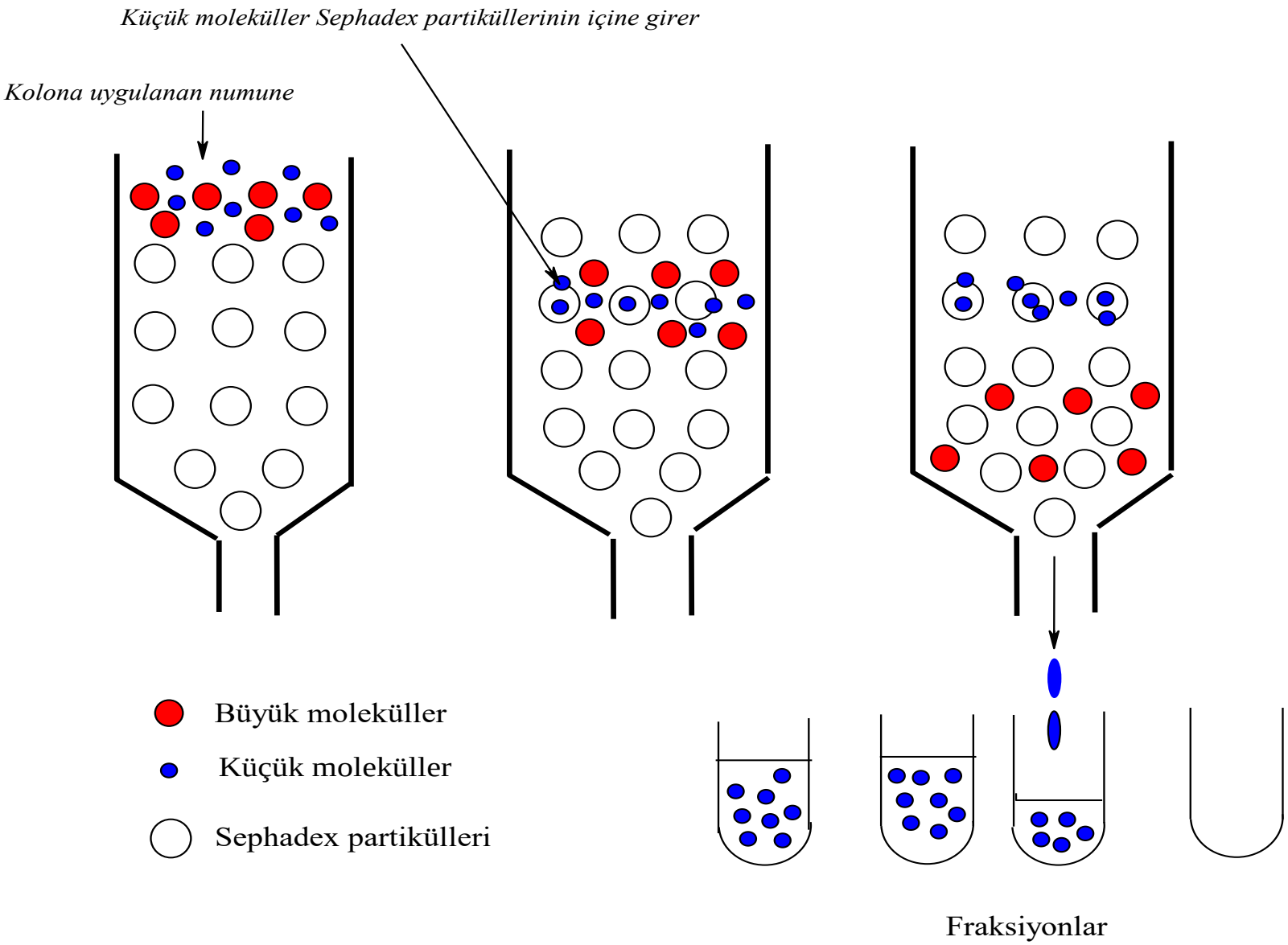
Sütun kromatografisinin prensibi, proteinleri iki faz arasında ayrıştırarak birbirlerinden ayrılmalarını sağlamaktır. Bu iki faz:

- 1-Katı (stasyoner) faz: genellikle sütun dolgu maddesi (matriks)
- 2- Sıvı (mobil): genellikle sütundan geçirilen bir tampon çözelti (elüsyon çözeltisi, elüant).

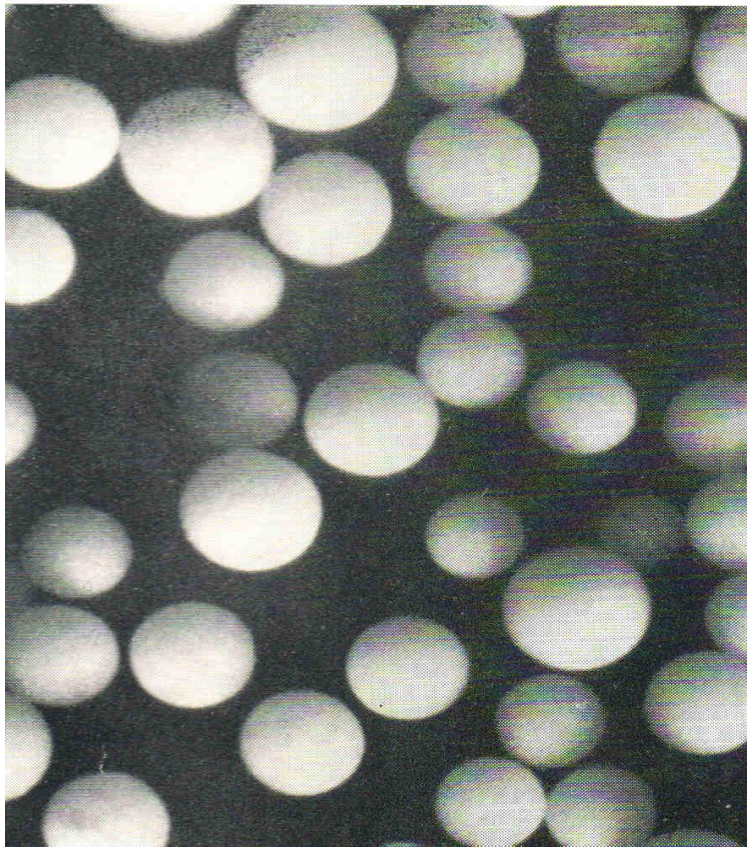
# Protein saflaştırılmasında en çok kullanılan kromatografik yöntemler

| **Teknik** | **Ayırma prensibi** |
|---|---|
| Jel-filtrasyon kromatografisi | Proteinlerin büyüklüklerine, molekül ağırlıklarına göre |
| İyon değiştirme kromatografisi | Proteinlerin yüzeylerindeki yüklerdeki farklara göre |
| Afinite kromatografisi | Proteinin belirli bir liganda olan ilgisine göre |
| Kromatofokusing | Proteinlerin izoelektrik noktalarındaki farklılıklara göre |
| Hidroksilapatit kromatografisi | Proteinler ile kalsiyum fosfat dolgu maddesi arasındaki kompleks etkileşimlere göre |

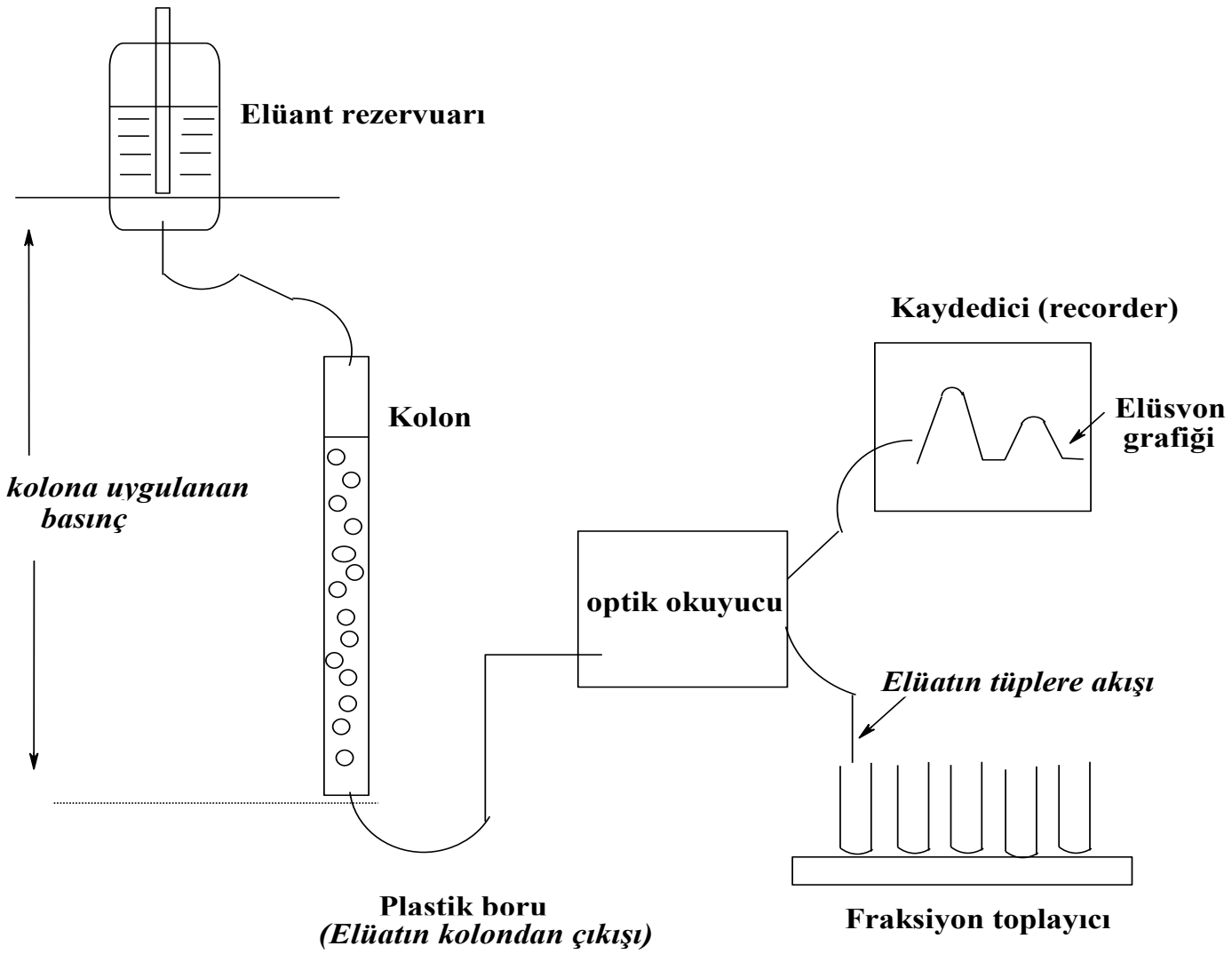
# Jel filtrasyon (Jel kromatografisi)



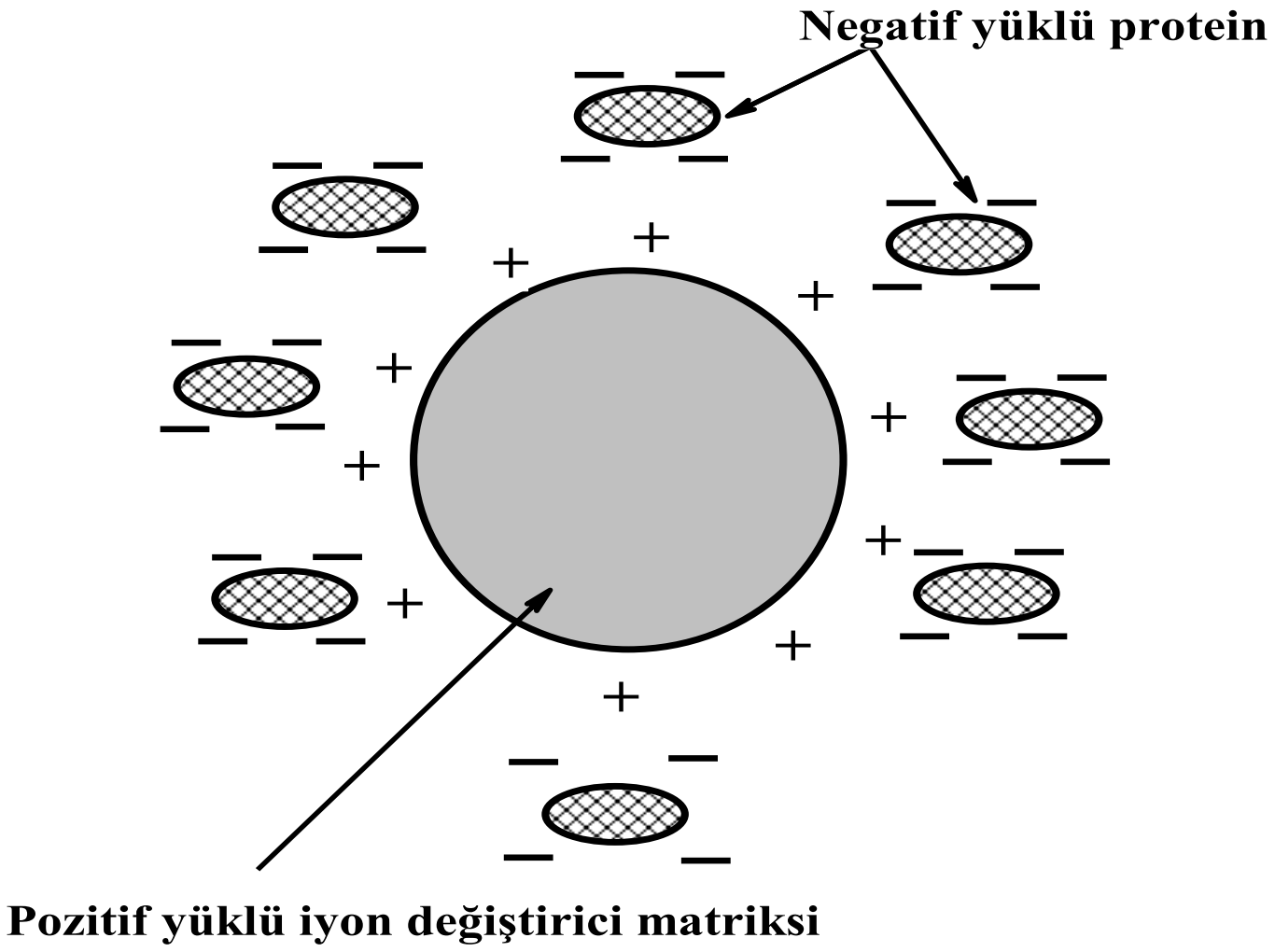
# Polimerize olmuş Sephadex partikülleri



# Jel filtrasyon



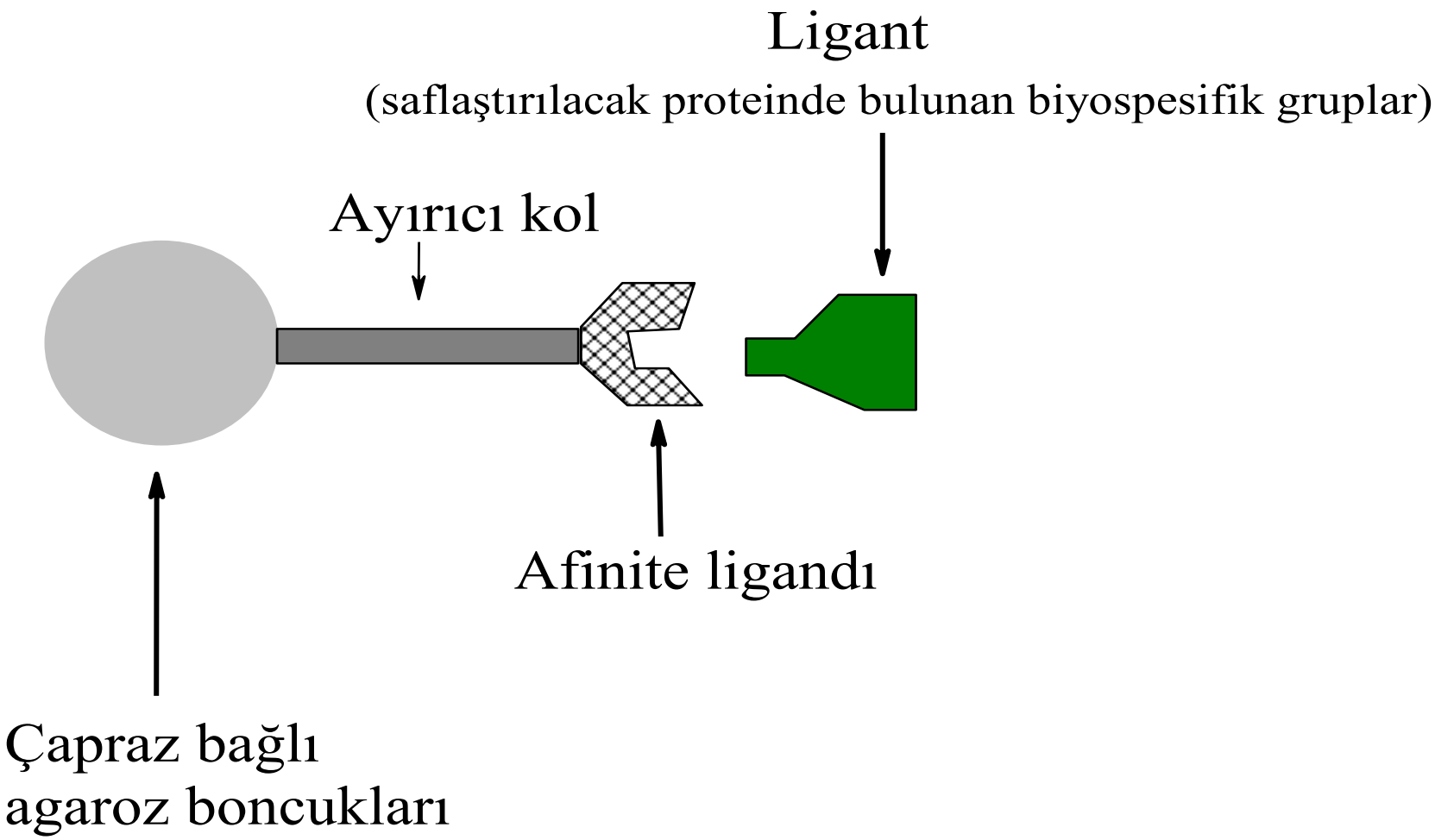
# İyon değiştirme kromatografisi



**İyon değiştirme kromatografisinde en çok kullanılan iyon değiştiriciler.**

| **Grup adı** | **İyon değiştirme şekli** |
|---|---|
| Dietilaminoetil (**DEAE**) | Anyon |
| Kuaterner amonyum (**Q**) | Anyon |
| Kuaterner aminoetil (**QAE**) | Anyon |
| Karboksimetil (**CM**) | Katyon |
| Metil sülfonat (**S**) | Katyon |
| Sülfopropil (**SP**) | Katyon |

# Afinite kromatografisi



# Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligantlar

| Saflaştırılacak madde | Ligant |
|---|---|
| Enzim | Substrat, substrat analogu, kofaktör, inhibitör |
| Antikor | Antijen, virüs, hücre |
| Lektin | Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzeyi reseptörü |
| Nukleik asit | Komplemanter baz sekansı, histon, polimeraz |
| Hormon, vitamin | Reseptör, taşıyıcı protein |
| Hücre | Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin |

# Hidroksilapatit kromatografisi

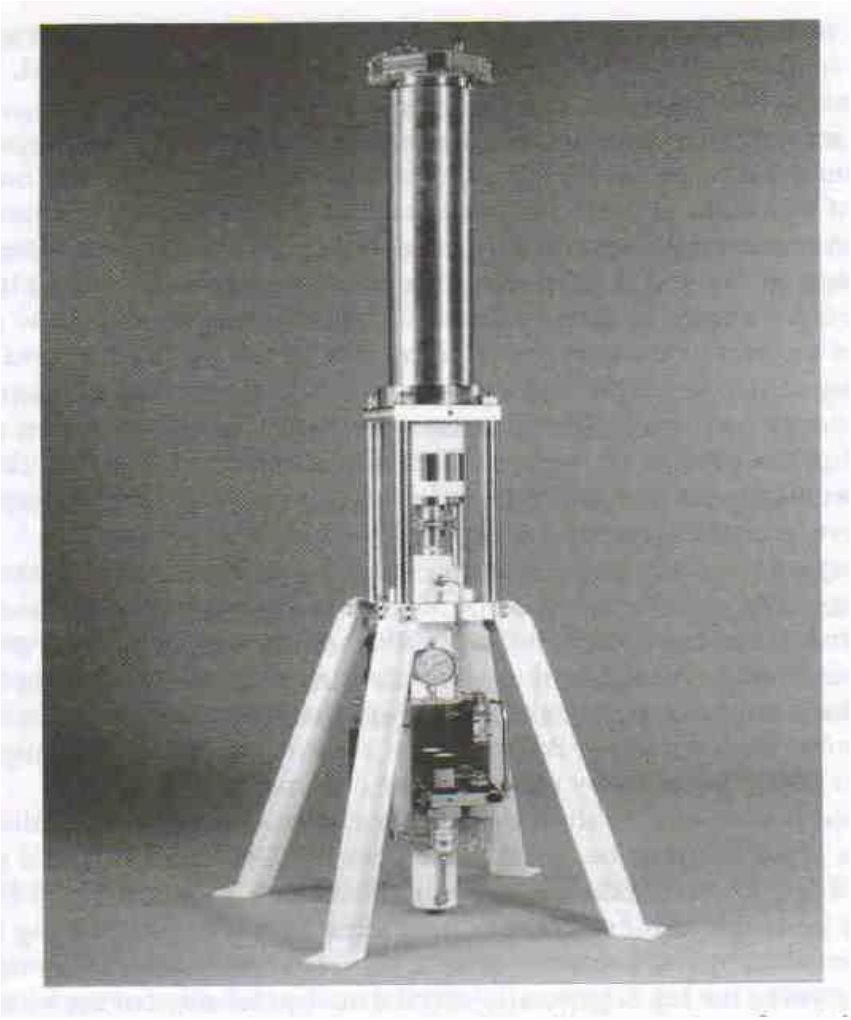
- Hidroksilapatit doğada ***fosfat kayalarında*** bulunan bir mineraldir, ayrıca ***kemiklerin mineral yapısını*** da oluşturur. Laboratuarda hidroksilapatit hazırlamak için önce, eşit miktar ve molaritede disodyum fosfat ($Na_2HPO_4$) ve kalsiyum klorür ($CaCl_2$) çözeltileri karıştırılır. İnaktif kalsiyum fosfat ($Ca_2HPO_4$. $2H_2O$)'tan ibaret ve bruşit (bruchite) olarak adlandırılan beyaz bir çökelti oluşur. Daha sonra bunun sıcakta NaOH ile muamele edilmesiyle ***aktif hidroksilapatit*** **[$Ca_5(PO_4)3OH$]** elde edilir (Tiselius ve ark. 1956) (Resim 6).
- Hidroksilapatit ***iyon değiştirici özellikler*** gösterir. Bununla birlikte, diğer iyon değiştiricilerin genel kurallarına her zaman uymaz. Protein adsorpsiyonunun, hidroksilapatit matriksteki hem kalsiyum hem de fosfatla etkileşimden oluştuğu düşünülmektedir.
- Protein kolondan genellikle potasyum fosfat gradienti ile elüe edilir.

# Laboratuar ölçeğinde hidroksilapatit hazırlama düzeneği

# Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

- Yüksek basınçta sabit elüsyon hızları sağlayan pompalar ve
- Yüksek basınçlara dayanıklı kolonlar gereklidir.
- Mikropartiküllü bir stasyoner faz (matriks) içeren çapları çok dar kolonlar kullanılır. (analitik amaçlar için kullanılırsa kolon çapları, 4-4.6 mm, yükseklikleri 10-30 cm, endüstride preparatif amaçlarla kullanılırsa çapları 80 cm ve yükseklikleri 1m kadardır).
- Küçük moleküllü proteinler (insulin, büyüme hormonu ve bazı sitokinler) HPLC ile biyolojik aktivite kaybına uğramadan ayrılabilirler.
- Endüstriyel ölçekte HPLC insulin ve IL2'nin saflaştırılmasında kullanılmaktadır.
- Bu şekilde diğer yöntemlerle saatler süren kromatografi süreleri dakikalara inmektedir. Dezavantajı ise pahalı olması ve kapasitenin düşük olmasıdır.

# Preparatif HPLC sütunu



Etkinliğin saptanması ve eksipiyan ilavesi

Steril filtrasyon ve aseptik doldurma

Liyofilizasyon

Sıvı preparat

Toz preparat

Kapatma, etiketleme, paketleme

# SON ÜRÜNÜN FORMÜLASYONU

- Ürünü stabilize eden çeşitli eksipiyanlar ilave edilir
- Ürün 0.22 μm'den filtre edilerek sterilize edilir ve aseptik koşullarda doldurulur.
- Ürün piyasaya toz şeklinde çıkacaksa liyofilize edilir.

# Liyofilizasyon



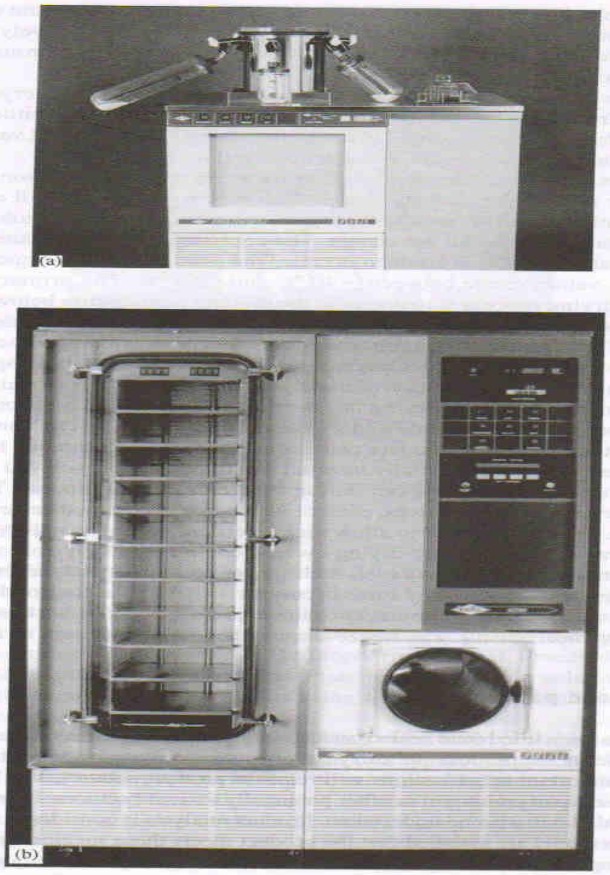



**Figure 6.25** Photographic representation of (a) laboratory-scale, (b) pilot-scale and (c) industrial-scale freeze-driers. Refer to text for details. Photograph courtesy of Virtis, USA