



İLERİ ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

56901007

2020-21 BAHAR

DR. GÜNSELİ ÇUBUKÇUOĞLU DENİZ

PROTEİN ANALİZ YÖNTEMLERİ-2

HAFTA 9

İYON DEĞİŞİM KROMATOĞRAFİSİ

- Proteinlerin, peptidlerin ayrılması ve pürifikasyonunda kullanılan yöntemlerden biridir.
- Yüklü ve iyonize olabilen moleküllerin ayrılıp saflaştırılmasında kullanılan önemli bir analitik yöntemdir. Polar analitler, elüent içindeki iyonlar ve kromatografik destek matriksine fikse olmuş iyonlar arasındaki iyonik veya elektrostatik interaksyonlar temel alınır.
- Biyomoleküller, yüklü kromatografi matriksine farklı derecelerde interaksyon gösterir.

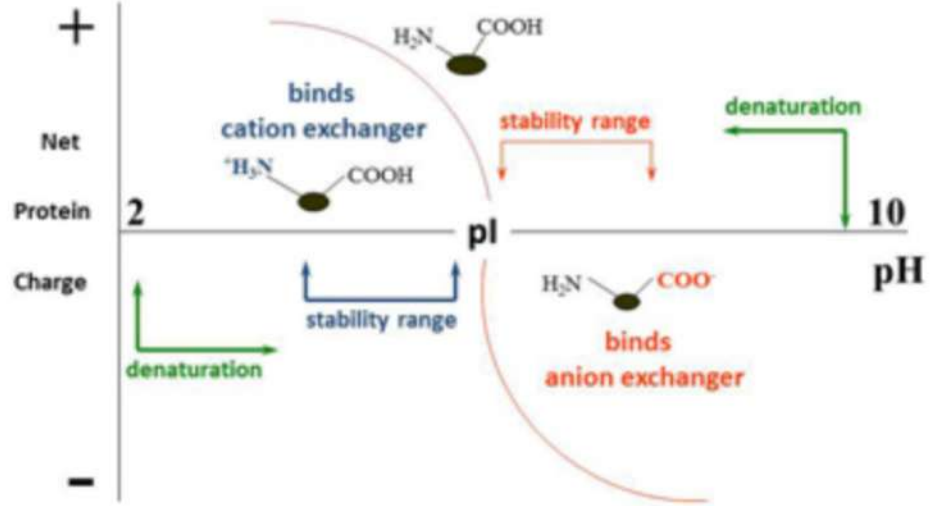
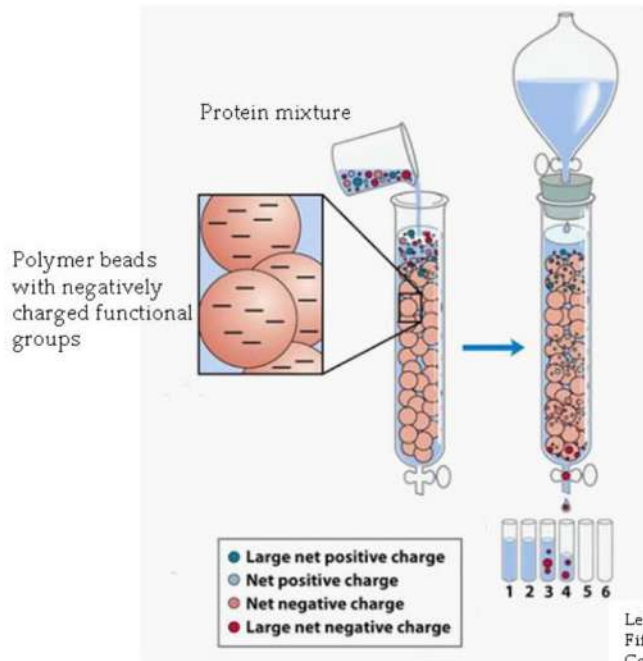


Fig. 1. Protein charge vs. pH. Protein stability and ion exchange media binding vary with total protein charge, which depends on pH.

Proteinlerin izoelektrik noktaları primer sekansa göre hesaplanabilir. İlgilendiğimiz proteinin pI'ndan yüksek pH değerine sahip bir tampon içerisinde protein, net negatif yüklü olacaktır. Bu durumda pozitif yüklü anyon değişim matriksi ile yakalanabilir.

- Proteinler tersinir iyonik etkileşimle iyon değiştirici matrikslere bağlanır.
- Tampon çözeltilinin iyonik gücü artırılarak ya da pH, bağlanan proteinin total yükü 0 olacak şekilde değiştirilerek nötralize edilir.
- Nötralize olan protein, iyonik etkileşim bitince karışımdan elüe edilir.
- Her proteinin total yüküne bağlı olan izoelektrik noktası, kolondan saf olarak ayrılması için gereken özelliğini de sağlar.
- Proteinlerin ayrıştırılmasında çoğunlukla selüloz iyon değiştirici kullanılır.



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

Sabit faz; kovalent bağlı (+) veya (-) yüklü
fonksiyonel grupları taşır
Mobil faz; matriksin tersi yük taşıyan
tamponlanmış sulu çözeltilerdir.

Metrosep A Supp 16 - 100/4.0

ik Karl
er
onu
len
ildi:
KF!



Sipariş numarası: 6.1031.410

The Metrosep A Supp 16 is a high capacity separation column based on a surface-functionalized polystyrene-divinylbenzene copolymer. The functional groups are bonded covalently. The morphology of the anion exchanger results in unique selectivity. In addition, this column type is noteworthy for its high mechanical and chemical resilience.

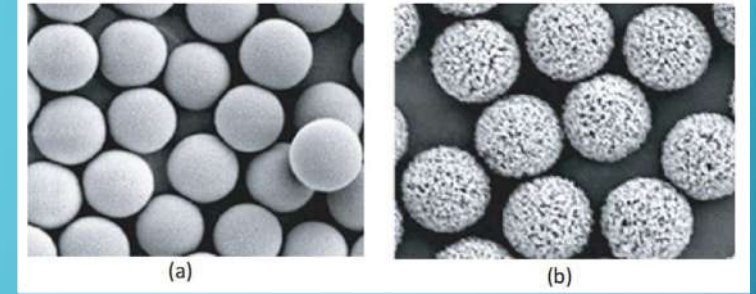
The column is well-suited to applications with a high ionic load but which require only relatively low resolution. Using the Metrosep A Supp 16 - 100/4.0 to determine bromate in water by means of the triiodide method (EPA 326, DIN EN ISO 11206) is another of its numerous applications.

> [Column Finder](#)

[Fiyat teklifi isteyin](#)

Carrier material	Polystyrene-divinylbenzene copolymer with quaternary ammonium groups
Column capacity	80 μmol (Cl^-)
Column dimensions	100 x 4.0 mm
Eluents	Carbonate hydroxide eluent (standard eluent) Sodium carbonate: 7.5 mmol/L; 1,590 mg/2 L Sodium hydroxide (c = 0.25 mol/L): 0.75 mmol/L; 6.0 mL/2 L (column temperature 45 °C)
	Sulfuric acid eluent Sulfuric acid (c = 1 mol/L): 100 mmol/L; 200 mL/2 L Ammonium heptamolybdate (c = 2 mmol/L): 19.3 $\mu\text{mol/L}$; 19.3 mL/2 L (column temperature 45 °C)
	PCR reagent Potassium iodide: 0.27 mol/L; 90 g/2 L

İYON DEĞİŞTİRİCİ MATRİKSLER



- İyon değiştirici yükü
- Lineer akış hızı
- rnek hacmi ve örnek fiziki, kimyasal zellikleri
- Negatif yüklüyse katyon değiştirici denir. Katyonlarla yerdeęiřtiren (-) yüklü fonksiyonel gruplar tařırlar.
- Fibröz ya da boncuklu yapıda olabilirler.
- Porozite açısından da mikroporz, makroporz ya da nonporz matrisler de mevcuttur. Nonporz matrisler yüksek rezolüsyonlu separasyonlarda tercih edilir (difüzyon etkisine dikkat). Mikroporlar bağlanma kapasitesini artırırken bant genişlemesine sebep olabilir.
- Hidrofilik/hidrofobik yüzey. Hidrofobik yüzeyli matrislerde proteinler güçlü bağlanma nedeniyle geridnřmsz hasara uęrayabilir.

Type of Ion Exchanger	Buffer	Buffering Range
Cation	Acetic acid	4.8–5.2
	Citric acid	4.2–5.2
	HEPES	6.8–8.2
	Lactic acid	3.6–4.3
	MES	5.5–6.7
	MOPS	6.5–7.9
	Phosphate	6.7–7.6
	PIPES	6.1–7.5
	TES	7.2–7.8
	Tricine	7.8–8.9
Anion	Bicine	7.6–9.0
	Bis-Tris	5.8–7.2
	Diethanolamine	8.4–8.8
	Diethylamine	9.5–11.5
	L-histidine	5.5–6.0
	Imidazole	6.6–7.1
	Pyridine	4.9–5.6
	Tricine	7.4–8.8
	Triethanolamine	7.3–8.3
	Tris	7.5–8.0

- Sellüloz: hidrofilik yüzey, kros-bağlanmayla artmış stabilite, ucuz
- Dextran: iyonik ortamı önemli miktarda genişletebilen kros-bağlanma materyali
- Agaroz: İyonik güç ve pH'tan bağımsız genişleme, fazla poröz polimerleşmeyle elde edilen yüksek bağlanma kapasitesi
- Poliakrilamid: Genişlemesi dextrana benzer
- Akrilat-kopolimer: yüksek pH stabilitesi
- Polistiren-divinilbenzen: Hidrofobik yüzey, proteinler için düşük bağlanma kapasitesi
- Silika: $\text{pH} > 8$ stabil değil

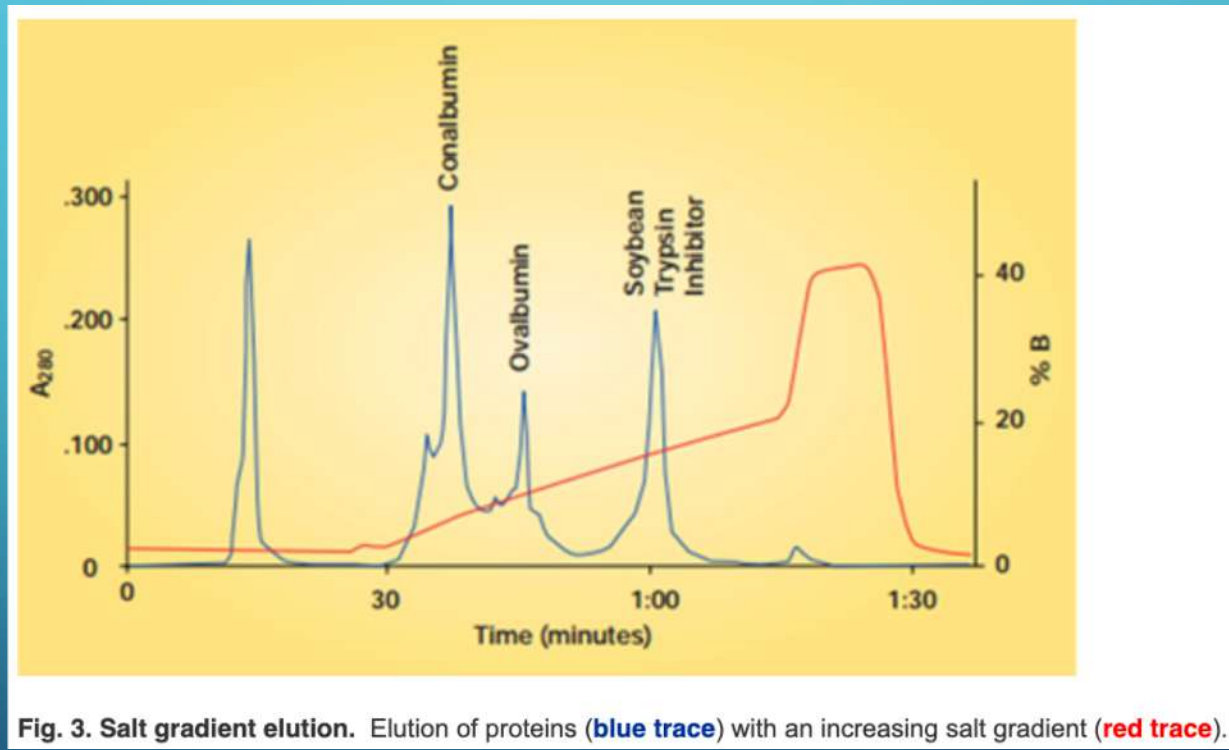
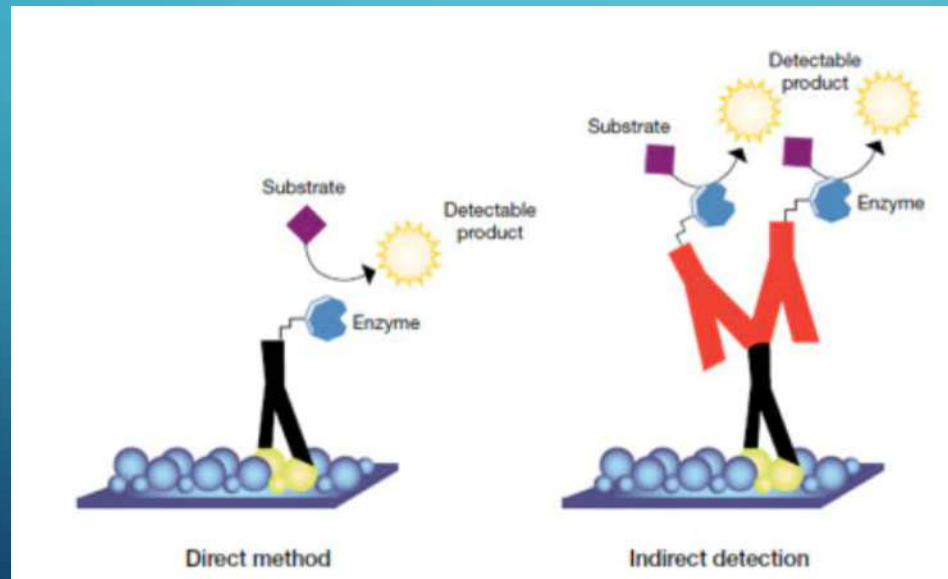
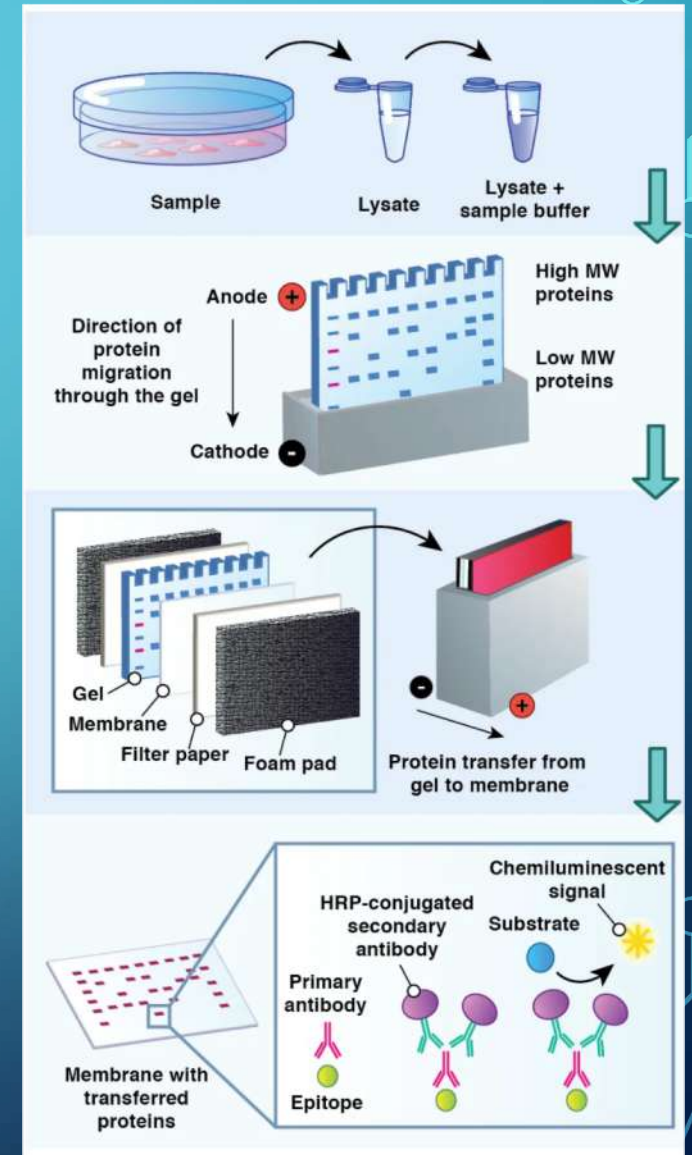
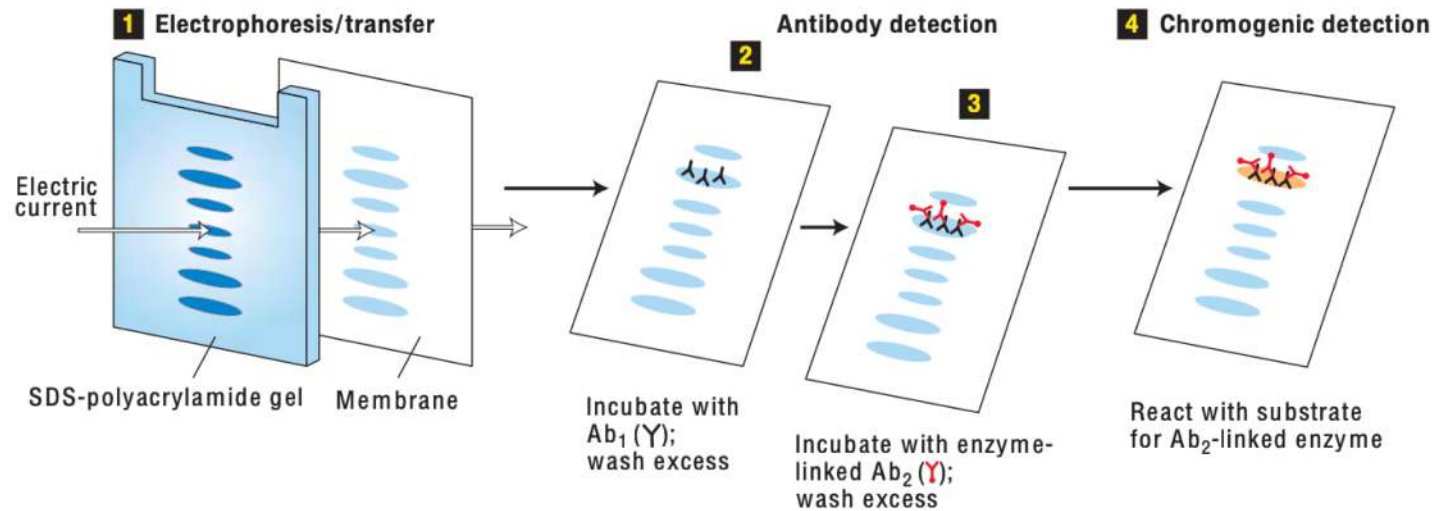


Fig. 3. Salt gradient elution. Elution of proteins (**blue trace**) with an increasing salt gradient (**red trace**).

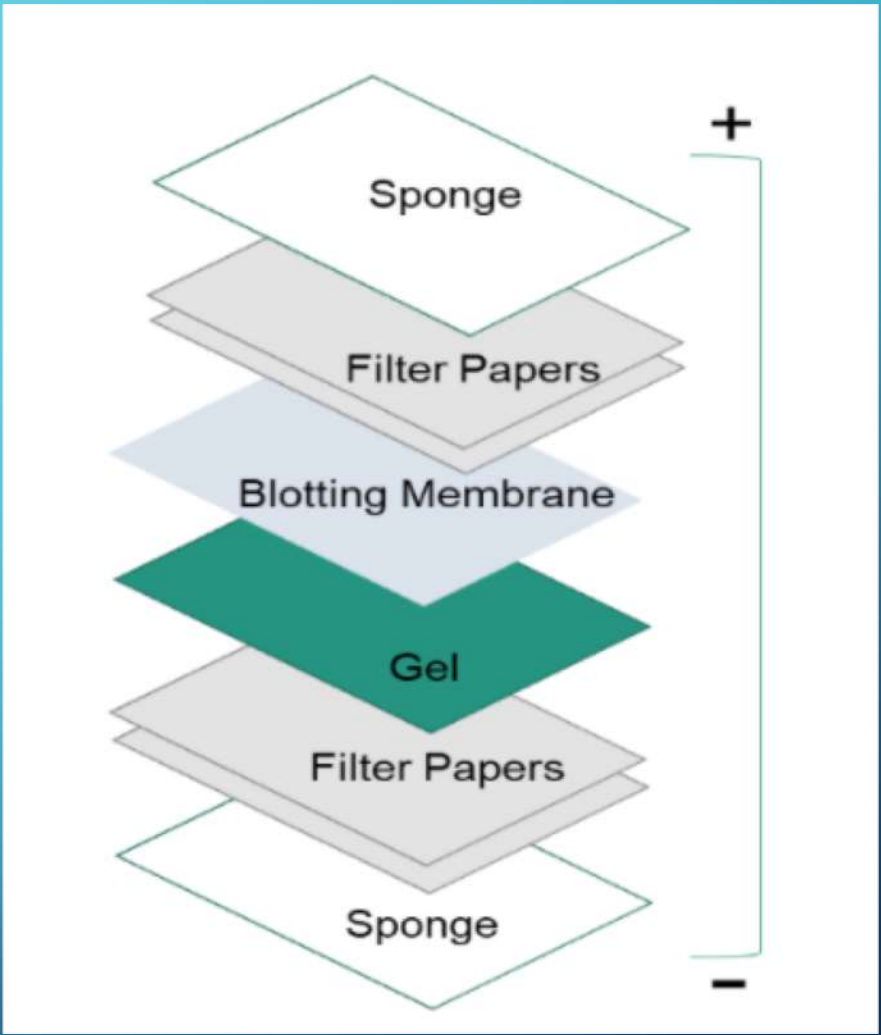
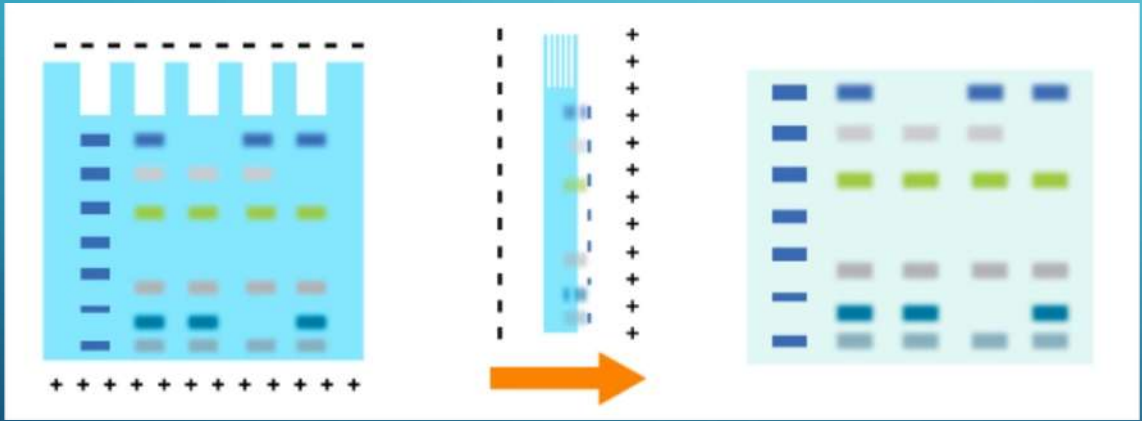
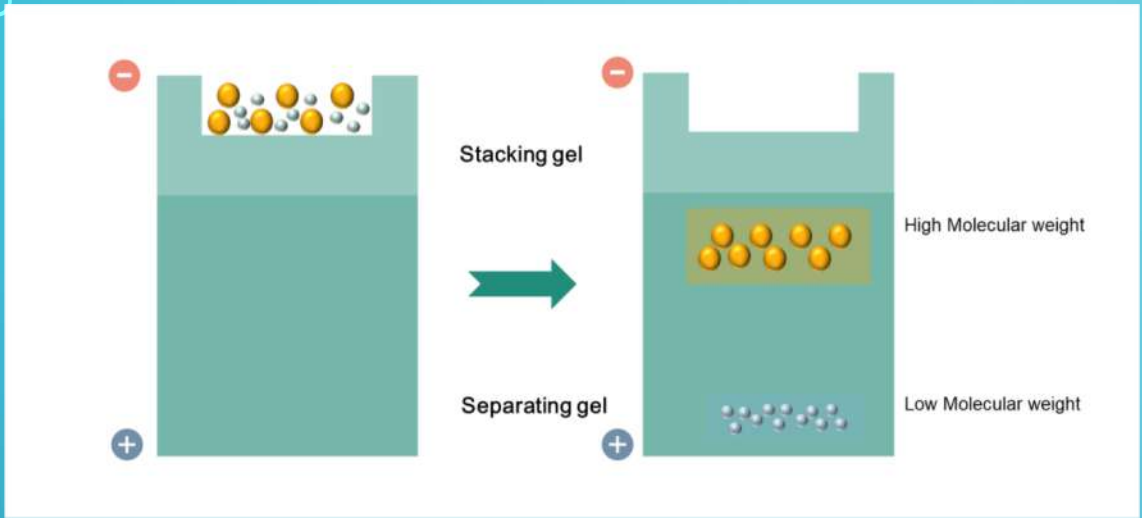
WESTERN BLOTLAMA/ PROTEİN İMMÜNObLOTLAMA

- Proteinlerin jel elektroforeziyle ayrılmaları sonrası ikinci bir matrikse aktarılarak immünolojik olarak ilgilenilen proteinin kalitatif ve semi-kantitatif tespit edilmesidir.



WESTERN BLOTLAMA BASAMAKLARI

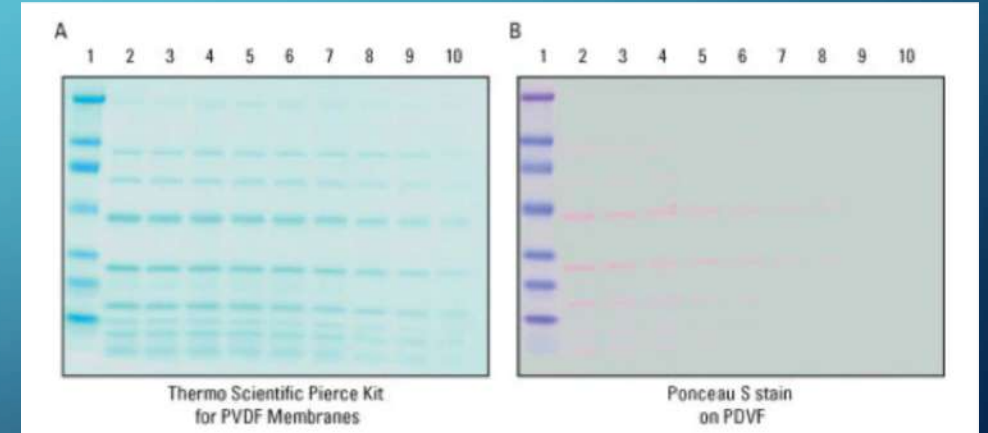
- Örnek hazırlama: hücre lizisi ve protein ekstraksiyonu
- SDS-PAGE Jel Elektroforezi
- Membran transferi
- Bloklama
- Antikor inkübasyonu
- Protein deteksiyonu ve görüntüleme



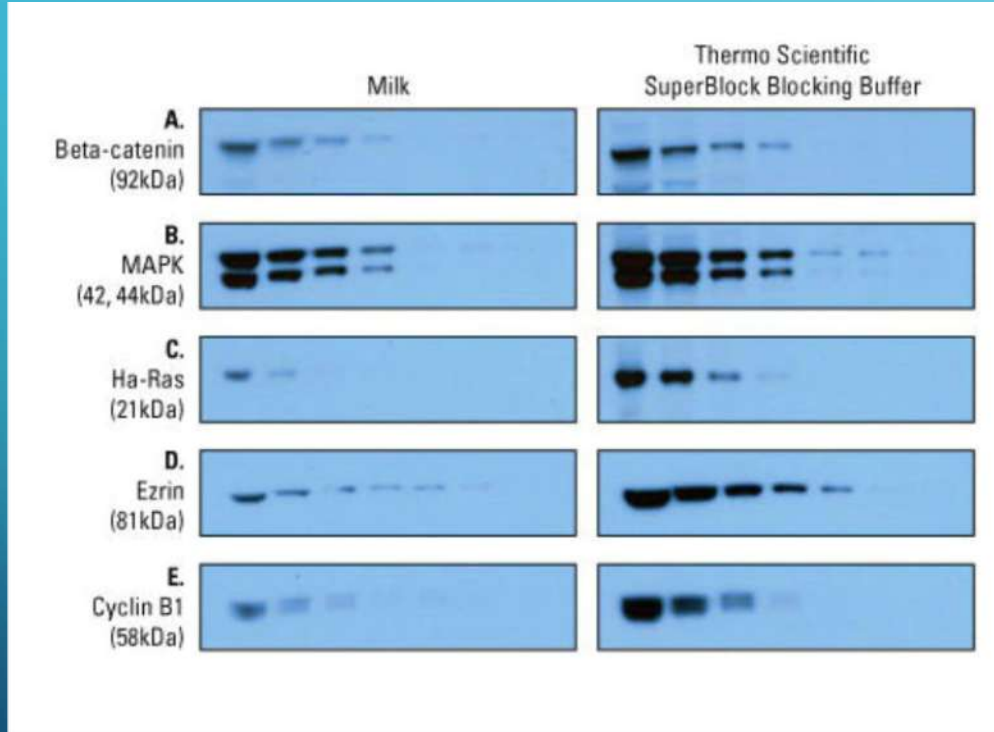
WESTERN BLOTLAMADA KULLANILAN MEMBRANLAR

Table 1: Nitrocellulose vs PVDF membrane attributes

Attributes/Applications	Nitrocellulose	PVDF
Physical strength	Poor	Good
Protein binding capacity	100 – 200 µg/cm ²	150 – 450 µg/cm ²
Solvent resistance	No	Yes
Western transfer	Yes	Yes
Wets out with water and aqueous transfer buffers	Yes	No*
Total protein stain	Colloidal gold	Colloidal gold
	Ponceau-S red	Ponceau-S red
	Amido black	Amido black
	India ink	India ink
	Sypro® blot stains	Sypro® blot stains
Detection	Chromogenic	Chromogenic
	Chemiluminescent	Chemiluminescent
	Fluorescent	Fluorescent
	Radioactive	Radioactive
Western reprobing	Yes	Yes
Blot can be archived	No	Yes



BLOKLAMA



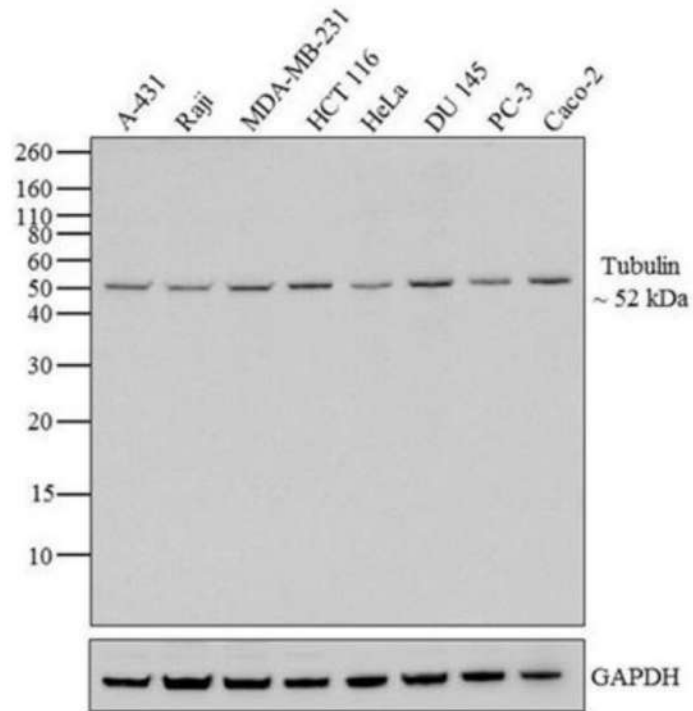
arkaplan gürültüsünü azaltmak için bloklama yapılır.

PROTEİNLERİN DETEKSİYONU

- Primer veya sekonder antikora konjuge edilebilen çeşitli etiketler mevcuttur. Deteksiyon yöntemi seçilen antikora göre değişebilir.
- Eskiden radyoizotoplar kullanılırdı. Pahalı, kısa raf ömrü, imhası!
- Enzimatik etiketler: HRP, AP çok yaygın. Kromojenik, florojenik ve kemilüminesant substratlar
- Kemilüminesant blotlama substratları, enzim-substrat reaksiyonu sırasında sinyal verir.
- Florofor-konjuge antikordarda substrat geliştirme basamağı yok ama fluresan sinyalin exitasyon ışık kaynağını detekt/dokümante edecek ayrı ekipman gerekir.



HKP REFERANS ALINIR



Western blot using alpha (α)-tubulin antibody. Lysates from 8 cell lines were analyzed using the Invitrogen XCell Surelock Electrophoresis System and iBlot Dry Blotting System. The blot was probed for alpha (α)-tubulin protein using [alpha \(\$\alpha\$ \)-tubulin mouse monoclonal primary antibody](#) (Cat. No. 236-10501) and [goat anti-mouse HRP conjugate secondary antibody](#) (Cat. No. 62-6520).

WESTERN BLOT ANALİZLERİ

semi-quantitative software as ImageJ (Java-based image-processing and analysis software)

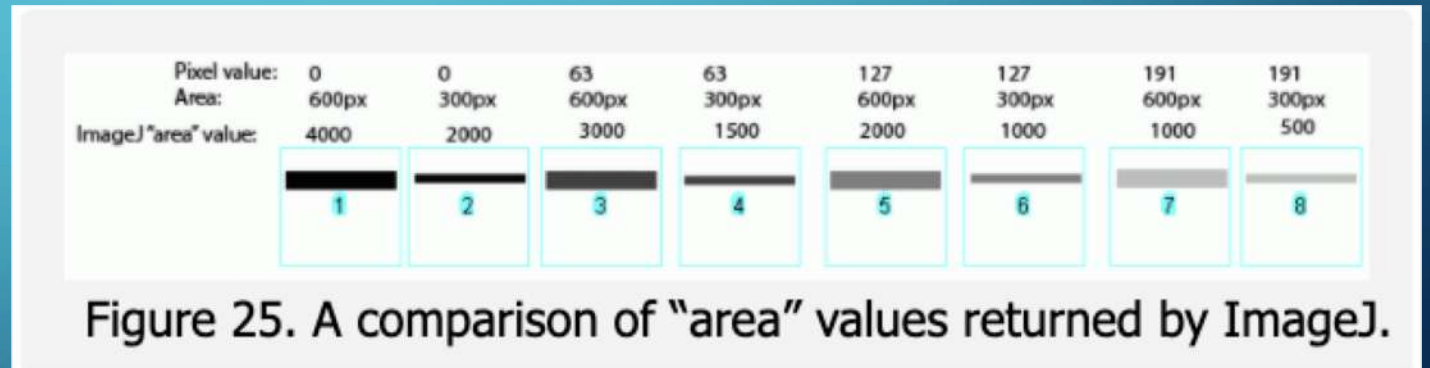
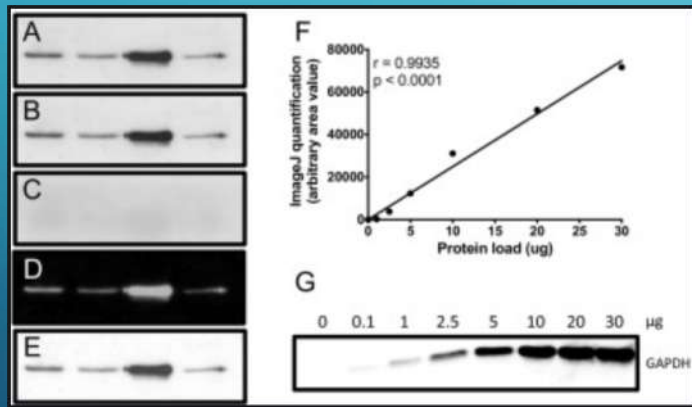


Figure 25. A comparison of "area" values returned by ImageJ.