

# KOLOKVIJ PRI PREDMETU STUKTURA PROTEINOV (PRIMARNA STRUKTURA)

Asistentki: Lidija Kovačič  
Zala Jenko

Datum: 25. 04. 2005

Ime in Priimek:

Vpisna številka:

Dobro si preberite vprašanja. Srečno!

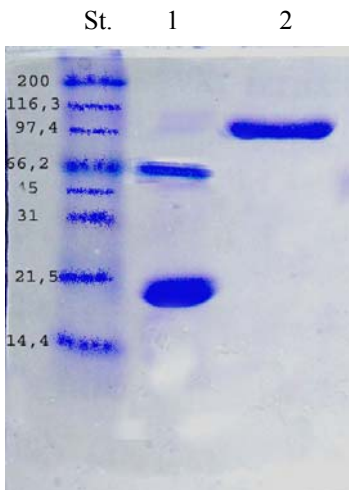
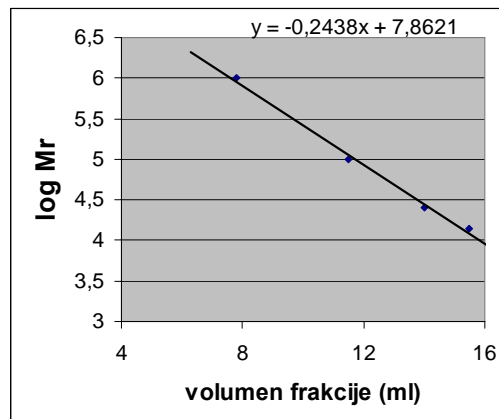
## 1. NALOGA (2T)

Na čem temelji ločevanje proteinov na koloni pri gelski kromatografiji? (0,5 T)

Dobili ste vzorec neznanega proteina, ki mu želite določiti osnovne parametre primarne strukture. Najprej ste določili navidezno relativno molekularno maso ( $M_r$ ) s pomočjo gelske kromatografije na gelu Sephacryl S-300. Lovili ste frakcije po 4 ml v prvo epruveto in v vsako naslednjo po 1,1 ml v za to primerno označene epruvete, katerim ste zmerili še absorbanco pri 280 nm. Za gel ste poleg dobili še umeritveno krivuljo (umerjeno s štirimi standardi).

Izračunajte navidezno relativno molekularno maso ( $M_r$ ) neznanega proteina! (0,5 T)

Zaporedna številka epruvete	$A_{280}$
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0,0065
6	0,0233
7	0,8564
8	0,0433
9	0
10	0



Na NaDS-PAGE (poliakrilamidna gelska elektroforeza) ste po barvanju gela dobili pod redukcijskimi in neredukcijskimi pogoji sledeči rezultat (glej sliko gela):

Iz koliko podenot je sestavljen protein in kako so med seboj povezane? (0,5T)

Primerjajte rezultata o  $M_r$  iz gelske kromatografije in NaDS-PAGE!

(0,5 T)

Legenda:

St.....masni standardi

1.....vzorec pod redukcijskimi pogoji

2..... vzorec pod neredukcijskimi pogoji

## 2. NALOGA (1T)

Kaj morate narediti pred določanjem primarne strukture sorazmerno velikega proteina, ki vsebuje cistine, torej preden določate sekvenco proteina? (0,5 T) Katero modifikacijo vnesete in kako tako modificiran protein potem očistite iz reakcijske mešanice? (0,5 T)

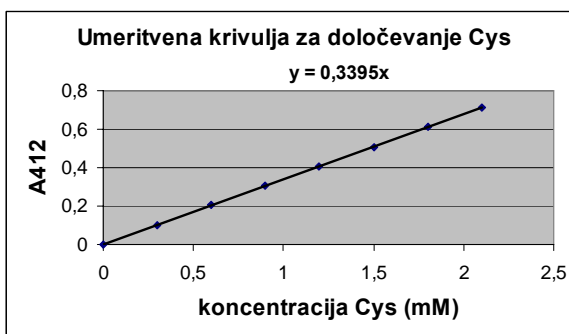
## 3. NALOGA (2 T)

Zakaj rabimo podatek o številu disulfidnih mostičkov oz. cistinov? (0,5 T)

Opišite princip določevanja vseh cisteinov ter disulfidno vezanih cisteinov s pomočjo Ellmanovega reagenta! (0,5 T)

Pripravite 150  $\mu$ l raztopine Cys iz 10 mM založne raztopine Cys. Izračunajte, kako bi pripravili standardne raztopine Cys! Dopolnite tabelo: (0,2 T)

konc. Cys (mM) v 150 $\mu$ l	V 10 mM Cys ( $\mu$ l)	V dH <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	A <sub>412</sub>
0			0
0,3			0,1016
0,6			0,2043
0,9			0,3054
1,2			0,407
1,5			0,5092
1,8			0,6111
2,1			0,713



Postopek dela za umeritveno krivuljo:

→ k 0,1 ml standarda s koncentracijo 0, 0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5, 1,8 in 2,1 mM ste dodali 2,3 ml 10 M urea v 0,5 M Tris/HCl in 0,1 ml Ellmanovega reagenta ter po 10 min izmerili absorbanco pri 412 nm.

$M_r$  (Cys)=121,1

S pomočjo umeritvene krivulje izračunajte število disulfidnih mostičev proteina z relativno molekularno maso ( $M_r$ ) 78 500! (0,8 T)

Postopek določevanja prostih Cys nativnega proteina:

→ k 0,6 ml proteina s koncentracijo 10 mg/ml ste dodali 2,3 ml 10 M urea v 0,5 M Tris/HCl in 0,1 ml Ellmanovega reagenta ter po 10 min izmerili absorbanco pri 412 nm.

**A<sub>412</sub>=0,7785**

Postopek določanja vseh Cys v reduciranem proteinu:

→ k 0,6 ml proteina s koncentracijo 0,5 mg/ml ste dodali 2,3 ml 10 M urea v 0,5 M Tris/HCl in 0,1 ml Ellmanovega reagenta ter po 10 min izmerili absorbanco pri 412 nm.

**A<sub>412</sub>=0,4022**

#### 4. NALOGA (1T)

Proučujemo protein z molekularno maso 7 kDa, za katerega vemo, da vsebuje 5 cisteinov. Kolikšno površino signala za slednjo aminokislino v vzorcu pričakujete na ak kromatogramu, če veste da smo v zmesi standardov za PTH-cistein dobili površino signala 150680, pri čemer smo kalibrirali s po 150 pmolov posameznih ak. Da vam bo lažje poznamo tudi  $\Sigma ni \times Mri$ , ki znaša 0,3  $\mu\text{g}$ .

#### 5. NALOGA

Neznani protein smo inkubirali z V-8 proteinazo iz *S. aureus* (reakcija je potekala pri pH 4.0) in dobili štiri peptide s sledečim ak zaporedjem: GHN, GTSE, AGCKTHD in RGMLIRSTYD. Isti protein smo inkubirali tudi s tripsinom. Prav tako je prišlo do popolne cepitve, dobili pa smo prav tako štiri peptide s sledečim ak zaporedjem: THDR, GMLIR, STYDGHN in GNTSNAGCK. (2T)

a) Zapiši zaporedje celotnega proteina.

b) Približno ocenite izoelektrično točko proteina.

c) Katere vam poznane cepitve bi pri tem proteinu še lahko uporabili in koliko peptidov bi pri tem dobili? Mesta cepitve označite na zaporedju proteina!

d) Kako bi peptide med seboj ločili? Naštejte različne metode!

#### 6. NALOGA

Neznani protein želiš razgraditi na manjše peptide, katerim boš lahko določil ak zaporedje ter tako identificiral protein s pomočjo baze podatkov o doslej znanih proteinih. Začrtaj si eksperiment: kako boš protein razgradil, ali boš protein prej denaturiral in zakaj, koliko vzorca boš naneseš na gel, s katerim reagentom boš gel barval, na katero membrano boš prenesel peptide z gela, kako bi ocenil uspešnost prenosa, ... (Kratko in jedrnato!) (2T)