

Strategije določanja poteka disulfidnih vezi v proteinih bogatih s cisteini.

Uroš Stupar, Nejc Perme



Težave

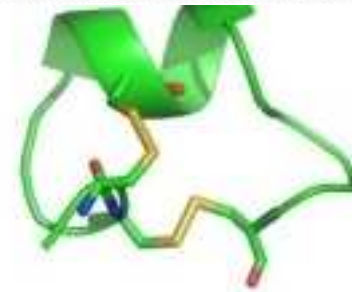
- Scrambling
- Opazovanje

Prednosti

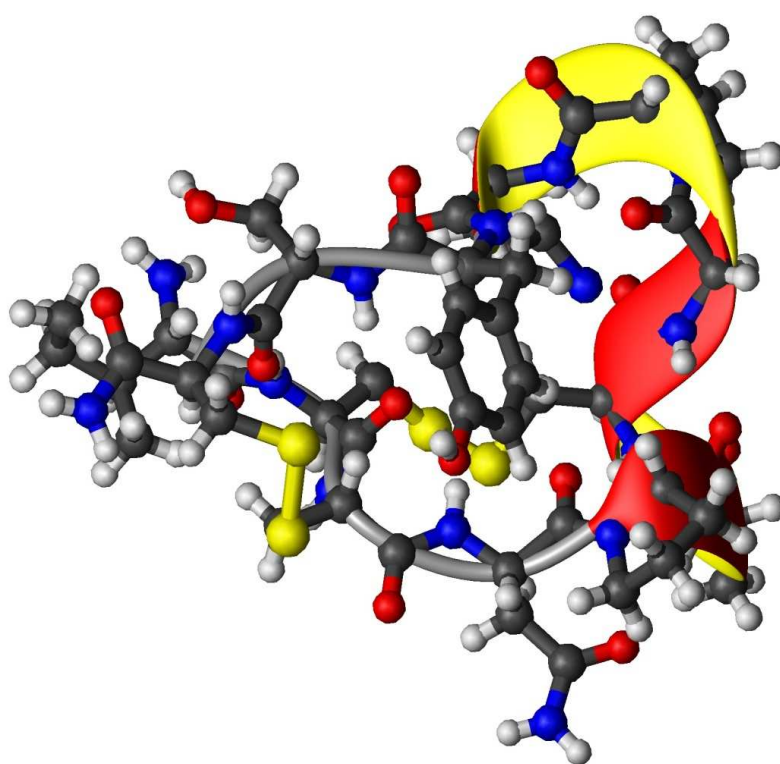
- Določanje disulfidnih povezav
- Opazovanje redukcijskih intermediatov

Alpha-conotoxini

- genus *Conus*
- kratki polipeptidi (10-40 ostankov)
- inhibirajo nikotinske receptorje
- Bogati z cisteini
- Vsebujejo disulfidne mostičke



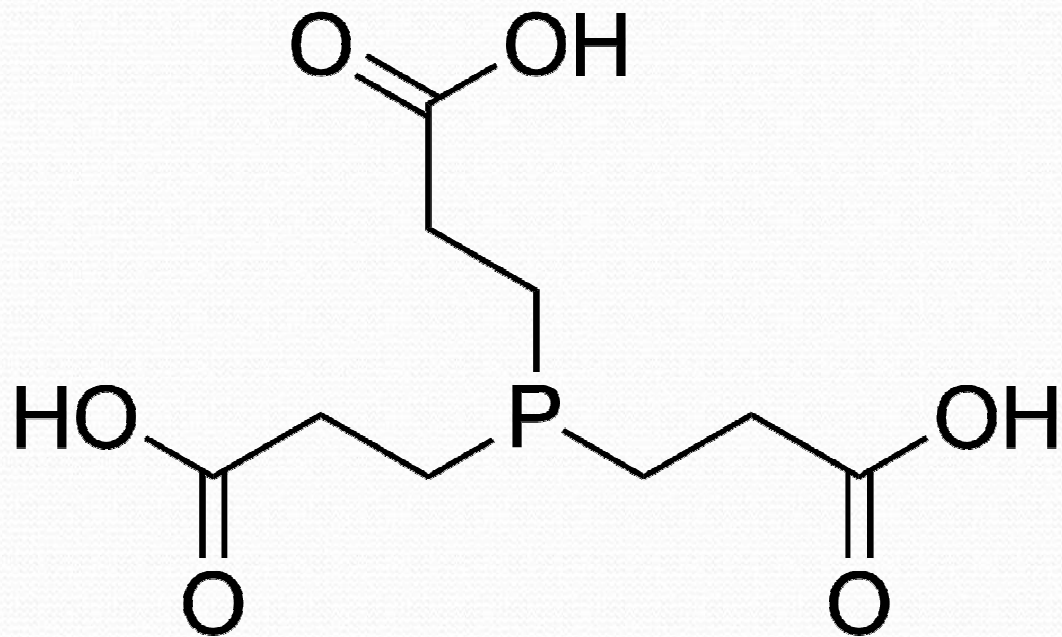
Conotoxin-TxIA



ANALIZA

- Delna redukcija s TCEP pri pH 3
- Analiza intermediatov z ESMS
- Alkilacija prostih tiolov
- Separacija produktov na HPLC
- Analiza alkiliranih intermediatov z MS
- Sekvenčna analiza

Redukcija s TCEP

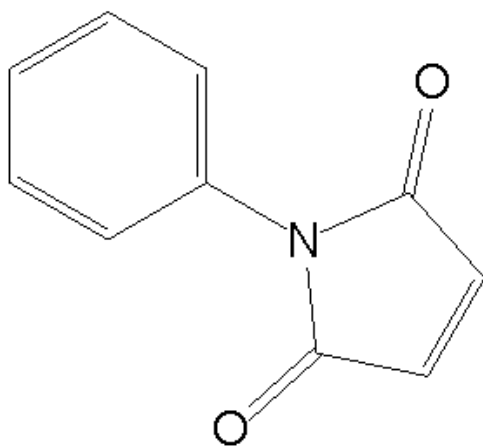


ESMS

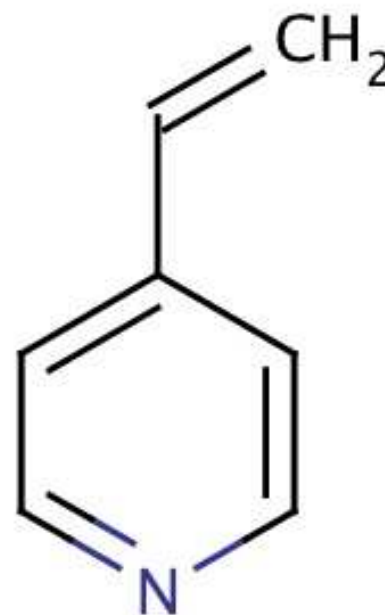
- Primerno za biološke molekule
- Mehka tehnika
- Opazovanje formacije intermediatov



Alkilacija

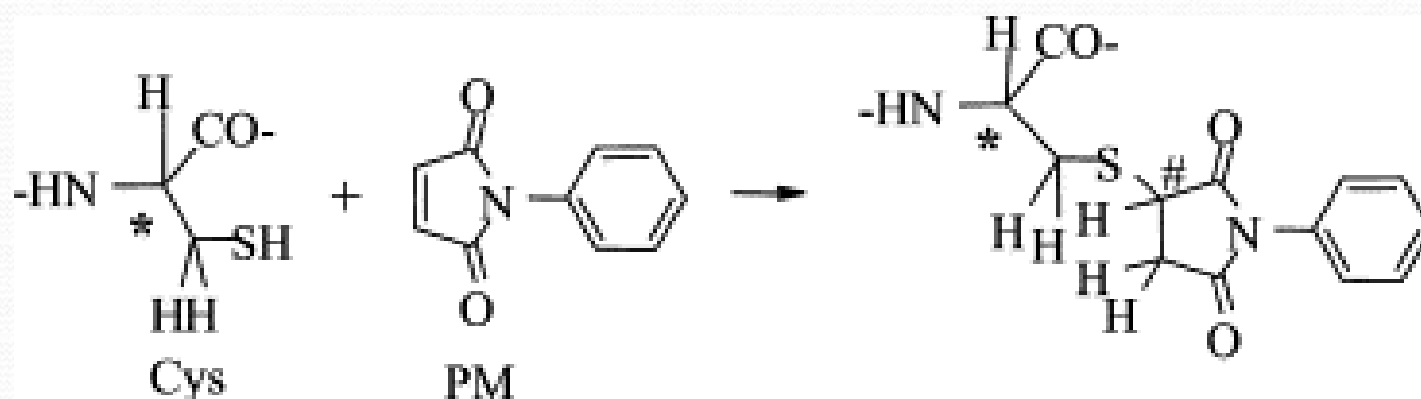


N-fenilmaleimid (PM)



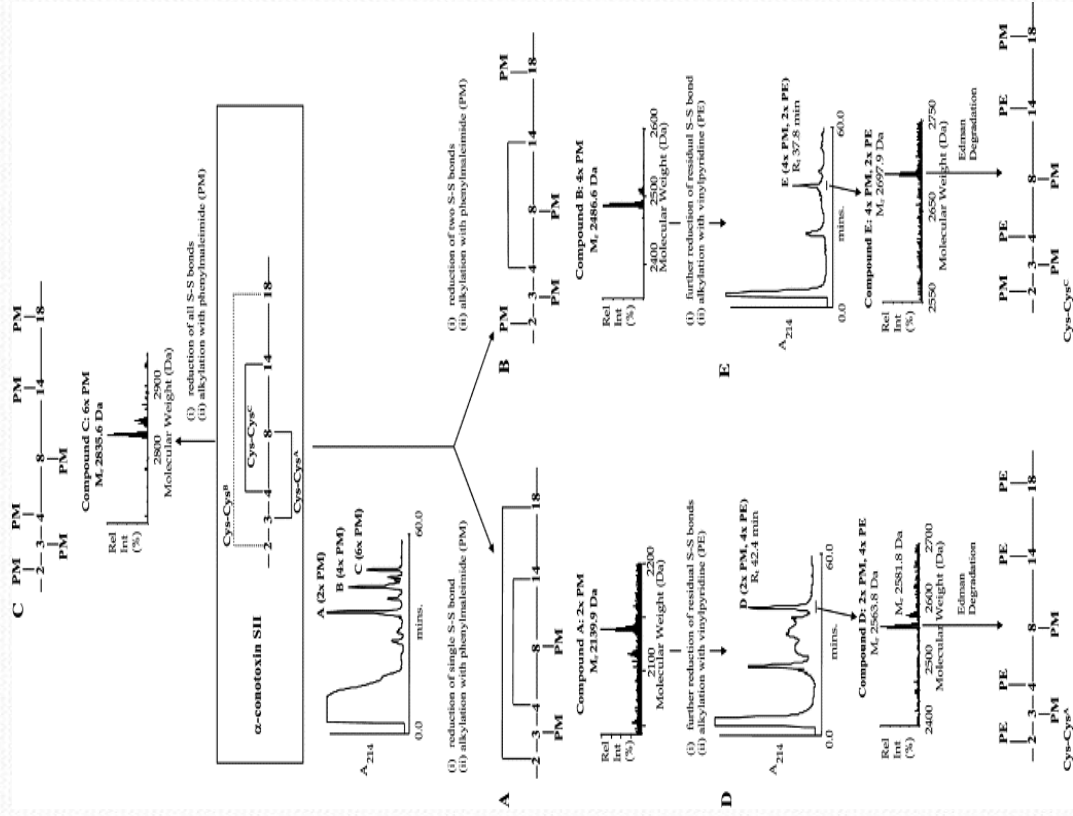
4-vinilpiridin (PE)

Alkilacija



* chiral centre in cysteine residue (retains its S-configuration)

new chiral centre generated in succinimide ring, can be R or S



Sekvenčna analiza

- Edmanova degradacija
- Razlika v vrhu med cisteini označenimi s PM in cisteini označenimi s PE