

Metodi di studio delle proteine :

- determinazione della quantità
- determinazione della **struttura primaria** (sequenza a.a.)
- determinazione della struttura 3D

Determinazione della sequenza aminoacilica di una proteina

1953: La prima determinazione completa
Insulina bovina F.Sanger 51 a.a.
100 g di proteina in 10 anni

Oggi: centinaia di migliaia di proteine note
Pochi giorni, pochi μg di proteina

Determinazione della sequenza aminoacilica di una proteina

1. Determinazione dei gruppi terminali
2. Determinazione di eventuali ponti disolfuro
3. Preparazione di una mappa triptica
4. Determinazione della composizione aa. dei peptidi
5. Determinazione della sequenza aa. dei peptidi
6. Ricostruzione della sequenza della proteina

1. Determinazione dei gruppi terminali

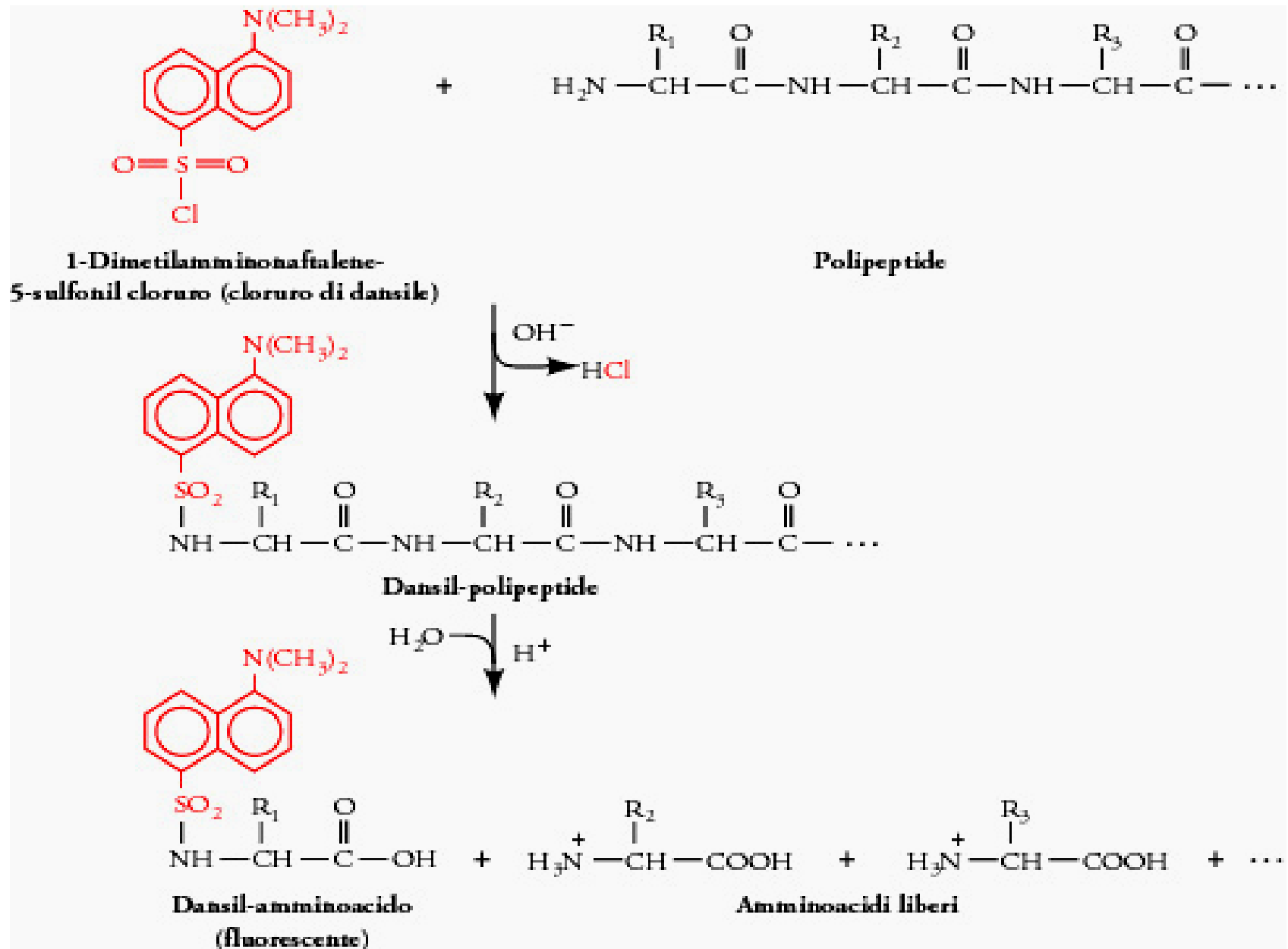
Serve a stabilire da quanti tipi di catene è formata la proteina.

Il residuo N-terminale (ammina primaria)

- viene fatto reagire con il CLORURO DI DANSILE per formare peptidi dansilati
- liberato mediante idrolisi acida
- separato con metodi cromatografici
- identificato per fluorescenza (giallo)

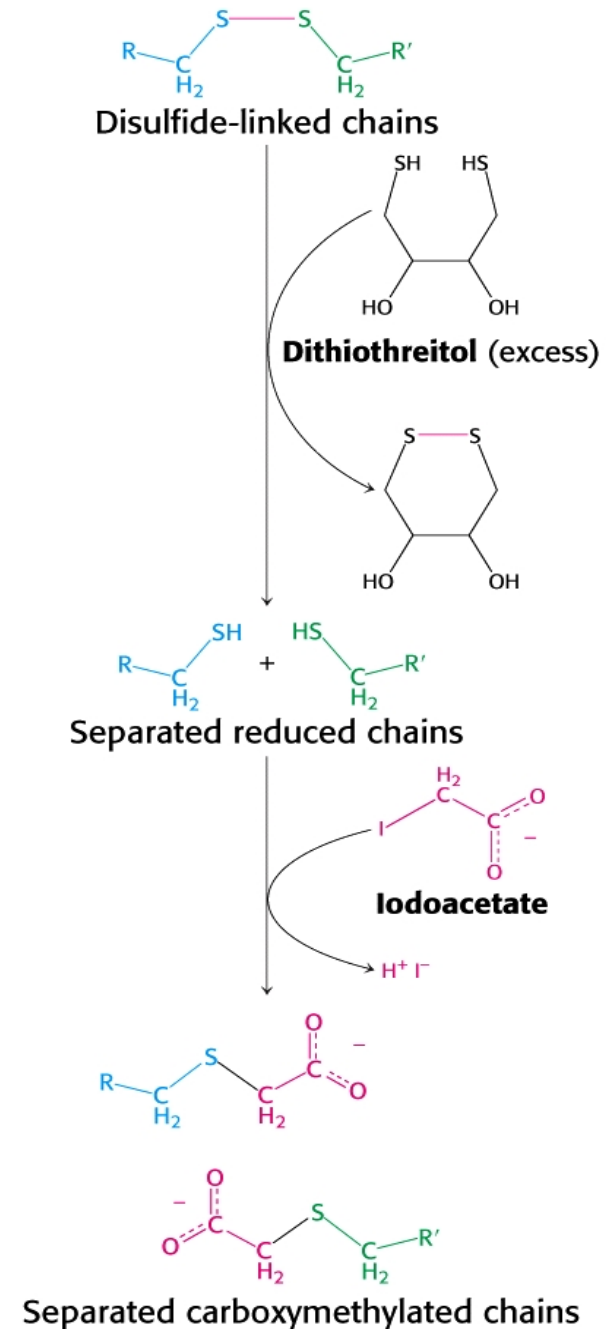
Il residuo C-terminale può essere identificato staccandolo con carbossipeptidasi specifiche per tipi di residui aa.

Determinazione del gruppo N-terminale



2. Determinazione di eventuali ponti disolfuro inter-catena

Si possono usare ossidanti
(ad es. acido performico)
o riducenti (ad es. mercaptani, DTT)



3. Determinazione della mappa triptica

Endopeptidasi :

Tripsina

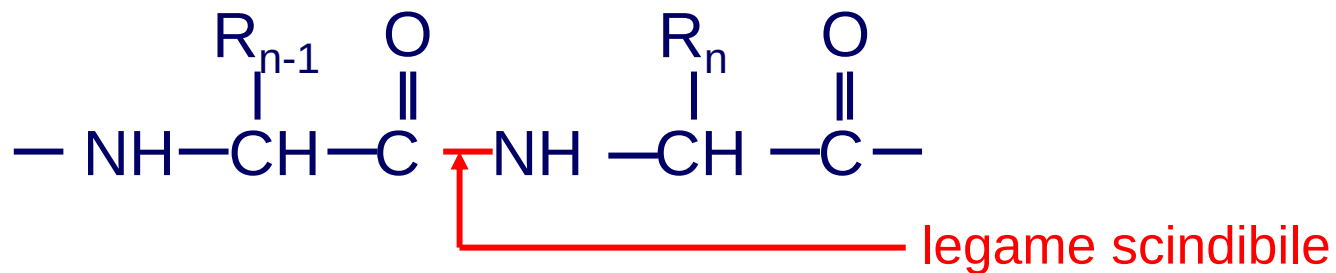
R_{n-1} = residuo positivo (Arg, Lys)
 $R_n \neq \text{Pro}$

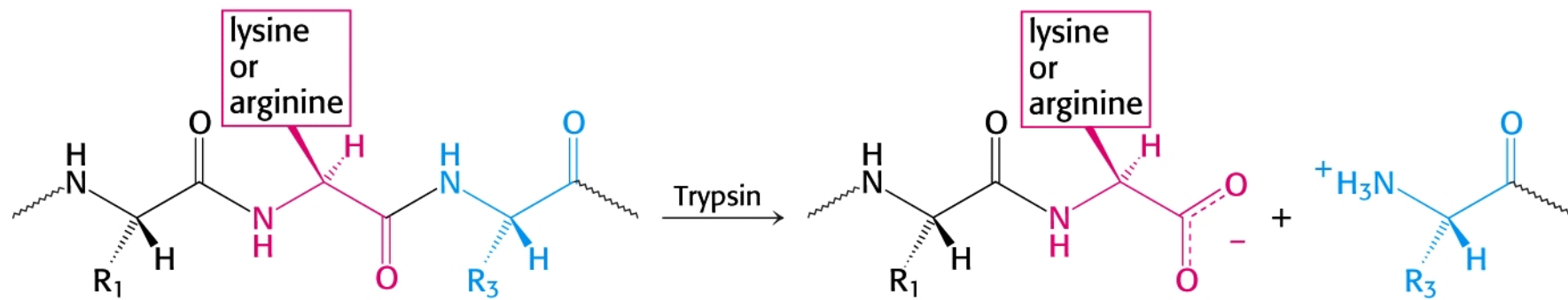
Chimotripsina

R_{n-1} = grossi residui idrofobici
(Phe, Trp, Tyr)
 $R_n \neq \text{Pro}$

Pepsina

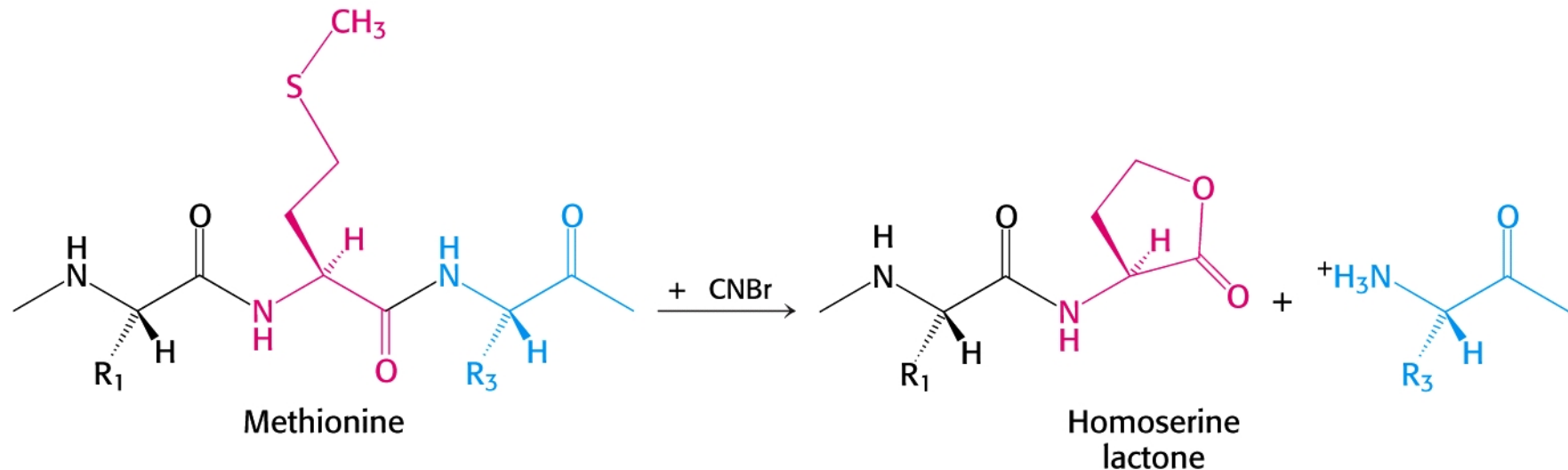
R_n = Leu, Phe, Trp, Tyr
 $R_{n-1} \neq \text{Pro}$



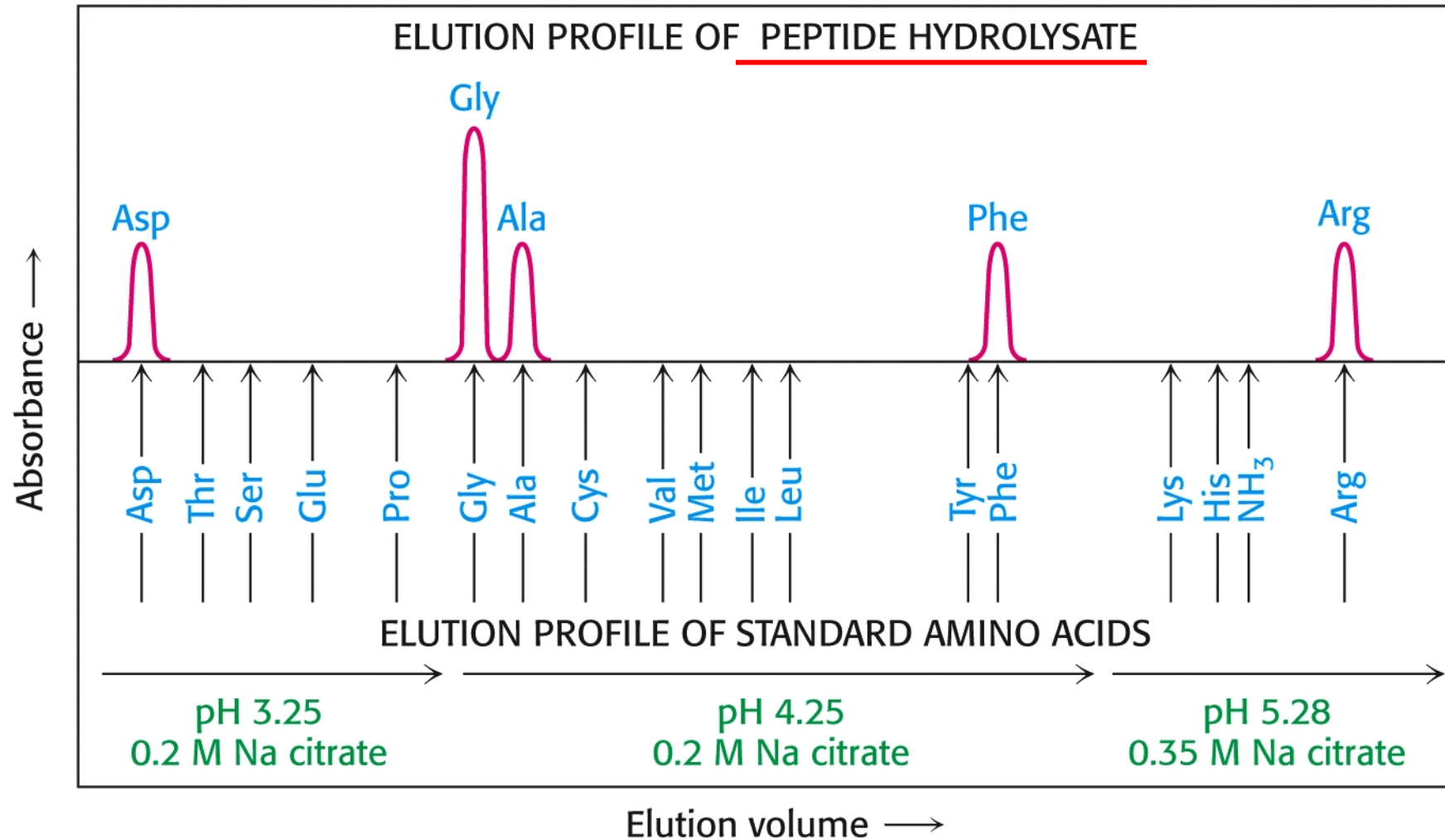


3. Determinazione della mappa triptica

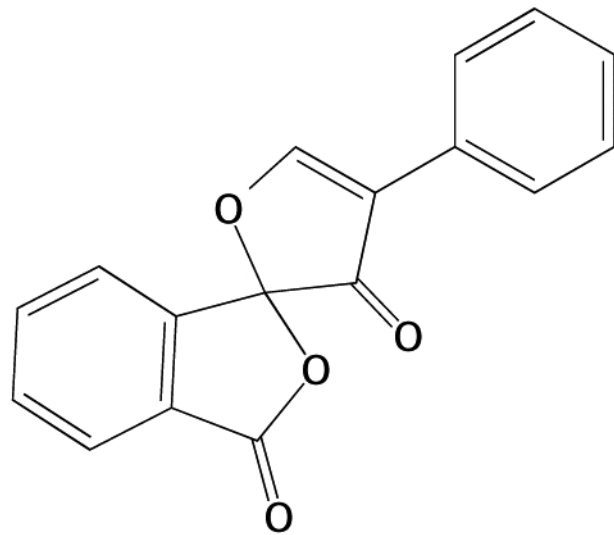
La proteolisi limitata può essere ottenuta anche mediante peptidasi chimiche (non enzimatiche), ad es. il BROMURO di CIANOGENO (CNBr) che scinde sul lato C dei residui di Met



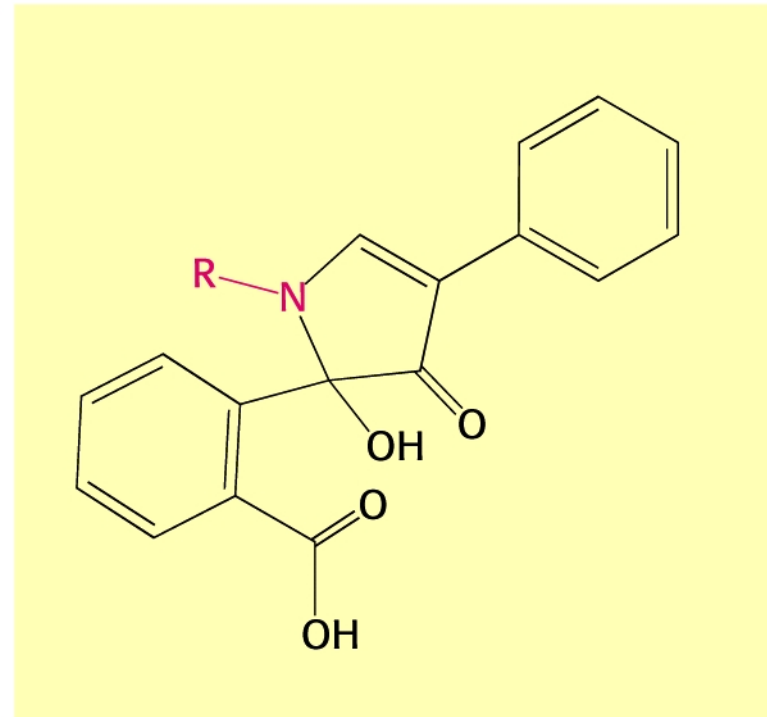
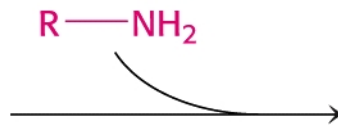
4. Determinazione della composizione aa. dei peptidi



I singoli aminoacidi possono essere individuati in HPLC dopo derivatizzazione con composti fluorescenti

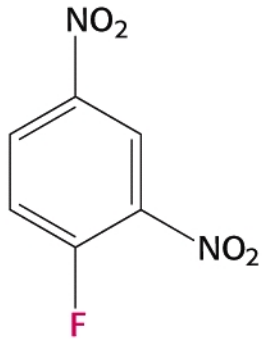


Fluorescamine

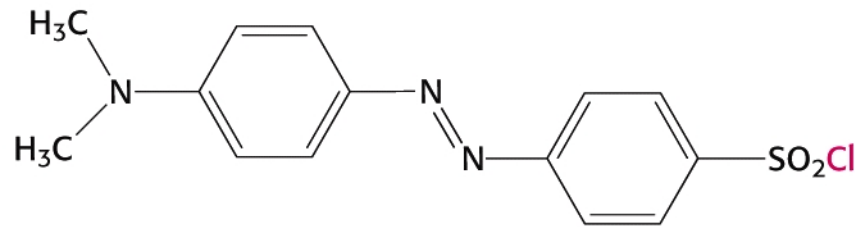


Amine derivative

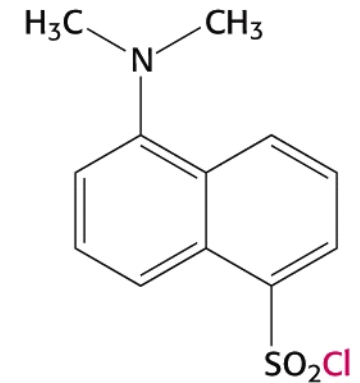
I singoli aminoacidi possono essere individuati in HPLC dopo derivatizzazione con composti fluorescenti



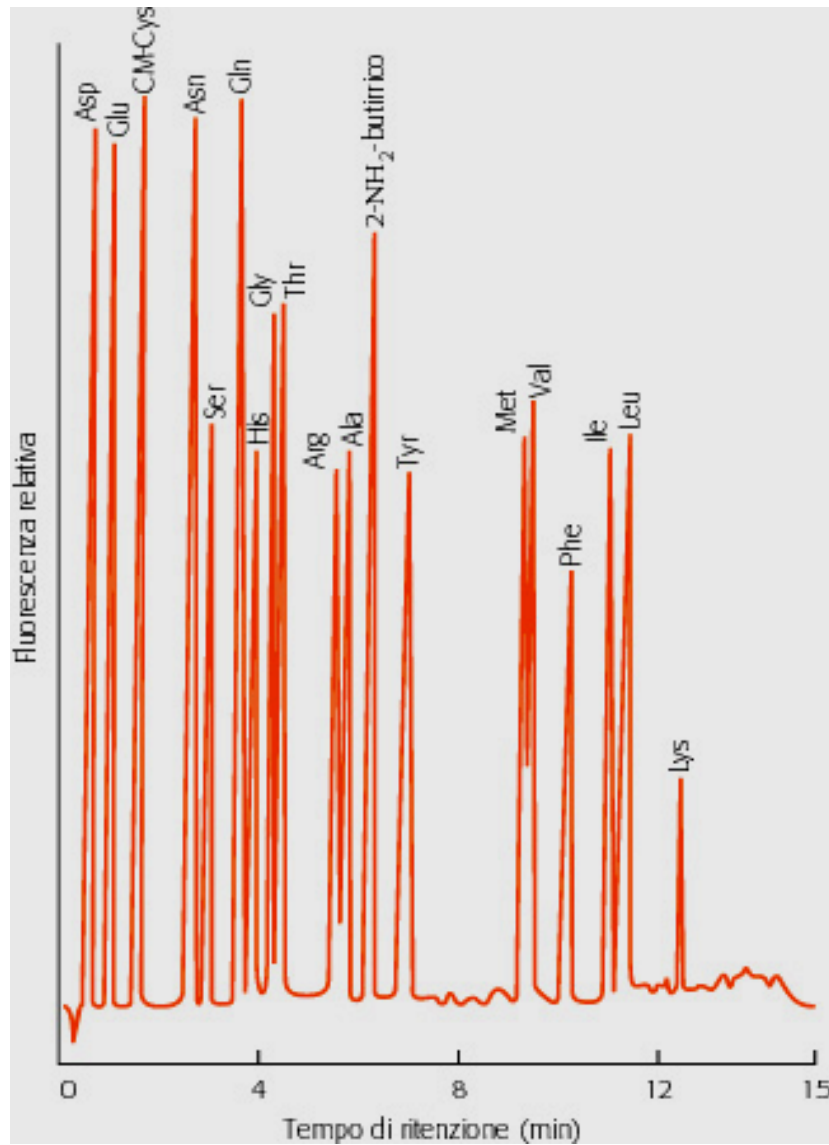
Fluorodinitrobenzene



Dabsyl chloride



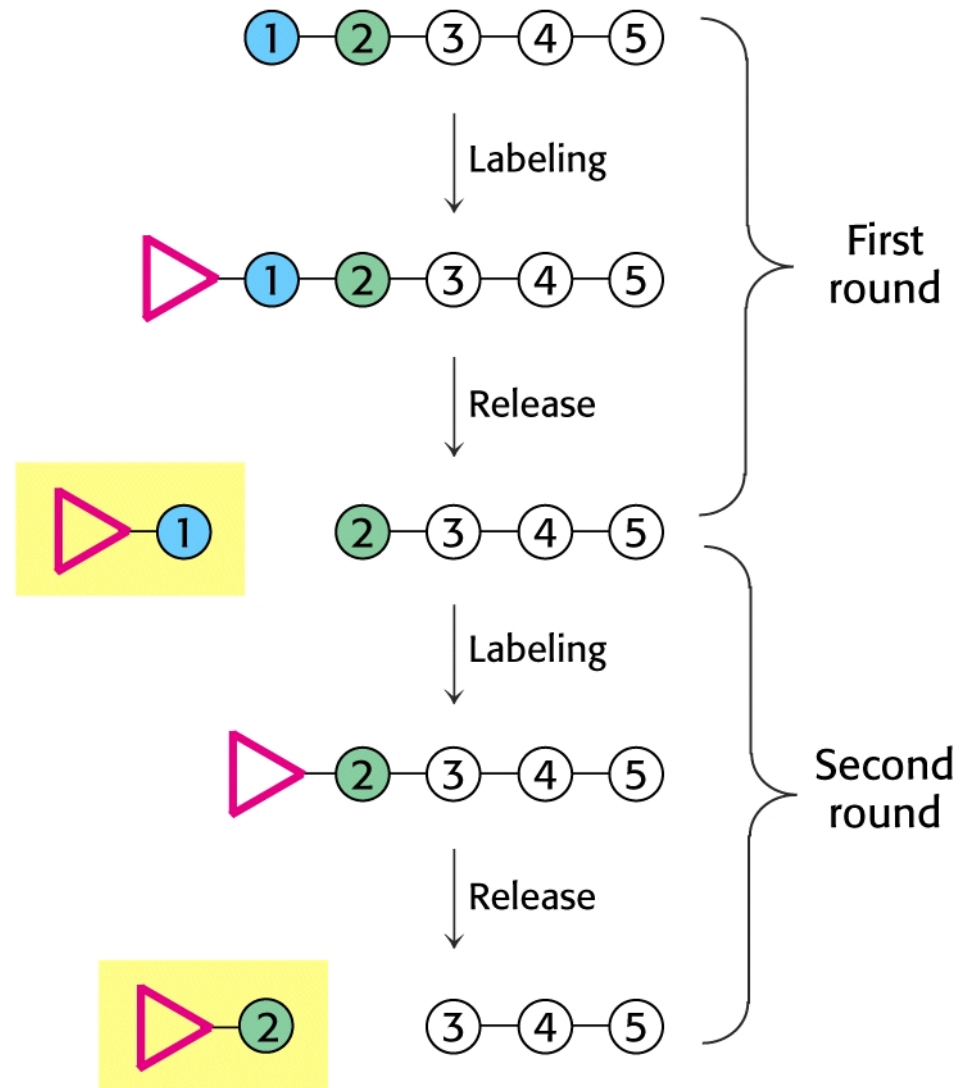
Dansyl chloride

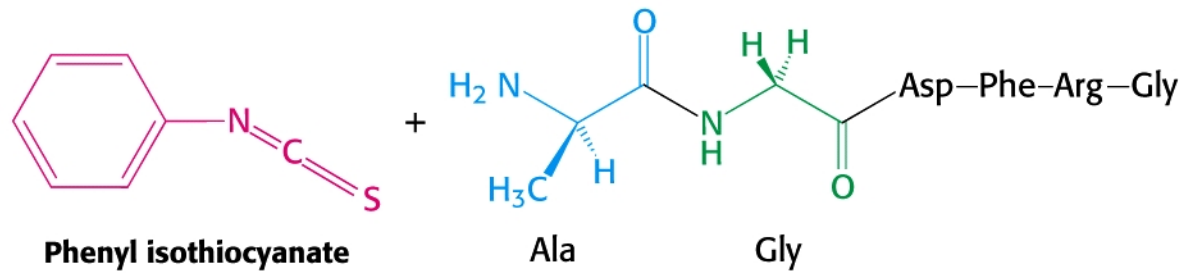


Determinazione della
composizione a.a.
mediante separazione
in HPLC dei derivati
fluorescenti

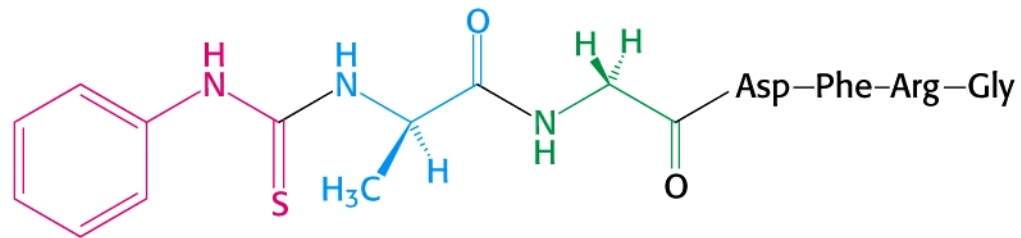
Qual è l'ordine degli a.a. nel peptide ?

EDMAN DEGRADATION

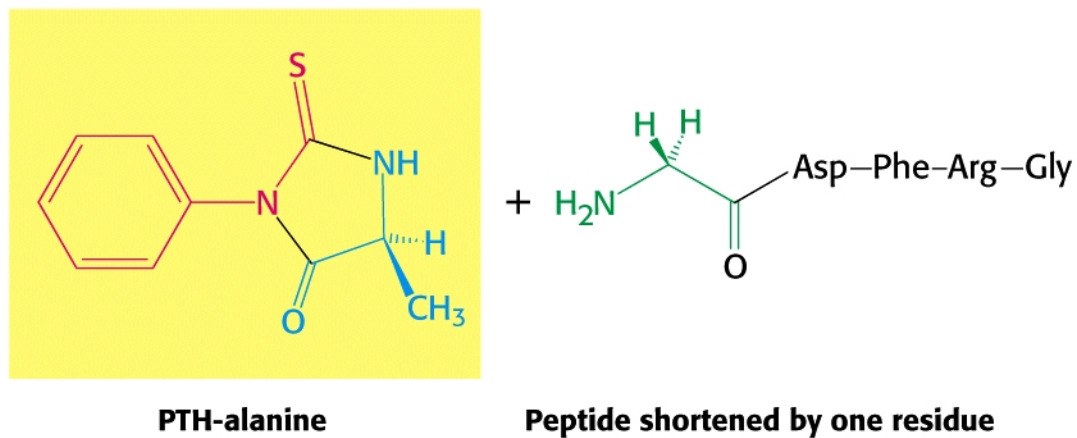




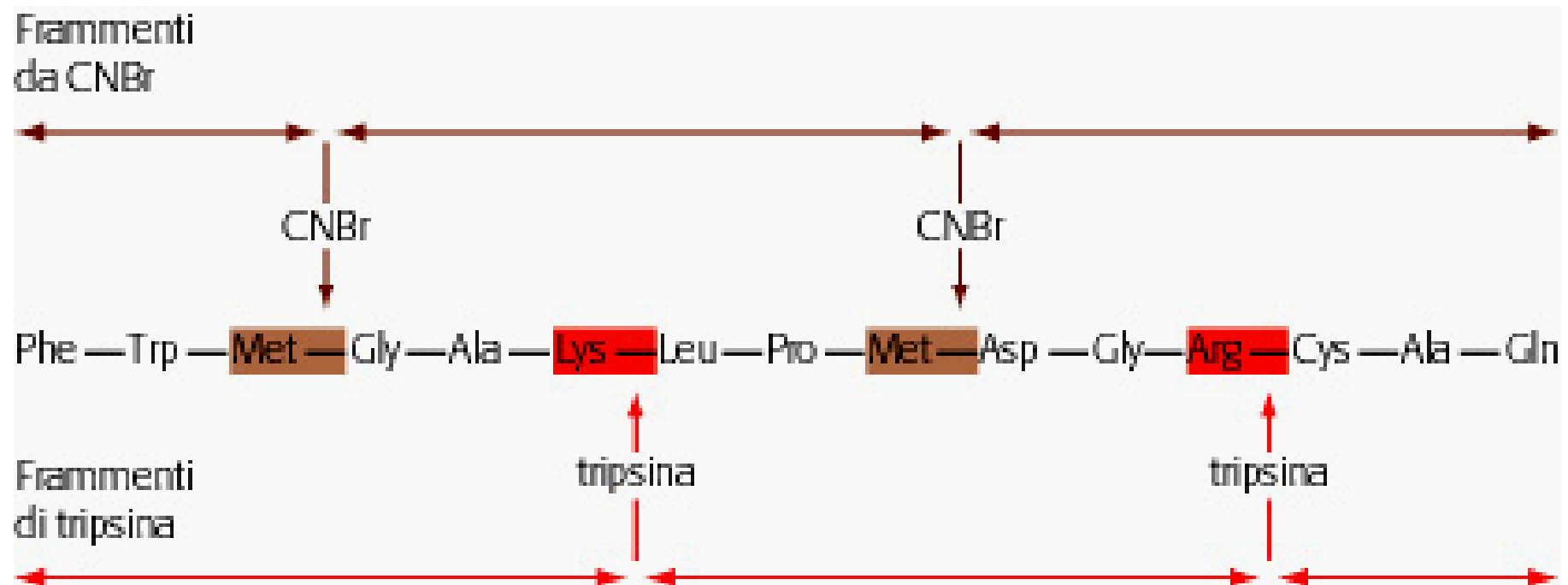
1. Marcatura N-terminale



2. + acido trifluoroacetico



6. Ricostruzione della sequenza della proteina



Determinazione della posizione di ponti disolfuro

