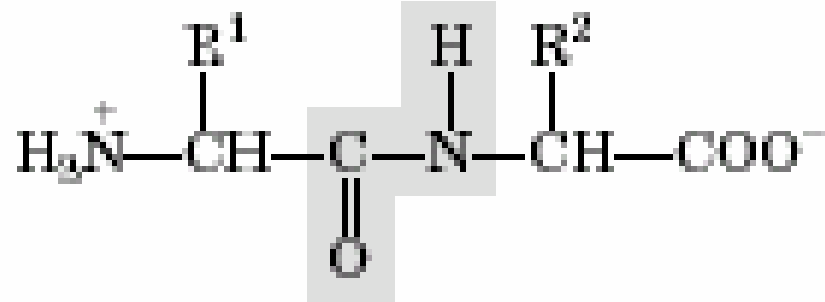
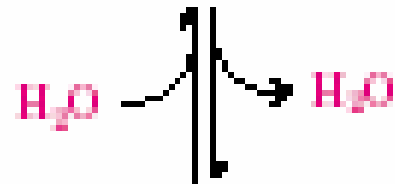
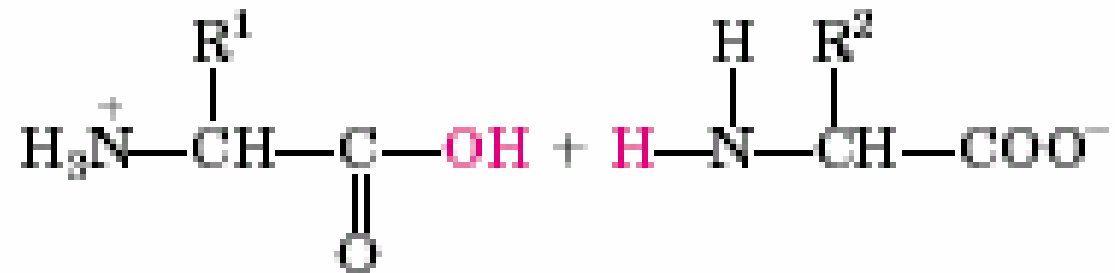
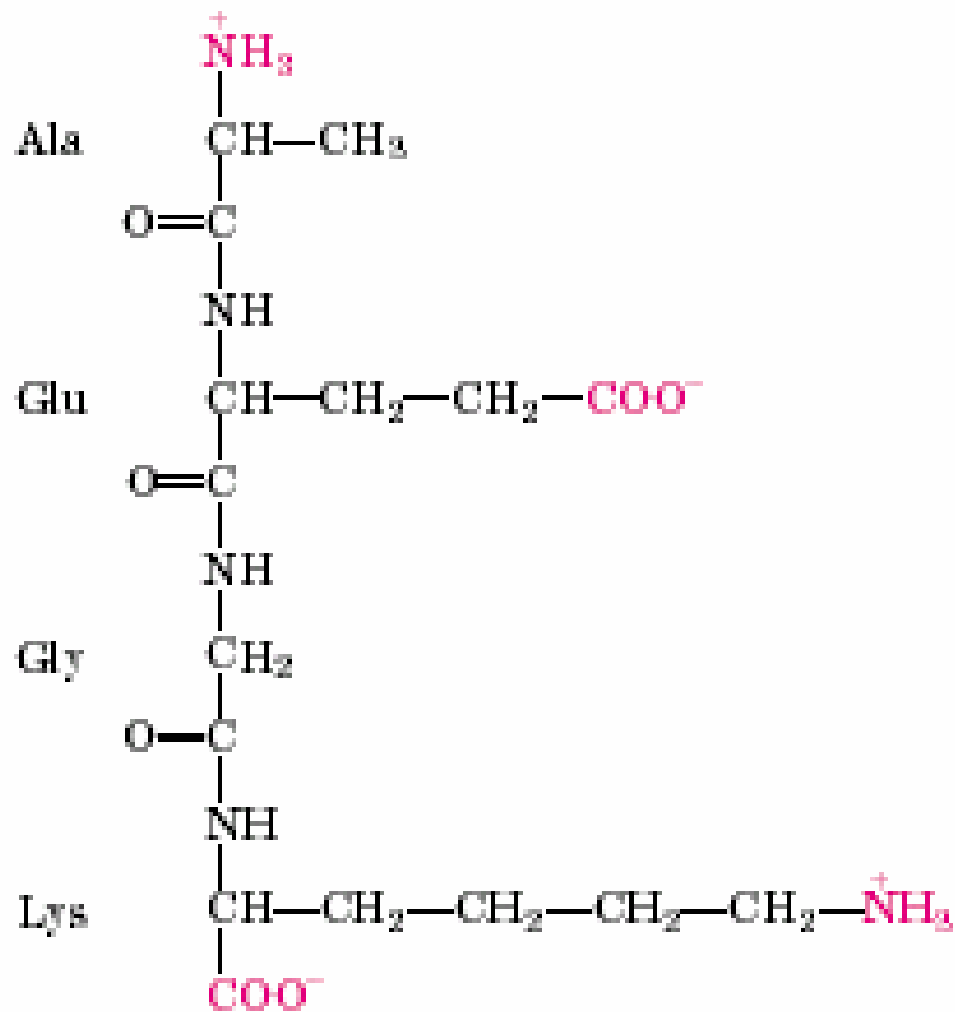


# **Cuantificación y análisis químico de proteínas**

## Enlace peptídico

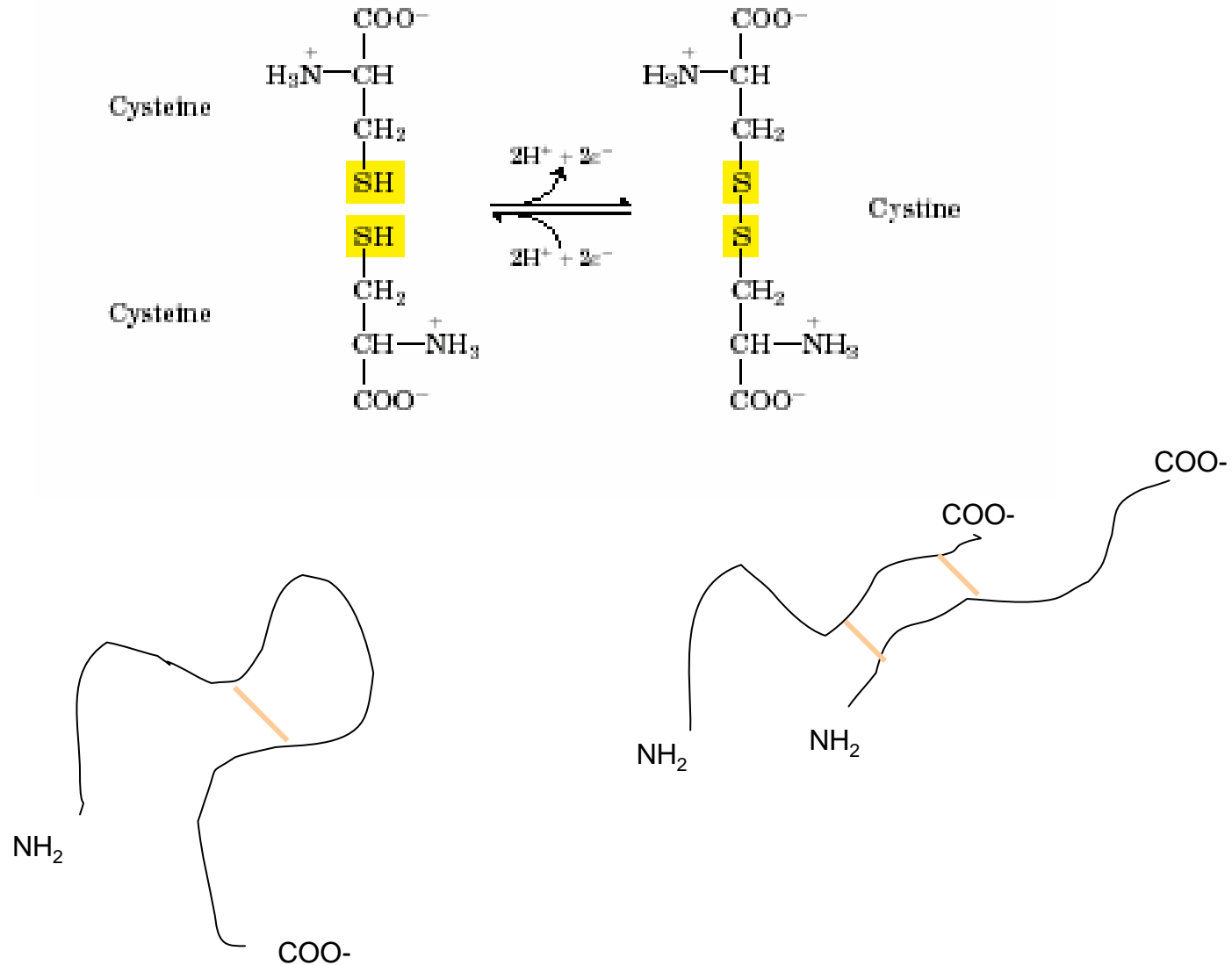


$\text{R}^1\text{R}^2$

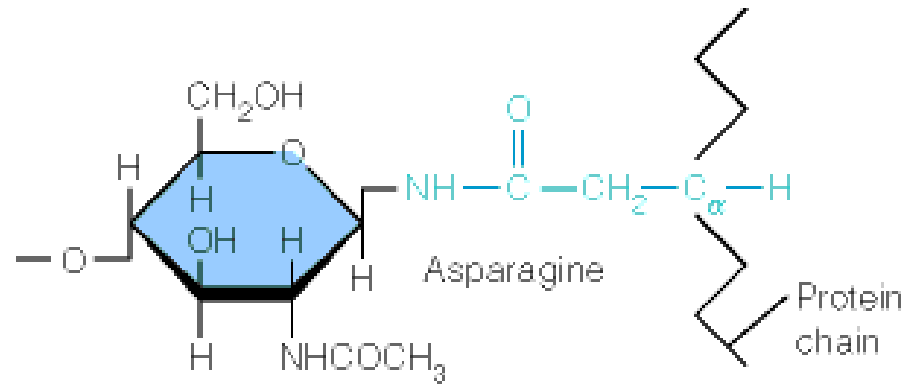


Secuencia: AlaGluGlyLys    o    AEGK

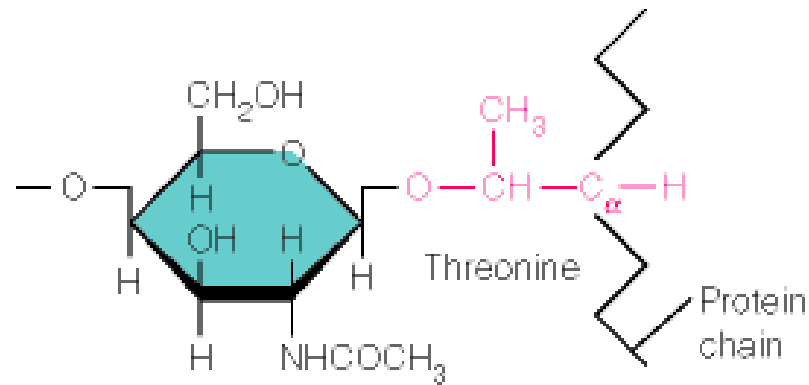
## Puentes disulfuro



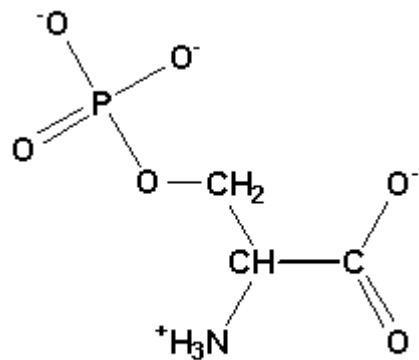
## Modificaciones Post-traduccionales



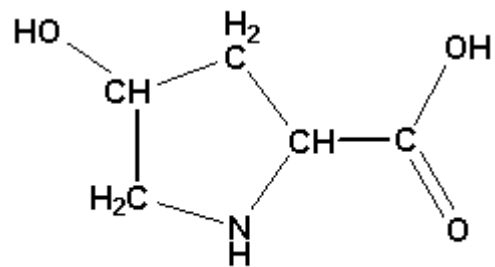
**(a)** *N*-Acetylglucosamine



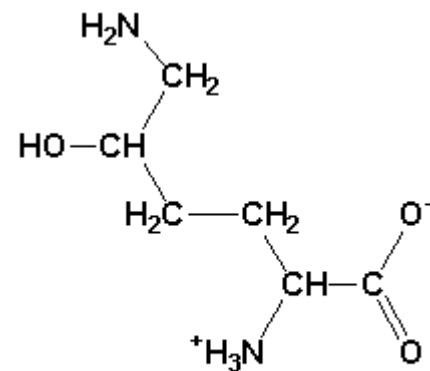
**(b)** *N*-Acetylgalactosamine



**O-phosphoserine**



**Hydroxyproline**



**Hydroxyllysine**

# I Análisis químico

Composición?

Detección?

Secuencia?

- Reacciones del enlace peptídico
- Reacciones del grupo amino terminal
- Reacciones del grupo carboxilo terminal

# Determinación de la composición de una proteína

## 1 Hidrólisis

- **Ácida**

Muy usada. HCl 6M 24hs a ebullición.

Inconvenientes: destruye Trp, Tyr, Cistina

Asn y Qln  $\longrightarrow$  Asp y Glu (se determinan por el NH<sub>2</sub> liberado)

- **Alcalina**

Inconvenientes: destruye Ser y Thr.

- **Enzimática**

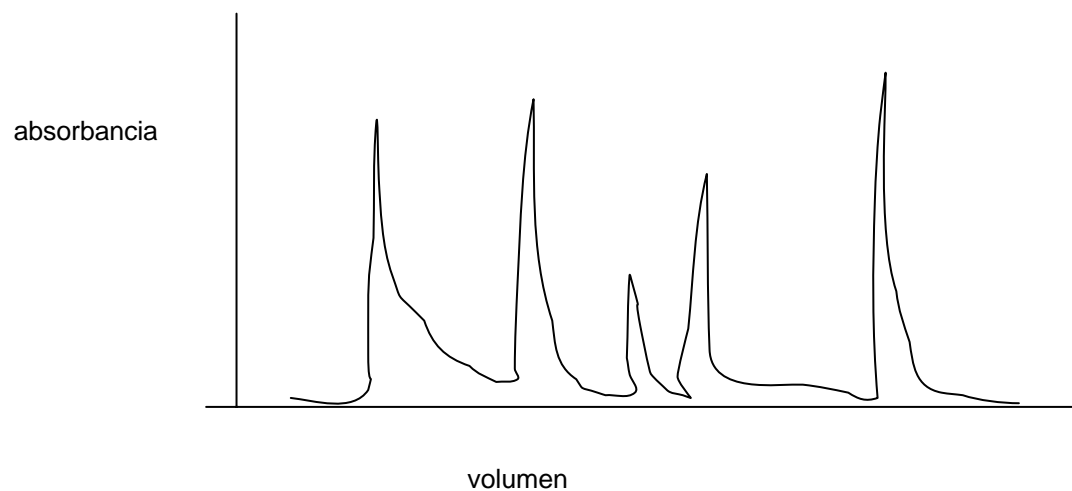
Es conservativa

Inconvenientes: no es posible una hidrólisis completa, costos

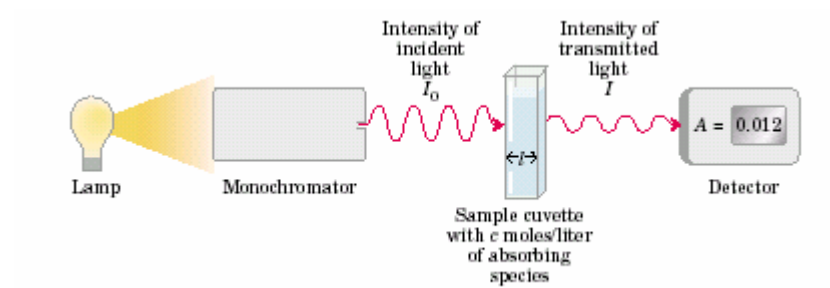


## 2 Identificación de los AA

### Cromatografía



### Técnicas espectroscópicas



### **3 Determinar relaciones molares de aminoácidos presentes**

Con estas relaciones cuantitativas determino la composición porcentual.

Debo conocer el número de cadenas presentes o el PM de la proteína.

# Reacciones de identificación del enlace peptídico y de detección proteica

## 1. Nitrógeno liberado por digestión ácida (Kjeldal)

ácido sulfúrico, sulfato de sodio, cobre y mercurio

## 2. Absorbancia. Espectroscopía UV

**Ley de Lambert-Beer:**  $A = E \cdot b \cdot c$

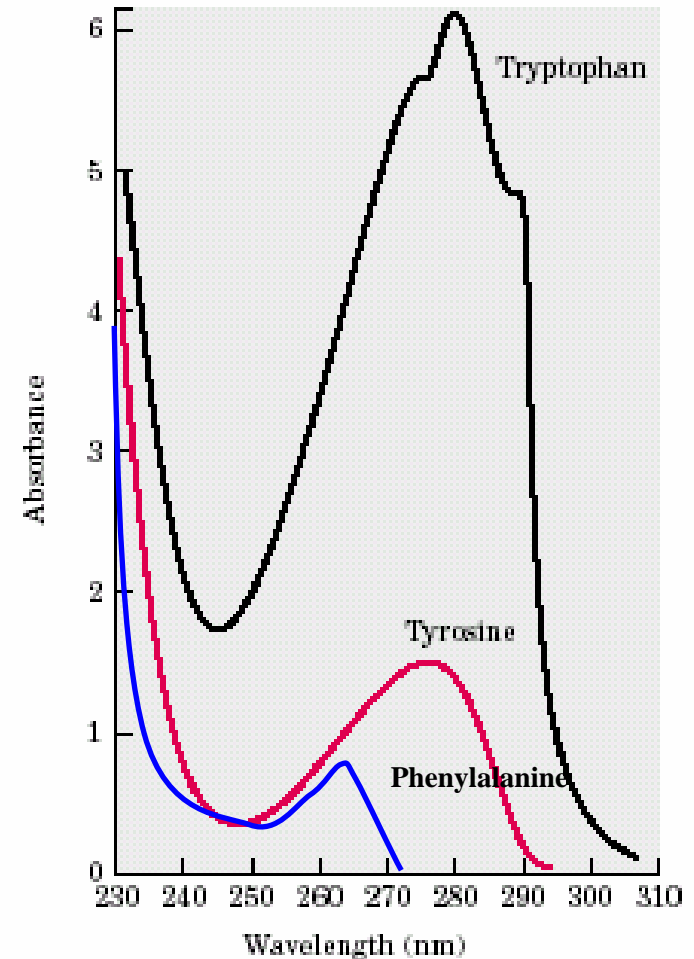
(E es una función de  $\lambda$  → del número de aa que absorben en esa  $\lambda$ )

Aminoácidos aromáticos: Phe (260nm), Tyr (275)

y Trp(280) = en general 280 nm

OJO: AN 260nm

Todos los AA = 210 nm (enlace peptídico)



### 3. Absorbancia Visible

- **Reacción de Biuret (  $\text{SO}_4\text{Cu}$ /tartrato alcalino 540nm).**

Formación de complejo. Reducción del  $\text{Cu}^{++}$ . Baja sensibilidad (1mg) pero alta especificidad

- **Reacción de Lowry et al. (Reactivo de Folin-Ciocalteu = mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno 720-750 nm)**

Alta sensibilidad(2-100ug). Problemas con interferencias. Color varía con la composición de la proteína.

- **Ninhidrina(570 nm)**

Muy sensible pero poco específico. Destruye muestra (deaminación oxidativa del  $\text{NH}_2$ )

- **Coomassie Brilliant Blue (Bradford)**

No hay reacción química. Grupos polares. Se usa para geles o para soluciones.  $1 \cdot 10^{-7}\text{gr}$

- **Reactivos Fluorescentes**

Fluorescamina, o-ftalaldehído. Picomolar. No son específicos.

- **Plata**

Muy sensible ( $1 \cdot 10^{-9}$  gr). Para geles.

# Reacciones del grupo amino (terminal)

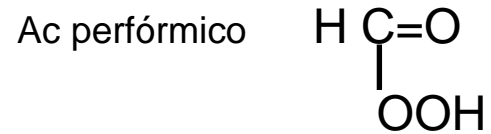
- Ninhidrina (570 nm) Pro a 440nm
- Fluorescamina (producto fluorescente). Alta sensibilidad
- 1-Fluoro-2,4 dinitrobenceno (FDNB, reactivo de Sanger) (específico alfa-amino)
- Cloruro de dansilo (específico alfa-amino)
- Reactivo de Edman (Fenilisotiocianato) (específico alfa-amino)
- o-ftalaldehído (en sn con mercaptoetanol, producto fluorescente). Alta sensibilidad
- Cianato (específico alfa-amino)

# Reacciones del grupo Carboxilo

- Hidrazina ( $\text{H}_2\text{NNH}_2$ )
- Carboxipeptidasa

## Caracterización de Cys y Cistinas

- **Oxidación de las Cistinas a Ac. Cisteico**



- **Reducción y posterior identificación**

Ditiotreitol (1,4 ditio 2,3 butanodiol) + Acetilacion con Iodoacetato

+ Cianometilacion con Acrilonitrilo ( $\text{CH}=\text{CH}-\text{CN}$ )

# Secuenciación

1. Purificación de la proteína o péptido
2. Ruptura de los puentes disulfuro
3. Determinación de los extremos amino-terminales y carboxilo-terminales
4. Corte específico de la secuencia principal en fragmentos menores, al menos en dos formas distintas
5. Purificación de cada segmento y secuenciación
6. Determinación de la secuencia total



## 2 Ruptura de -S-S-

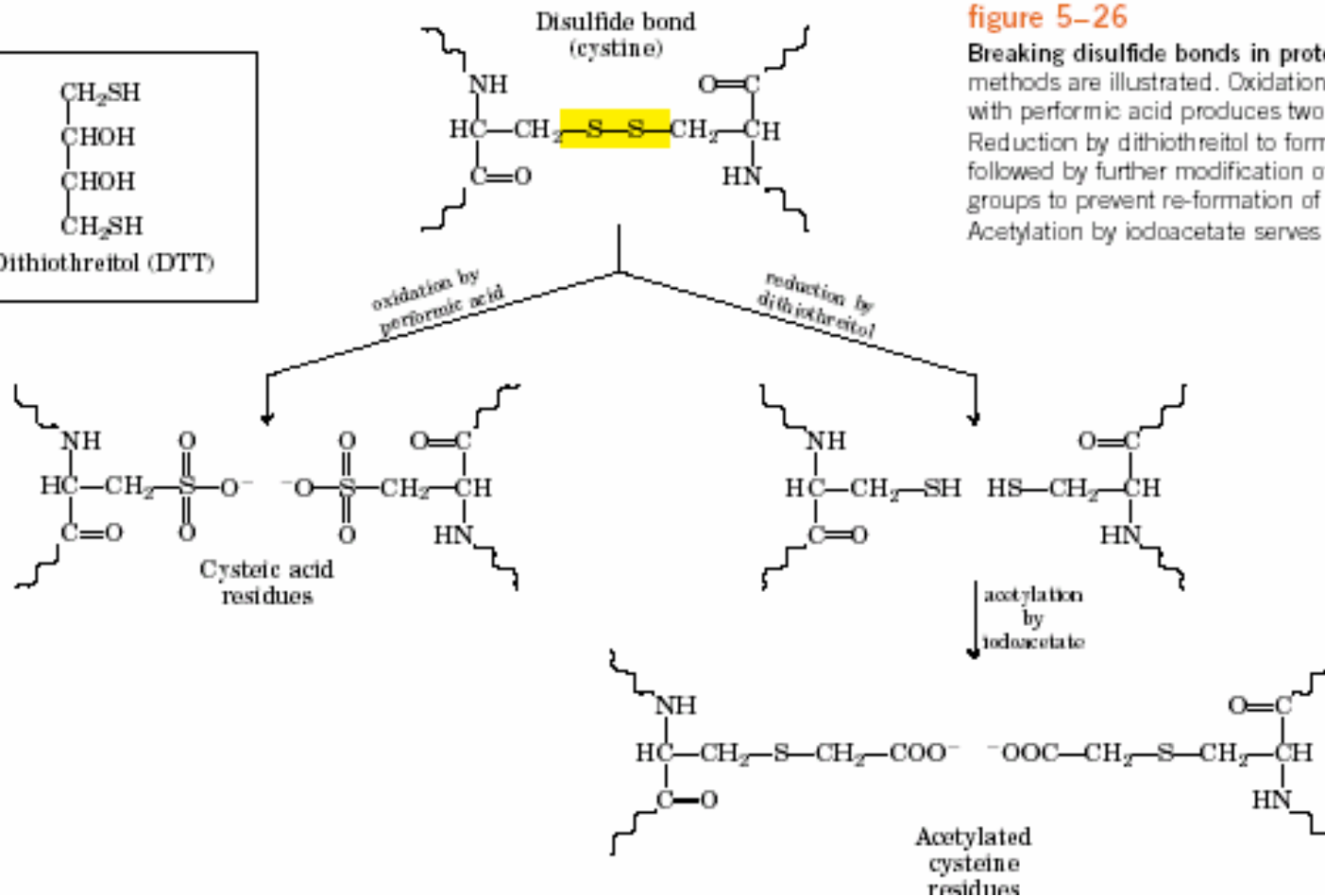
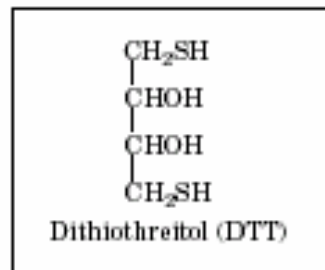
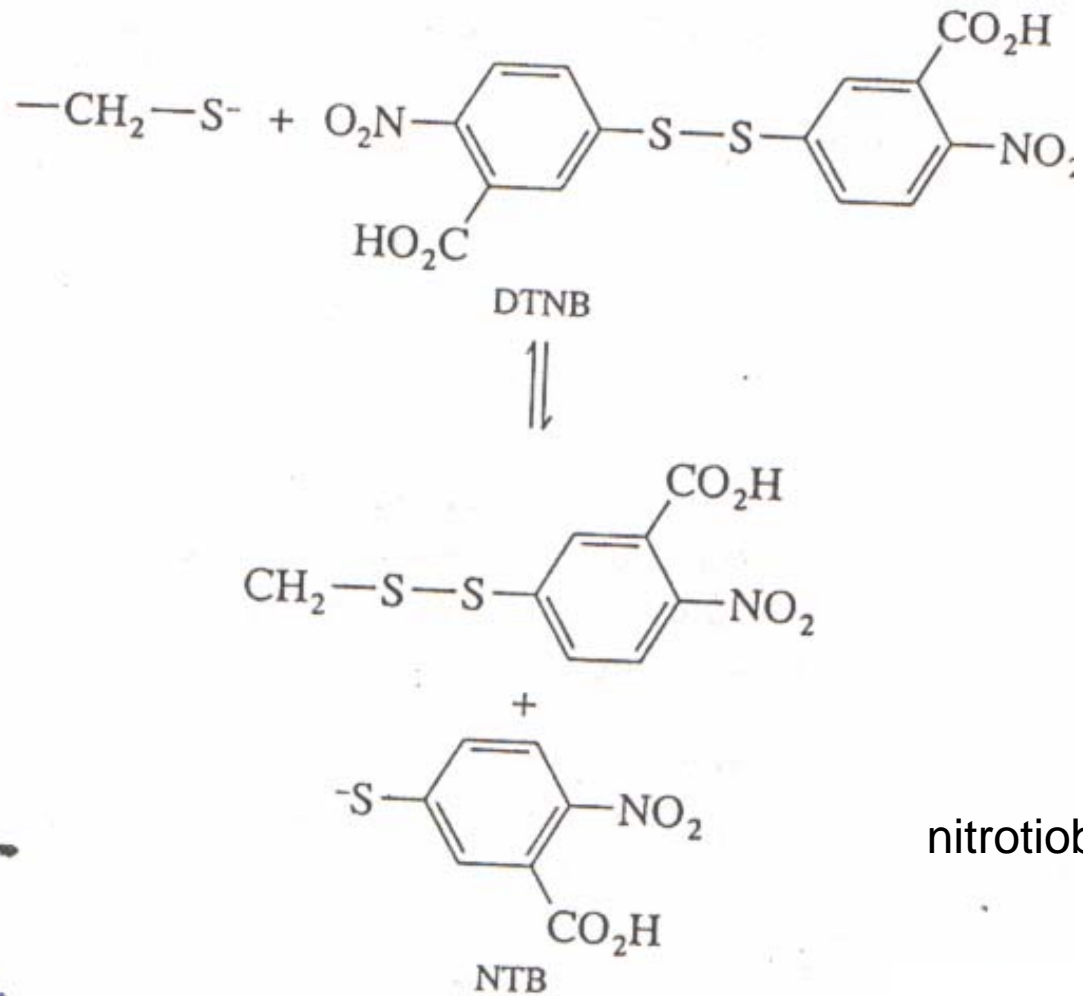


figure 5-26

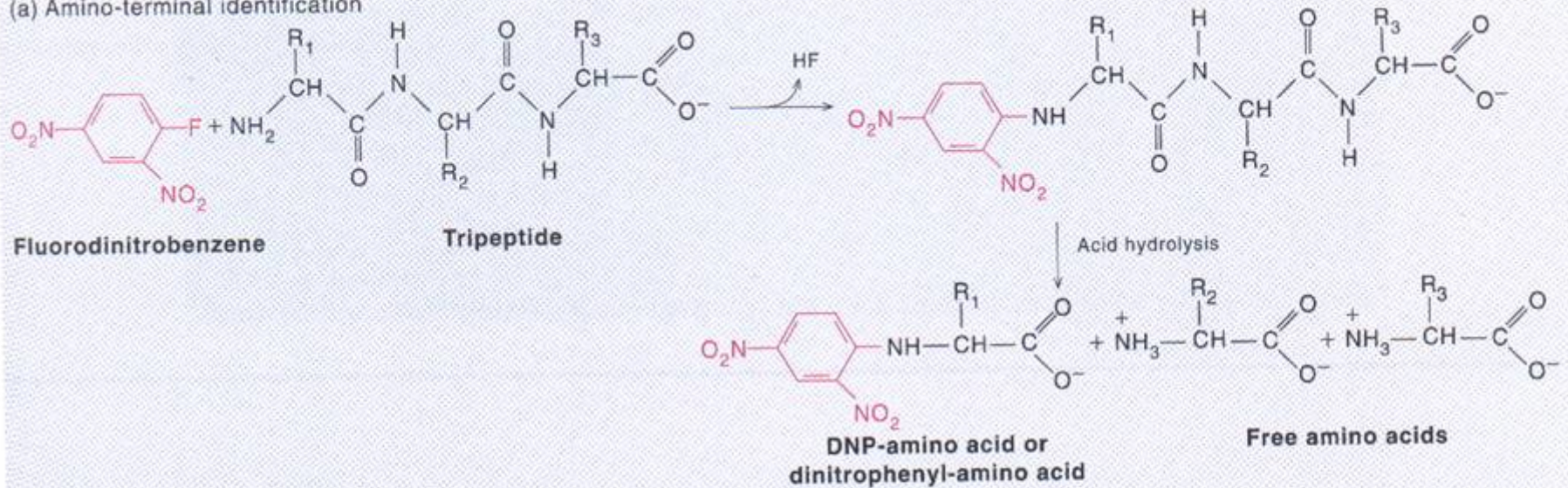
**Breaking disulfide bonds in proteins.** Two common methods are illustrated. Oxidation of a cystine residue with performic acid produces two cysteic acid residues. Reduction by dithiothreitol to form Cys residues must be followed by further modification of the reactive —SH groups to prevent re-formation of the disulfide bond. Acetylation by iodoacetate serves this purpose.

# DTNB ( ácido ditio-bis-nitrobenzoico)

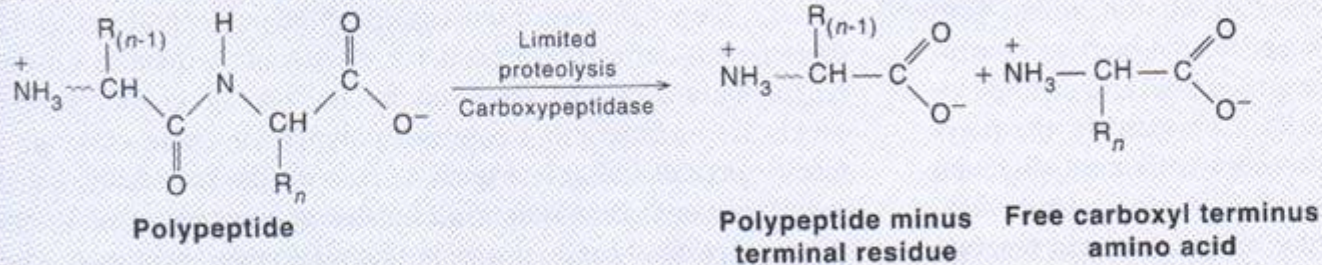


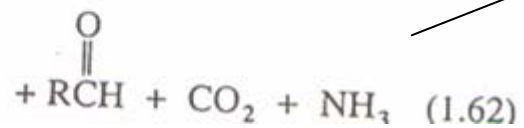
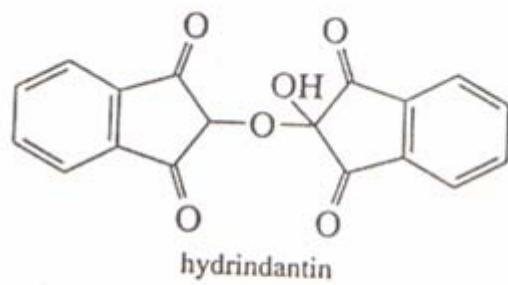
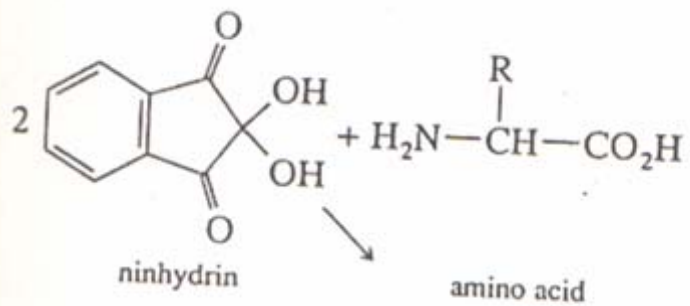
### 3 Determinación de extremos

#### (a) Amino-terminal identification



#### (b) Carboxyl-terminal identification



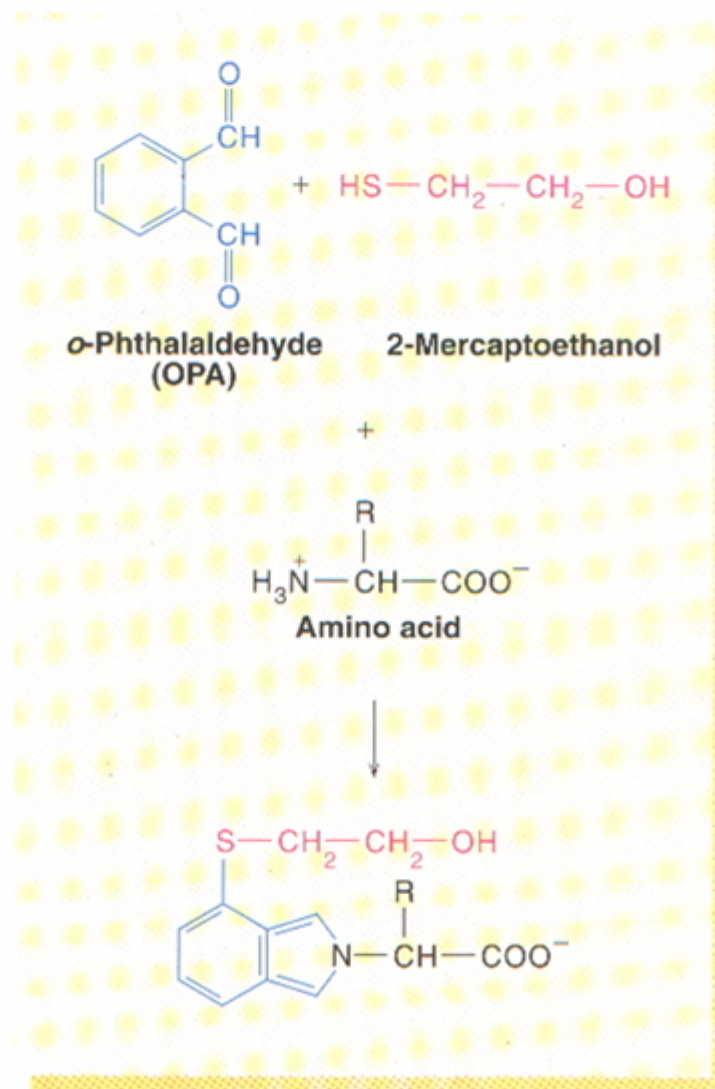


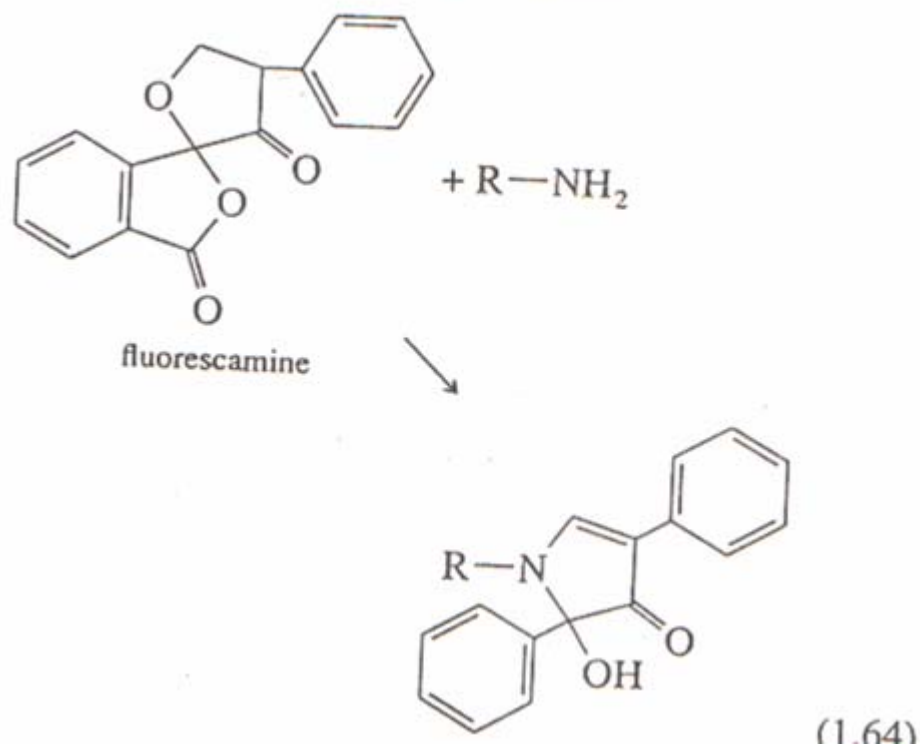
Producto  
púrpura



*Figure 4.11*

Formation of OPA-derivatized amino acids for chromatographic analysis.





# 4 Cortes y producción de fragmentos

## Métodos enzimáticos

Peptidase	Point of cleavage	Preferred side-chain group (R) in substrate
Pepsin	$\text{—C(=O)—NHCH(R)—C(=O)—NHCH(R)—C(=O)—}$	$\text{—C}_6\text{H}_5$ or $\text{—C}_6\text{H}_4\text{—OH}$ Phe Tyr
Trypsin	$\text{—C(=O)—NHCH(R)—C(=O)—NHCH}_2\text{—}$	$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_4\text{—}$ or $\text{NH}_3^+\text{C(=NH)—NH(CH}_2)_3\text{—}$ Lys Arg
Chymotrypsin	$\text{—C(=O)—NHCH(R)—C(=O)—NHCH}_2\text{—}$	$\text{—C}_6\text{H}_5$ , $\text{—C}_6\text{H}_4\text{—OH}$ , or $\text{—CH}_2\text{—}$ Phe Tyr Trp

table 5–7

### The Specificity of Some Common Methods for Fragmenting Polypeptide Chains

Treatment*	Cleavage points†
Trypsin	Lys, Arg (C)
<i>Submaxillaris</i> protease	Arg (C)
Chymotrypsin	Phe, Trp, Tyr (C)
<i>Staphylococcus aureus</i> V8 protease	Asp, Glu (C)
Asp-N-protease	Asp, Glu (N)
Pepsin	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinase Lys C	Lys (C)
Cyanogen bromide	Met (C)

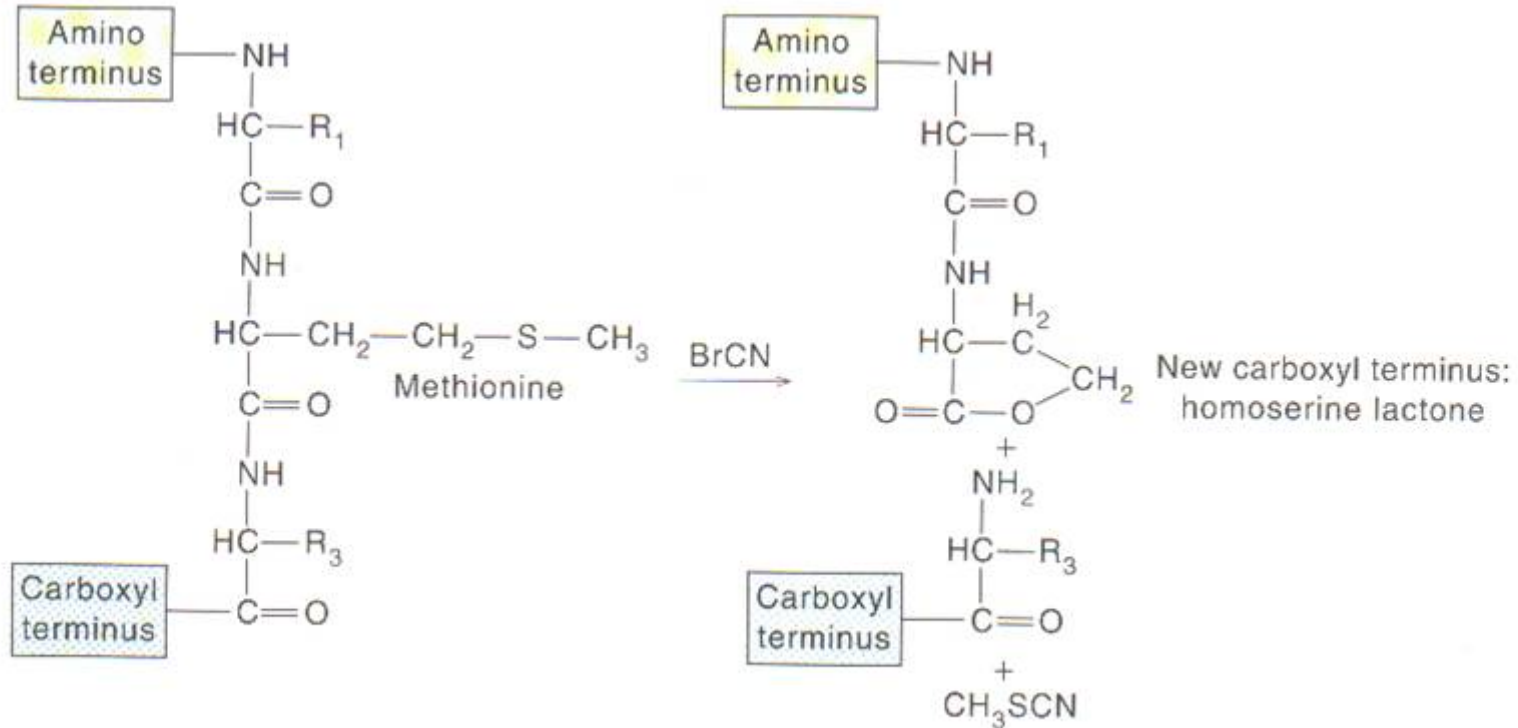
\*All except cyanogen bromide are proteases. All are available from commercial sources.

†Residues furnishing the primary recognition point for the protease or reagent; peptide bond cleavage occurs on either the carbonyl (C) or the amino (N) side of the indicated amino acid residues.

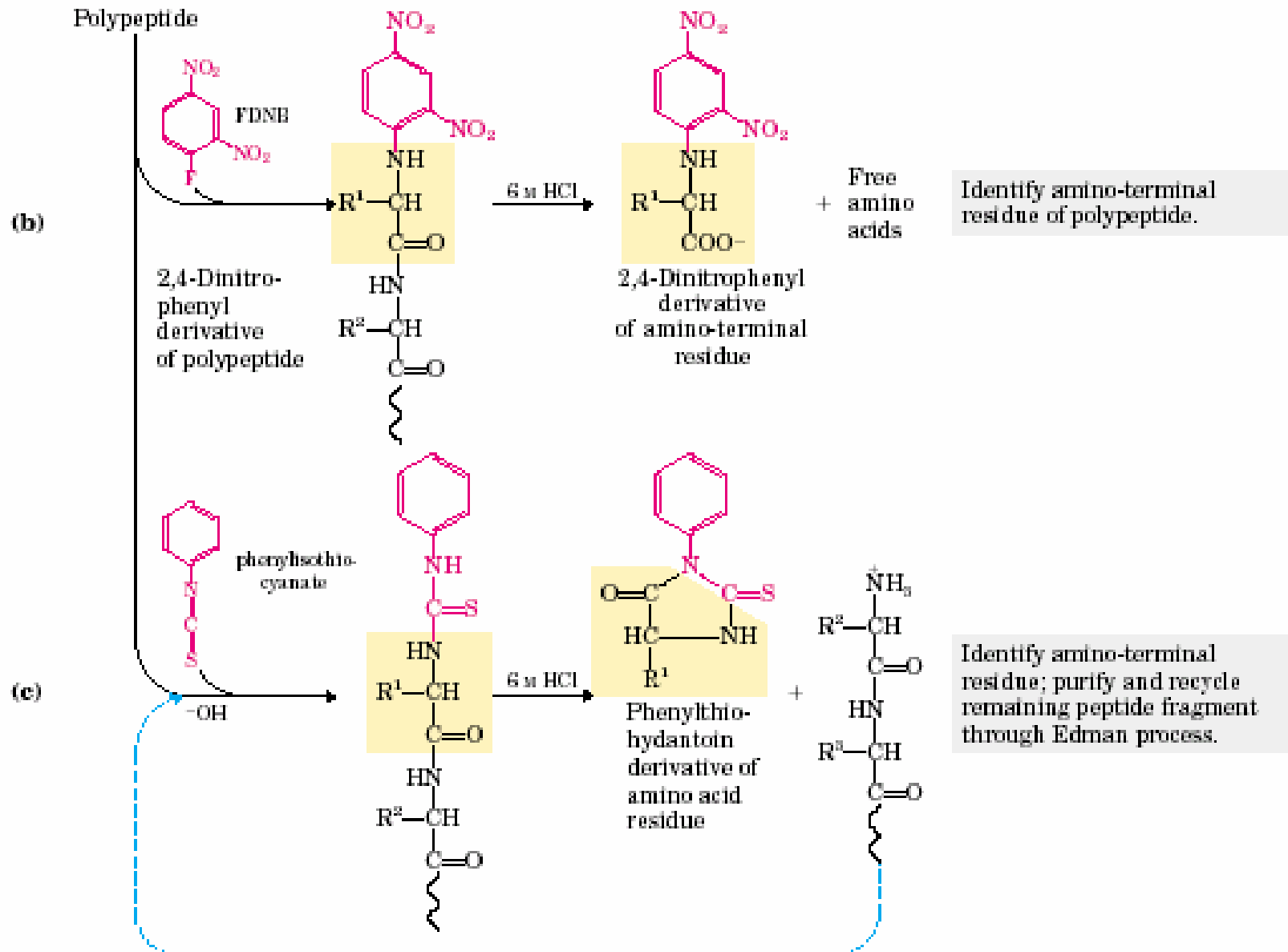


# 4 Cortes y producción de fragmentos

## Métodos químicos



# 5 Secuenciación de fragmentos



## II Análisis biológico

### Actividad Biológica

*Cantidad de proteína que produce, por su acción biológica, un determinado cambio.*

Este cambio puede ser:

- Un efecto biológico (Muerte celular, hemólisis, protección inmunológica)
- Variación en la cantidad de una sustancia química (producto de una reacción)

De esta forma podemos definir a la unidad de actividad biológica como :

Una unidad de **Actividad Biológica** es la cantidad de proteína que produce una determinada cantidad de “efecto”

1. Toxina

Una unidad de AB para una toxina es la cantidad de proteína que produce la muerte del 23% de los ratones de tal especie (siguen especificaciones...)

2. Enzima

Una unidad de AB para una enzima es la cantidad de proteína que produce 5.98 moles de producto en 1 minuto en condiciones ...(siguen especificaciones...)

- **Actividad Específica**       $AE = \frac{\text{Unidades totales en la fracción i}}{\text{Total de proteínas en la fracción i}}$