

Занятие №11. Методы прямого секвенирования белков (пептидов)

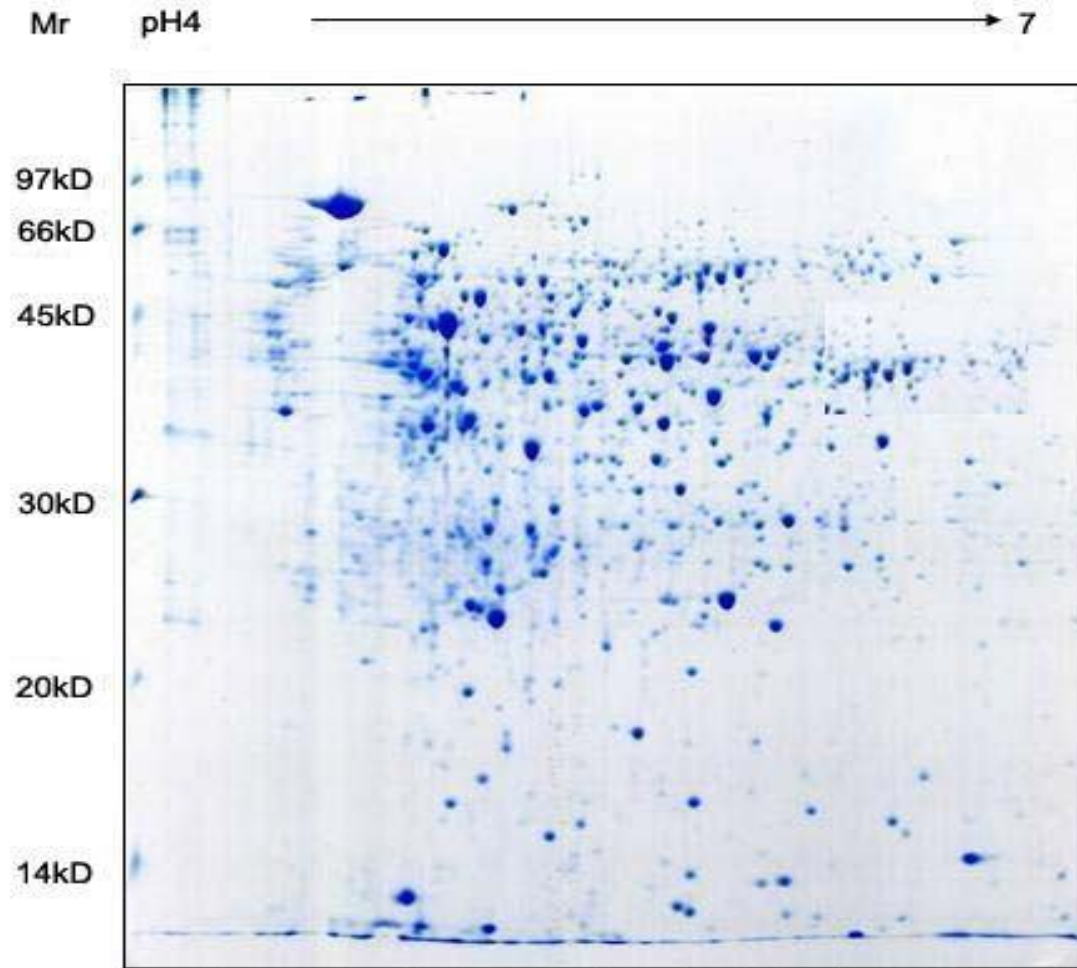
Методы прямого секвенирования белков (химическое секвенирование)

- I. Определение N-концевой последовательности:
 - 1. Метод ступенчатой деградации по Эдману
- II. Определение C-концевой последовательности:
 - 1. Изотиоцианатный метод
 - 2. Карбопептидазный метод

Этапы секвенирования по Эдману

- 1). Выделение белка (общего)
- 2). Разделение белковой смеси и определение молекулярной массы выделенных белков (PAGE)
- 3). Полный гидролиз части образца целевого белка и определение аминокислотного состава
- 3). “Случайный” гидролиз части образца целевого белка
- 4). Разделение и секвенирование набора пептидных фрагментов (~ 30-35 АК)
- 5). “Случайный” гидролиз другой части образца целевого белка другим методом

Разделение белковой смеси (или смеси пептидов) (2D-PAGE) + определение молекулярной массы

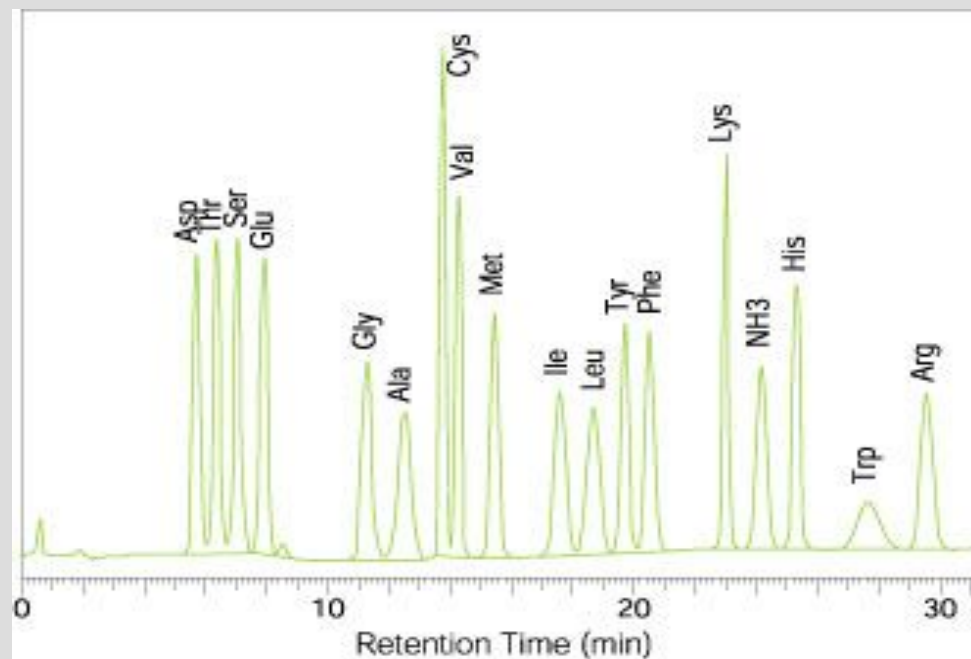


Commassie Blue Stain bacteria 2D Gel Electrophoresis

Определение аминокислотного состава целевого белка – аминокислотный анализатор

- 1. Полный гидролиз образца (150°C, HCl 6 н., 6 ч.)
- 2. “Загрузка” гидролизата в автоматический анализатор:
 - разделение смеси аминокислот с помощью ионообменной хроматографии
 - детекция отдельных аминокислот по времени элюции с помощью цветной реакции с нингидрином (фиолетовое окрашивание; для пролина – жёлтое) и измерения спектрофотометром интенсивности поглощения излучения с длиной волны 440 нм (для пролина) и 570 нм (для остальных аминокислот)

Аминокислотный анализатор и пример получаемой хроматограммы



Концентрация прямопропорциональна площади под пиком интенсивности.

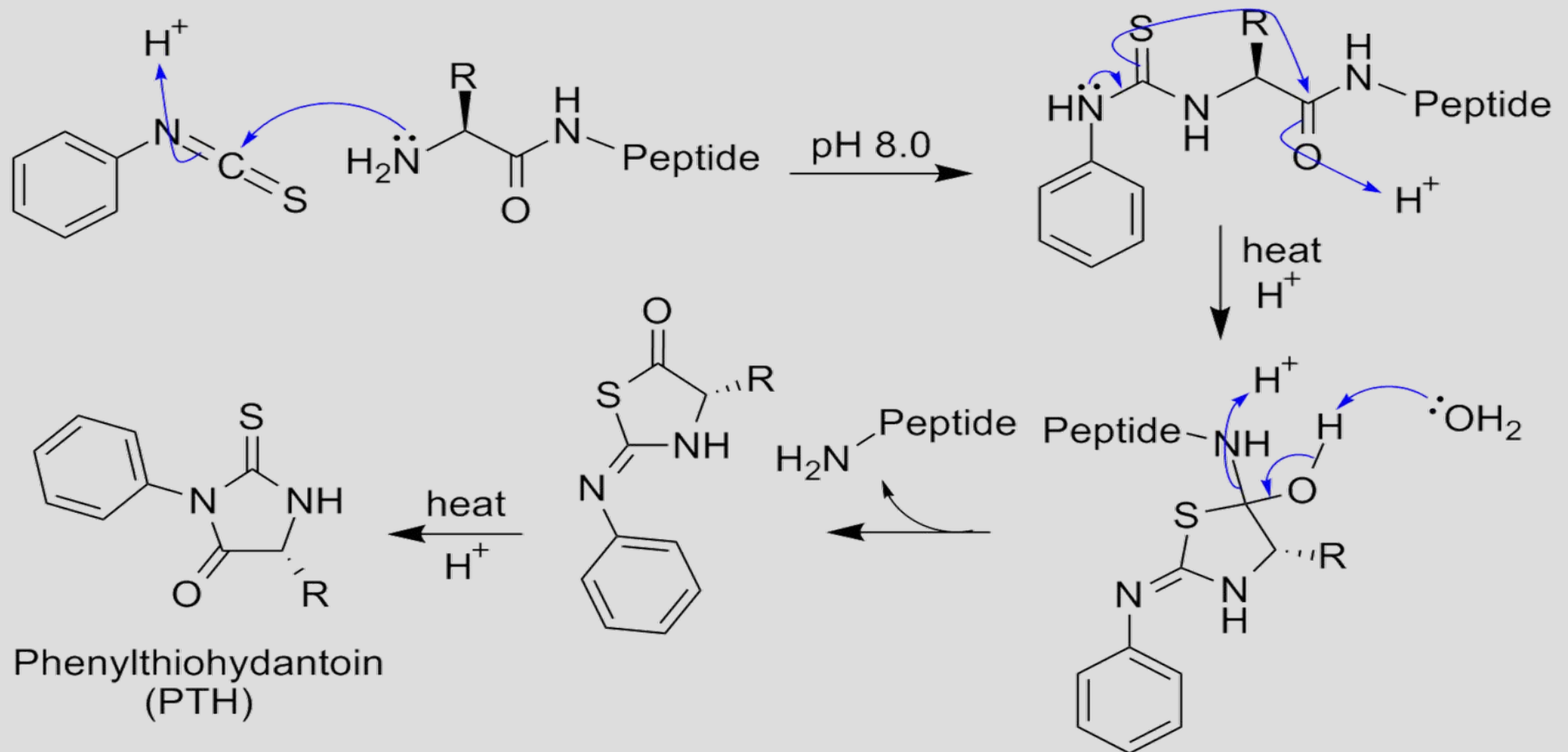
Получения набора пептидов из белковой молекулы (ферментативный гидролиз)

Фермент	pH_{opt}	T_{opt}	Сайт гидролиза	Исключен ия
Трипсин	7-9	37°C	Lys \downarrow X Arg – X Aec – X (Aec – аминоэтилцистеин H)	– Pro
Химотрипсин			Z – X Z=Tyr, Phe, Trp, Leu	– Pro

Секвенирование по Эдману: принцип метода

- 1. Присоединение: к $-NH_2$ группе N-концевой АК пептида присоединяется ФИТЦ (фенилизотиоцианат):
фенилтиокарбамил-пептид (ФТК-пептид).
- 2. Расщепление: гидролиз в кислой (трифторацетат) бескислородной среде связи C-N между N-концевой аминокислотой и оставшимся пептидом:
5'-тиазолинон-АК + пептид (n-1).
- 3. Экстракция продуктов реакции.
- 4. Реакция конверсии и детекция: 5'-тиазолинон-АК превращают (нагрев, $pH < 7$) в фенилтиогидантоин-АК (ФТГ-АК; РТН АА): детекция ВЭЖХ

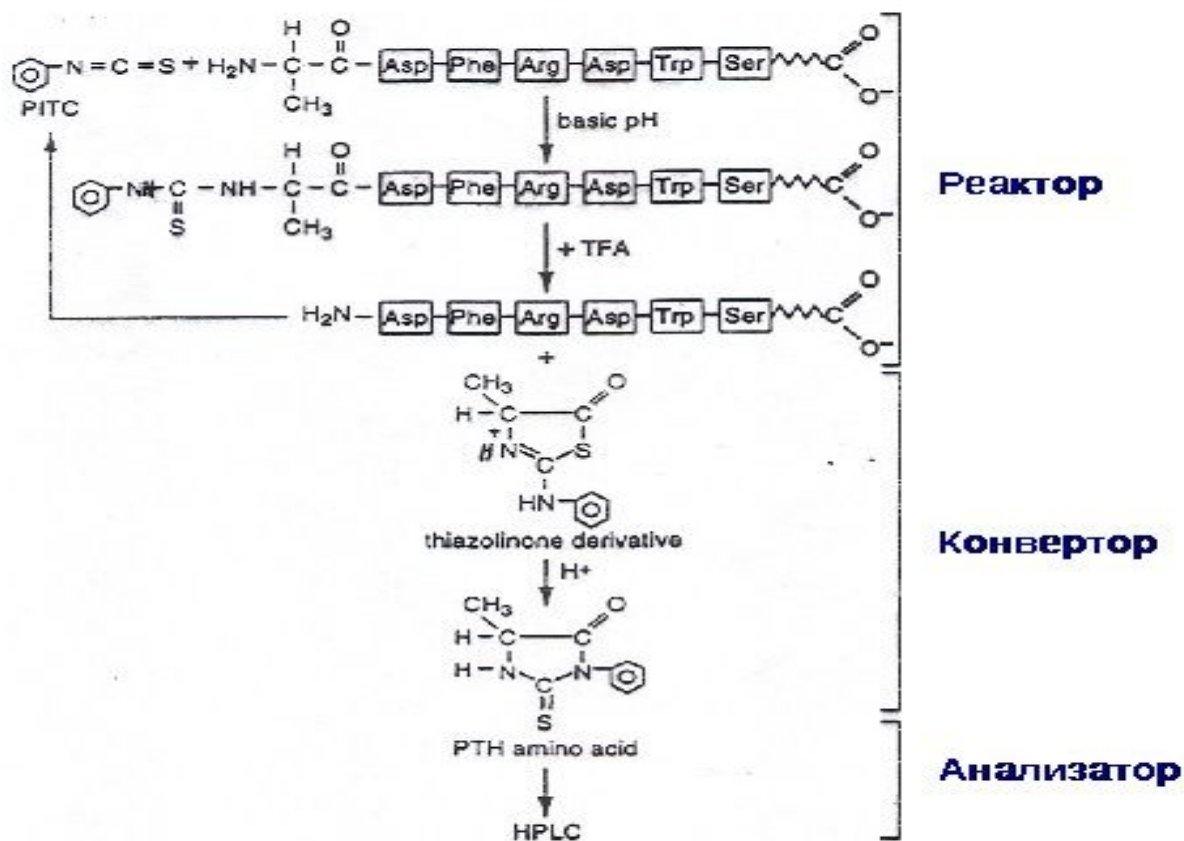
Секвенирование по Эдману: механизм



- Повторение этапов: ~30 раз (для некоторых методов до 200)

Базовая схема белково-пептидного секвенатора

Белково-пептидный секвенатор



Варианты секвенирования по Эдману

- Метод Эдмана позволяет изучать тонкие плёнки пептидов (на стенке реактора, на поверхности твёрдого носителя или в пористом фильтре)
- **Жидкофазный** метод – анализируемый пептид переходит в раствор, потом опять высушивается
- **Твёрдофазный** метод – анализируемый пептид “пришит” к твёрдому носителю
- **Газофазный** метод – почти все реагенты подаются в виде паров, пептид остаётся в порах фильтра

Модификации секвенирования по Эдману

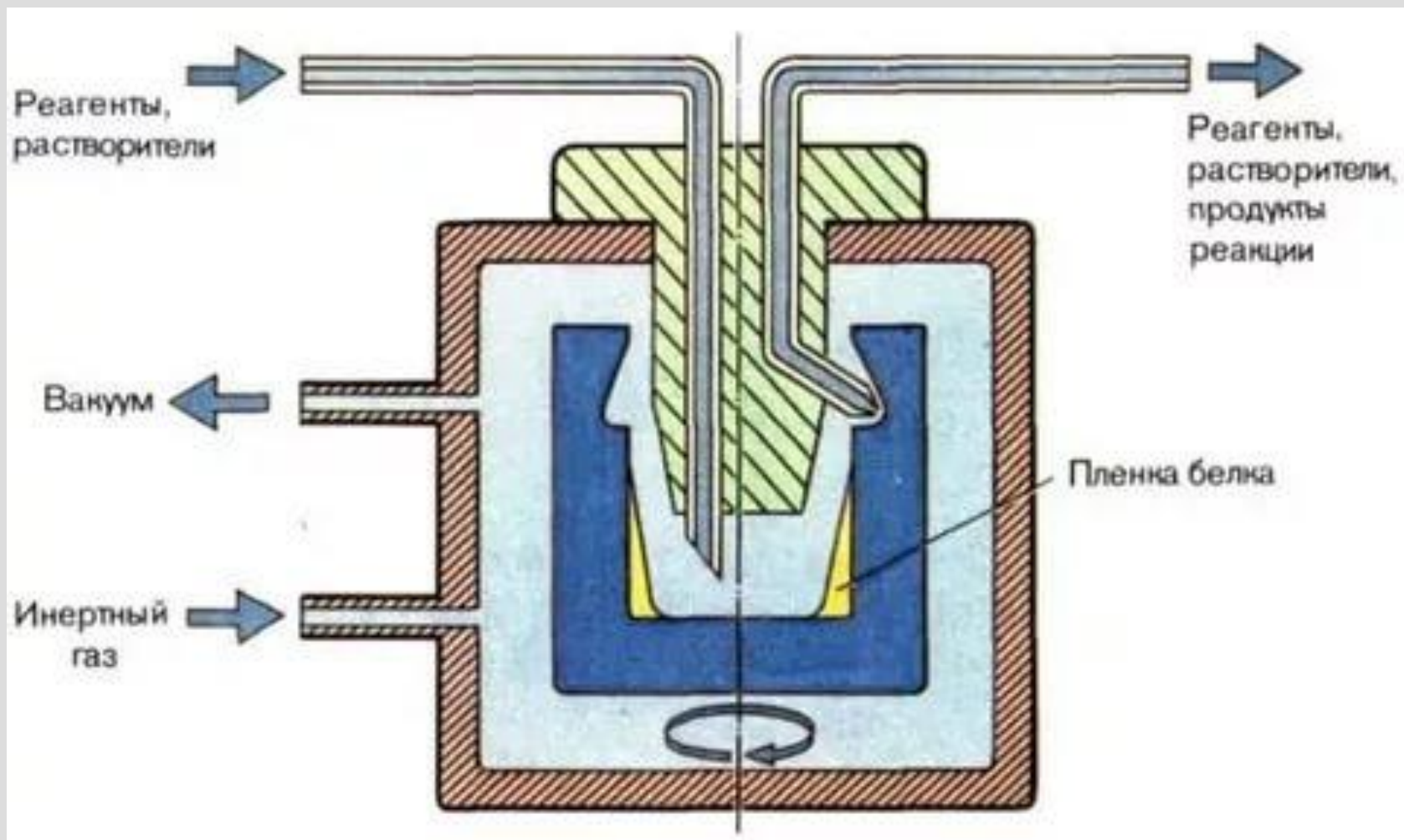
- **1. Ручной метод**
- жидкофазное секвенирование
- **2. Автоматический метод** (использование секвенаторов)
- жидкофазный секвенатор
- твёрдофазный секвенатор
- газофазный секвенатор

Жидкофазный белковый секвенатор

- Пептид в виде плёнки помещается на стенку реактора – цилиндрического стакана, в котором проводится секвенирование, – и высушивается. В дальнейшем в реактор подаются жидкие реагенты и для соприкосновения с пептидной плёнкой реактор приводится во вращение – центробежная сила заставляет жидкость двигаться вдоль стенок стакана. Реакция конверсии может быть выполнена в сопряжённом реакторе – конверторе:



- (детекция ВЭЖХ)



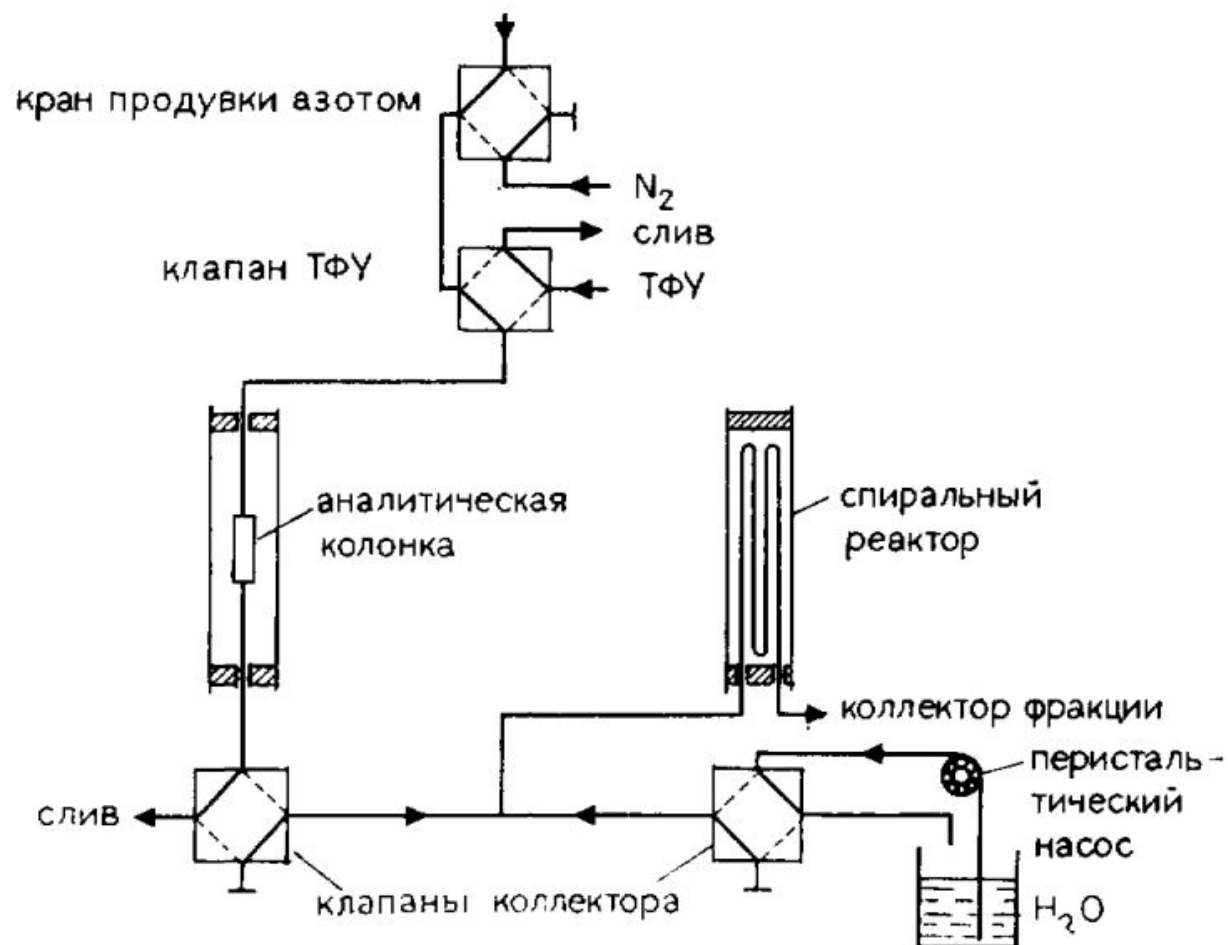
Твёрдофазный белковый секвенатор

- Пептиды ковалентно связывают с поверхностью химически модифицированного твёрдого носителя: пористые (размер пор $\sim 75\text{-}240 \text{ \AA}$) стеклянные (полистирол, аминопропил, диоксид кремния) шарики ($d = 40\text{-}80 \text{ нм}$). Твёрдый носитель как правило заполняет колонку (аналогична хроматографической). Реагенты протекают через колонку. Может быть 2-ая колонка (конвертор) для реакции конверсии:



- (ФТГ-АК детектируется с помощью ВЭЖХ).

Схема твёрдофазного белкового секвенатора с автоматическим конвертором



Твёрдофазный секвенатор VS Жидкофазный секвенатор

- **Преимущества:**

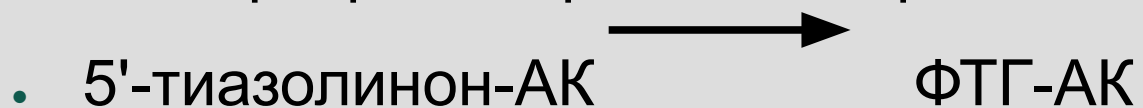
- Простота аппаратной реализации;
- Низкая стоимость реактивов и обслуживания;
- Пептид не вымывается в ходе реакции;
- Возможно использование других типов секвенирования, кроме метода Эдмана (тиоцианатное отщепление С-концевых АК).

- **Недостатки:**

- “Пробелы” в определении С-концевых АК (связаны)
- Неполнота присоединения пептида к носителю (сложность определения оптимальных условий “пришивки”);

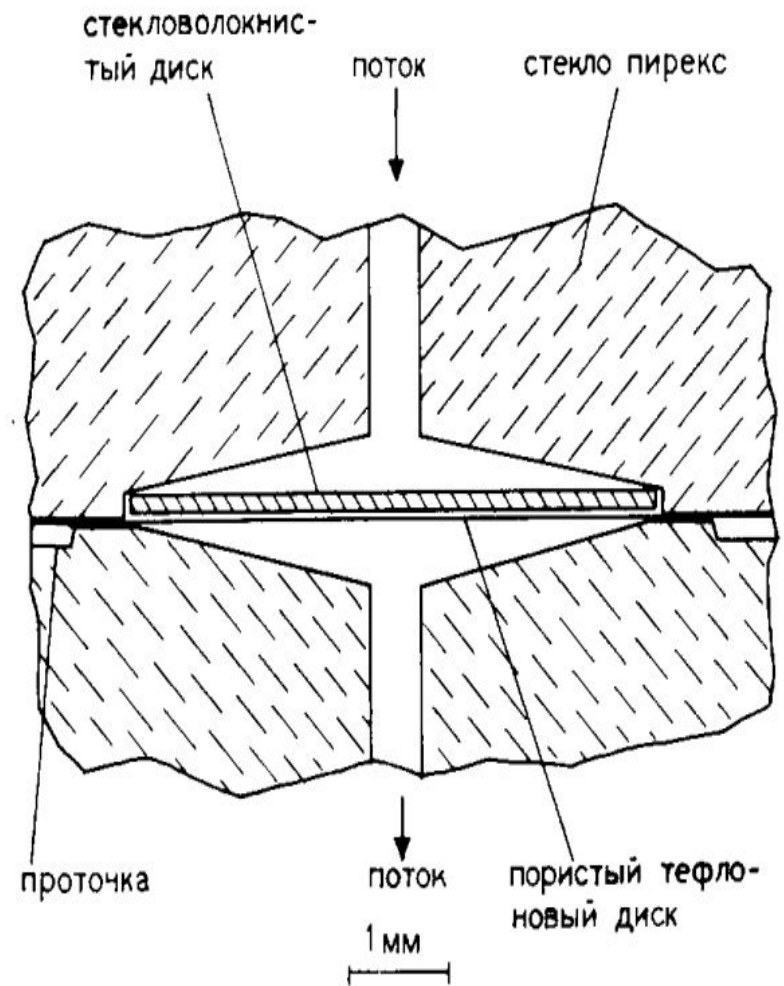
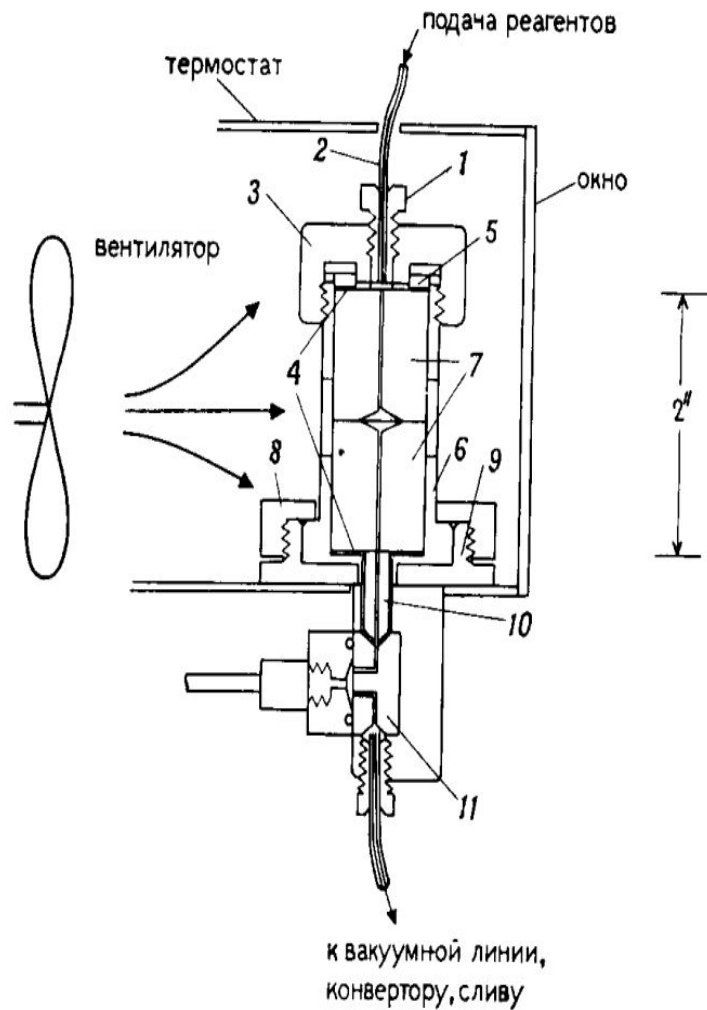
Газофазный белковый секвенатор

- Пептид наносят на стекловолоконный пористый фильтр (прочное нековалентное связывание) и высушивают. В дальнейшем все реагенты в газообразном состоянии (кроме органического растворителя и ФИТЦа) продуваются через фильтр (проточный тип подачи реагентов). Продукты реакции собираются в конвертор для проведения реакции:



- (ФТГ-АК детектируется с помощью ВЭЖХ).

Газофазный секвенатор: схема



Газофазный секвенатор VS

Твёрдофазный секвенатор + Жидкофазный секвенатор

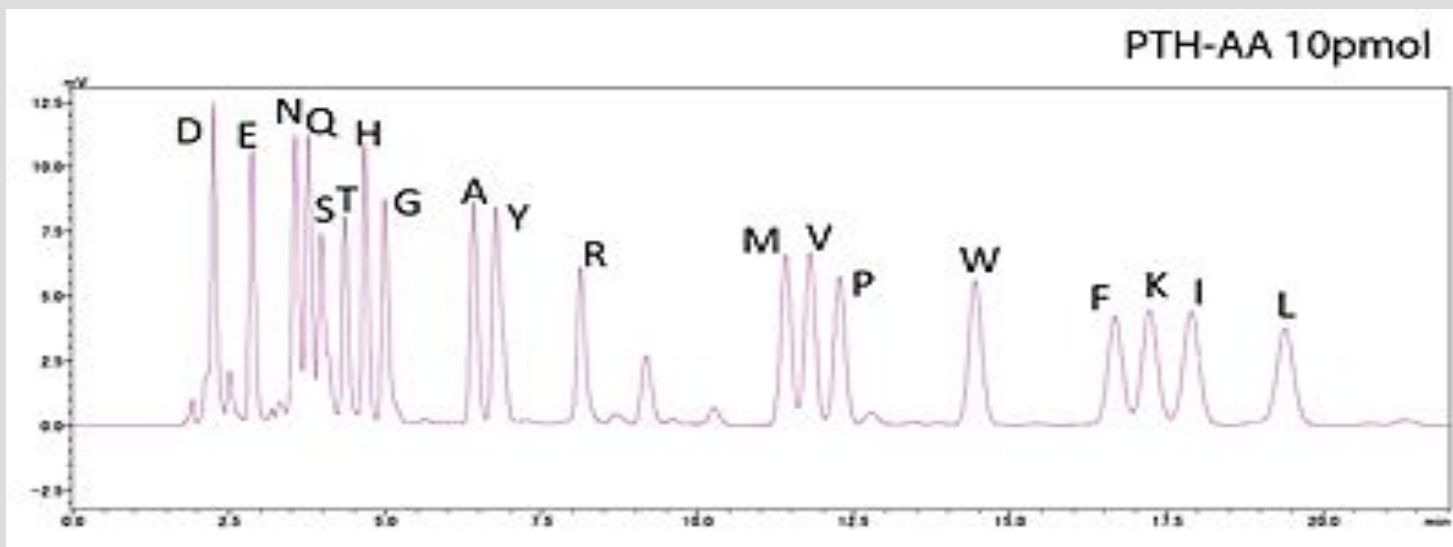
- **Преимущества:**
- Миниатюризация аппарата
- Снижение расходов реактивов и образца
- Снижение стоимости в переводе на производительность
- Анализ занимает меньше времени
- Пептид не вымывается, и для этого не нужно трудоёмкой “пришивки” к носителю
- Высокая чувствительность
- **Недостатки (общие):**
- Уступает по точности и скорости масс-спектрометрии (определение 1 АК составляет 48 минут)

Детекция при секвенировании по Эдману

- Осуществляется с помощью тандемно подключённого жидкостного хроматографа – ВЭЖХ. При пропускании через колонку хроматографа продуктов реакции Эдмана различные ФТГ-АК элюируются с различной скоростью.
- ФТГ-АК детектируются по выходу из колонки с помощью спектрофотометра по интенсивности поглощения УФ-излучения (265 нм).

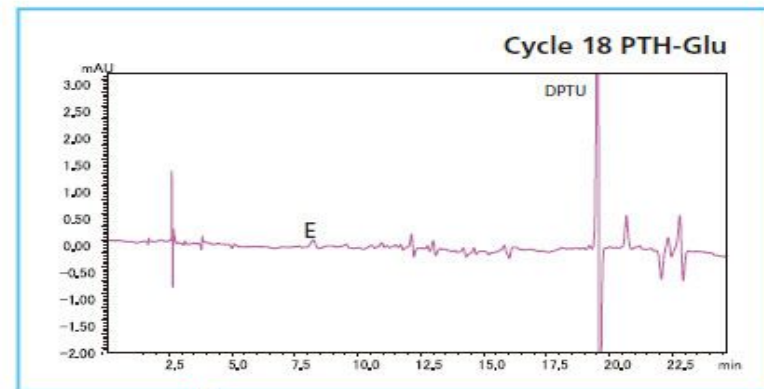
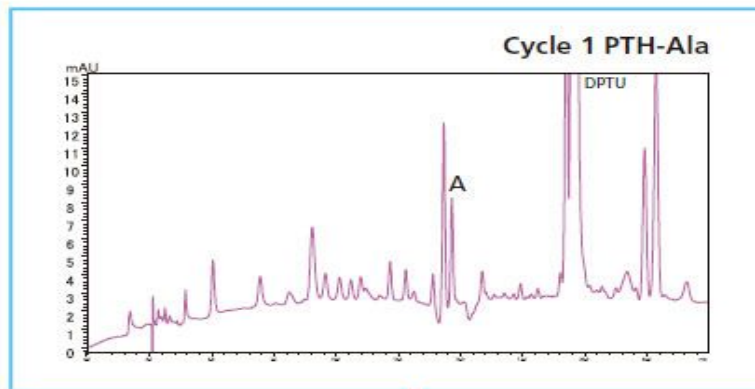
Время элюции (в минутах) ФТГ-производных разных аминокислот

Asp																		

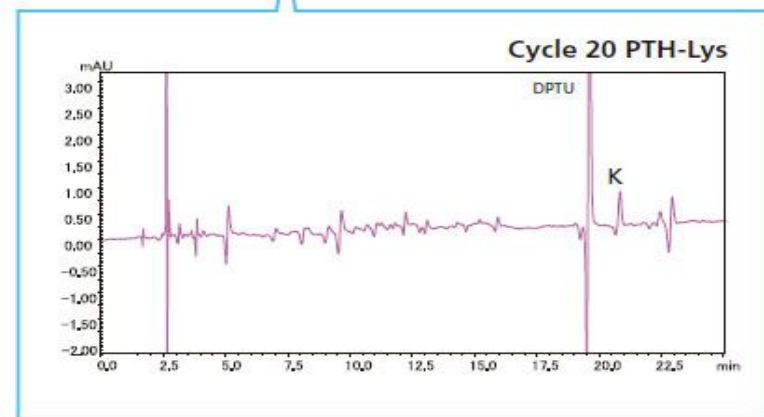
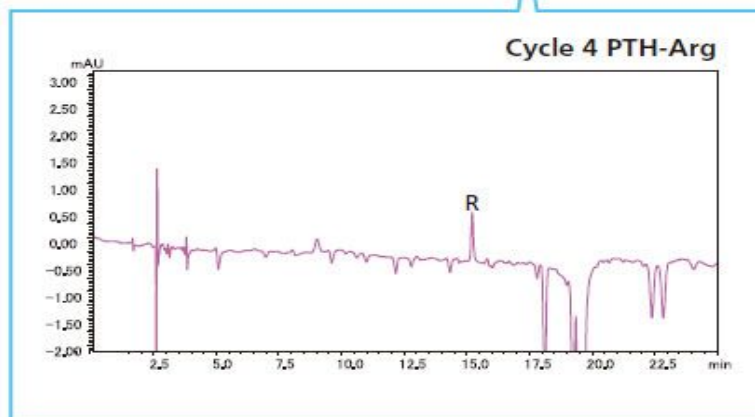


Пример хроматограмм для автоматического белкового секвенатора PPSQ (Shimadzu).

Analysis of Erythropoietin (2 pmol)



Sequence: **A**-P-P-**R**-L-I-C-D-S-R-V-L-E-R-Y-L-L-**E**-A-**K**-E-A-E-N· · · · ·



Cycle 1: row chromatogram, Cycle 4,18,20: differential chromatograms (EPO; CALBIOCHEM® cat#329871, Human, Recombinant)

Сборка белковой молекулы

- 1. Используют результаты секвенирования для двух гидролизатов одного образца белка (напр., трипсин и химотрипсин). Способы гидролиза подбирают так, чтобы получались перекрывающиеся пептиды (хотя бы по два АК с каждой стороны).
- 2. Результаты сопоставляют; иногда для второго гидролиза устанавливать полную структуру пептидов необязательно, достаточно АК-состав, N-концевые АК, электрофоретическая подвижность (длина).

Современные модели белковых секвераторов



Определение С-концевой последовательности пептидов

- **1. Химические методы**
 - расщепление тиоцианатом
 - расщепление цианамидом
- **2. Ферментативный метод**
 - расщепление карбоксипептидазами

Химические методы отщепления С-концевых АК

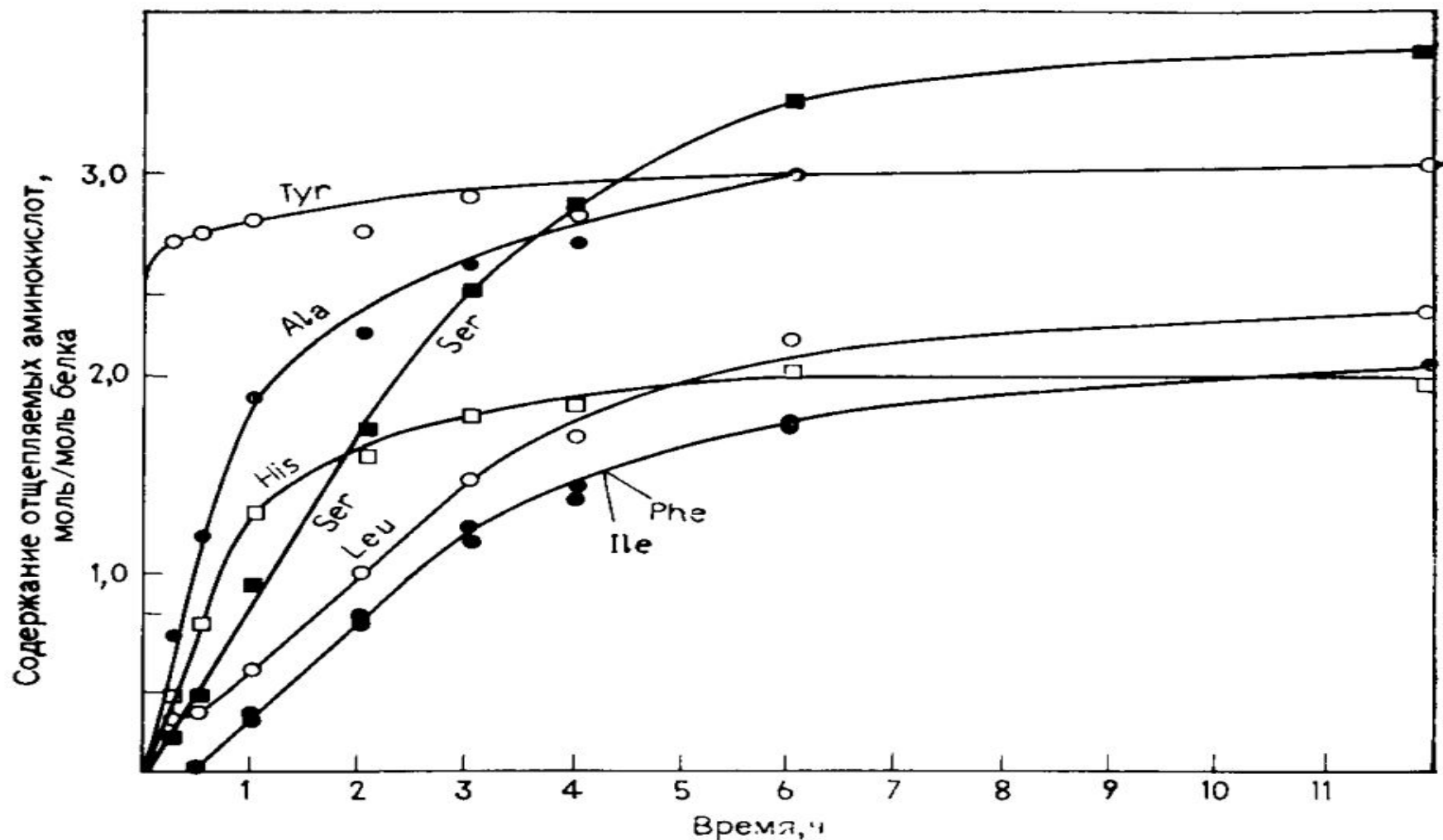
- Сходны с методом Эдмана, только связывание происходит с С-конца пептида. В ходе реакции образуется укороченный пептид (n-1) и производное АК, которое детектируется хроматографически.
- **Недостатки:**
 - 1). Определяется только несколько АК с конца
 - 2). Методики не автоматизированы

Карбоксипептидазы

- 1). Пептид расщепляется карбоксипептидазой (-ами).
- 2). Отбираются аликвоты гидролизата через разные промежутки времени
- 3). Количественный анализ АК в каждой аликвоте (хроматография)
- 4). Построения кривой зависимости содержания АК от времени, её анализ

Основные карбоксипептидазы

Фермент	Быстро отщепляемые АК	Медленно отщепляемые АК



- Обработка: карбоксипептидаза А
- Предположение: HO-Tyr-Ala-His-Ser-Leu-Ile-Phe-Ser-NH₂
- Истина: HO-Tyr-Ala-His-Asn-Ser-Ile-Phe-Leu-Ser-NH₂
- Объяснение: Asn=Ser (пик один), [Phe]=[Ile]=[Leu], v[Phe]>v[Ile]

Карбоксипептидазный метод

- **Недостатки:**
- 1). Определяется только несколько АК с конца (3-4)
- 2). Методики не автоматизированы
- 3). Необходимость очищать препараты
карбоксипептидаз (от эндопротеаз, АК)
- 4). Пики хроматограмм для некоторых АК неразличимы
(Asn, Gln, Ser)