Protein Challenges

- Large molecules
  - Very hard to be synthesized chemically
- Complicated purification processes
  - More than one method is usually used to purify proteins
  - Loss or denaturation of many proteins during the process
- Complicated detection methods
  - Should take care of conformation change during processing
- Unstable:
  - Held by weak forces
  - Easily destroyed *in vitro* and *in vivo*
- Difficult to formulate for large scale purposes
  - Reproducibility is a challenge
- Mostly delivered parenterally
  - Contamination is a serious issue
  - Difficult to protect from proteases when given orally

SPECIAL TOPICS IN BIOPHARMACEUTICALS

PROTEIN PURIFICATION

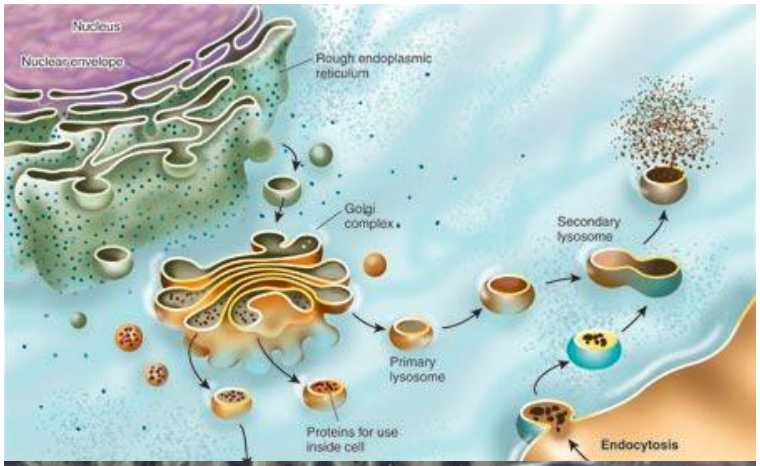
يمكن لمستحضرات البروتينات أن تحتوي على العديد من الملوثات contaminants والتي يمكن تقسيمها إلى ملوثات خاصة بالخلايا المضيفة، وملوثات خاصّة بالمنتج، وملوثات متعلّقة بعمليتي التحضير والتنقية

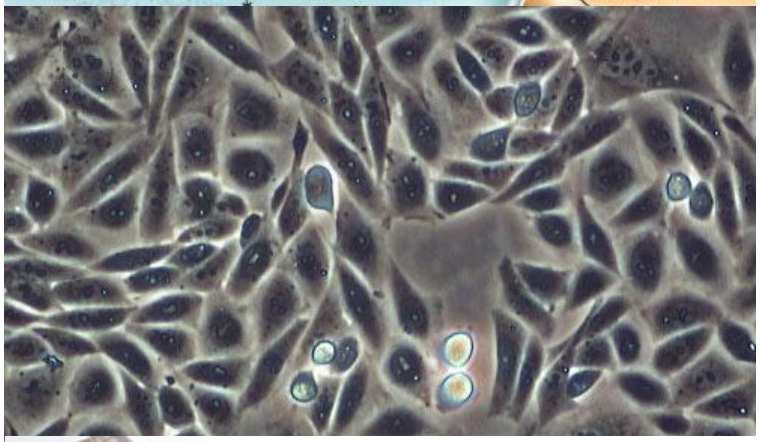
Host Related	Product Related	Process Related
Viruses, Bacteria	Aminoacid substitution or deletion	Growth medium components
Host-derived proteins and DNA	Denatured protein	Purification reagents
Glycosylation variants	Conformational isomer	Metals
N- and C-terminal variants	Dimers and aggregates	Column materials
Endotoxin	Disulfied pairing variants	
	Protein fragments	

أهم طرق تنقية البروتينات Methods of Protein Purification

1. طحن/سحق الخلايا Grinding of cells والتنبيذ التفاضلي Differential Centrifugation
2. الترسيب بالملح Salting out والترسيب بالمحل Solvent Precipitation
3. الاستشراب على العمود Column Chromatography
    1. الاستشراب باستبعاد الحجم (Gel Chromatography) Size Exclusion Chromatography (SEC)
    2. الاستشراب المبادل للشوارد Ion Exchange Chromatography (IEC)
    3. الاستشراب بالإلفة Affinity Chromatography (AC)
        - الارتباط بالضد أو باللجين
        - الارتباط بضد البروتين المندمج
4. طرق أخرى
    1. التبئير متساوي الشحنة (البأر متساوي التكهرب) Iso Electric Focusing (IEF)
    2. الرحلان الكهربائي ثنائي الأبعاد 2D Gel Electrophoresis

ملاحظة: غالباً ما نحتاج إلى تطبيق أكثر من طريقة لتنقية البروتين موضع الاهتمام





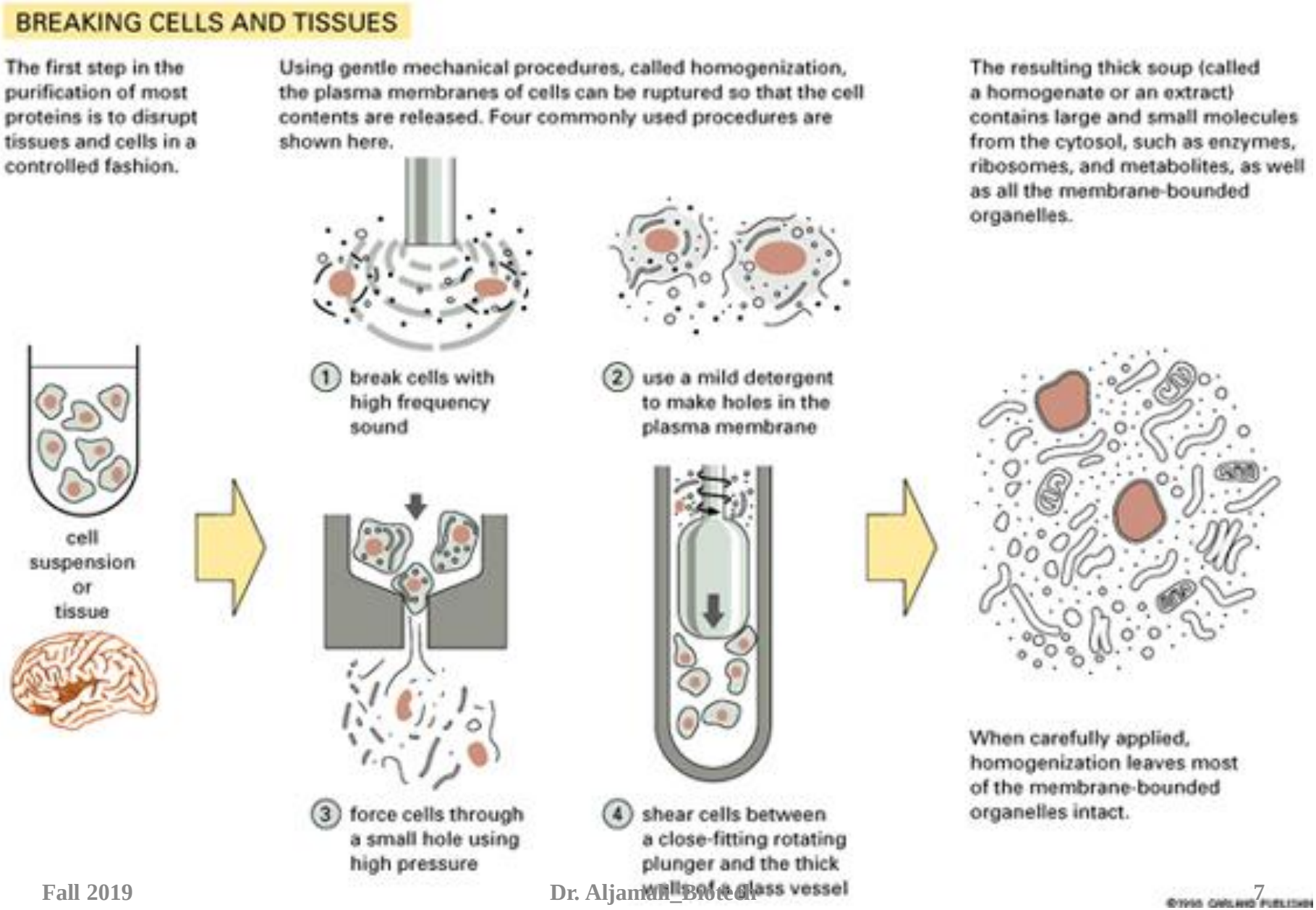
تعتمد طرق تنقية البروتين على كون البروتين مفرزاً خارج الخلايا أو بروتين داخل الخلايا، حرّاً أو مرتبطاً بالأغشية الخلوية

- إذا كان البروتين مفرزاً (خارج الخلايا) يمكن جمع السائل الطافي حول الخلايا والشروع بعمليات تنقية البروتين.
- إذا كان البروتين داخل الخلايا تكون هناك حاجة لتحطيم جدار الخلية والقيام على الأغلب بعملية التنبيذ التفاضلي لفصل مكونات الخلايا والحصول على السيتوبلازما الخلوية الحاوية على البروتين الحر (المنحل في السيتوبلازما).
- أما إذا كان البروتين غشائياً فيمكن تحريره باستعمال عوامل التوتر السطحي أو أنزيمات وتراكيز ملحية مختلفة.

يمكن تحطيم الخلايا بأحد الطرق التالية

- تحطيم الجدر الخلوية بطرق فيزيائية gridding
  - بالطحن grinding
  - عبر تمرير الخلايا بوجود ضغط عبر مسامات دقيقة (سيرنغات ذات رؤوس مختلفة الأحجام)
- استخدام تواترات لأمواج فوق صوتية Ultrasound frequencies (ultrasonication)
- استخدام عوامل فعالة على السطح تفكك طبقة الغشاء البلازمي
- دورات من التجميد والإذابة Freeze-thaw cycles

خطوات تحطيم الخلايا لاستخلاص البروتين داخل الخلوي



Cell Fractionation, and Differential Centrifugation

Grind cells

Centrifuge @ 600 g

Then centrifuge longer @ 15,000 g

Then centrifuge even longer @ 100,000 g

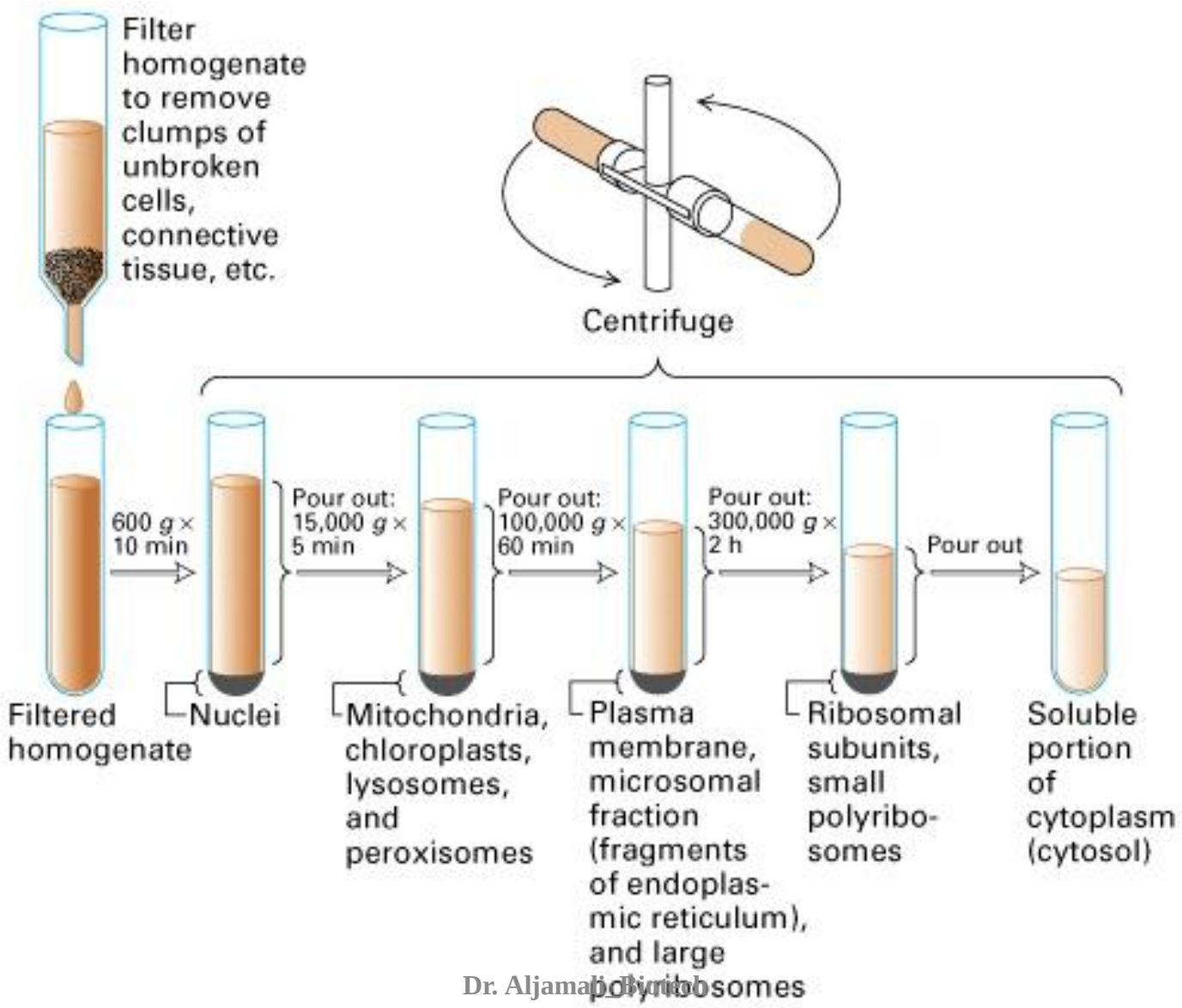
Sediment contains nuclei

Sediment contains mitochondria, lysosomes

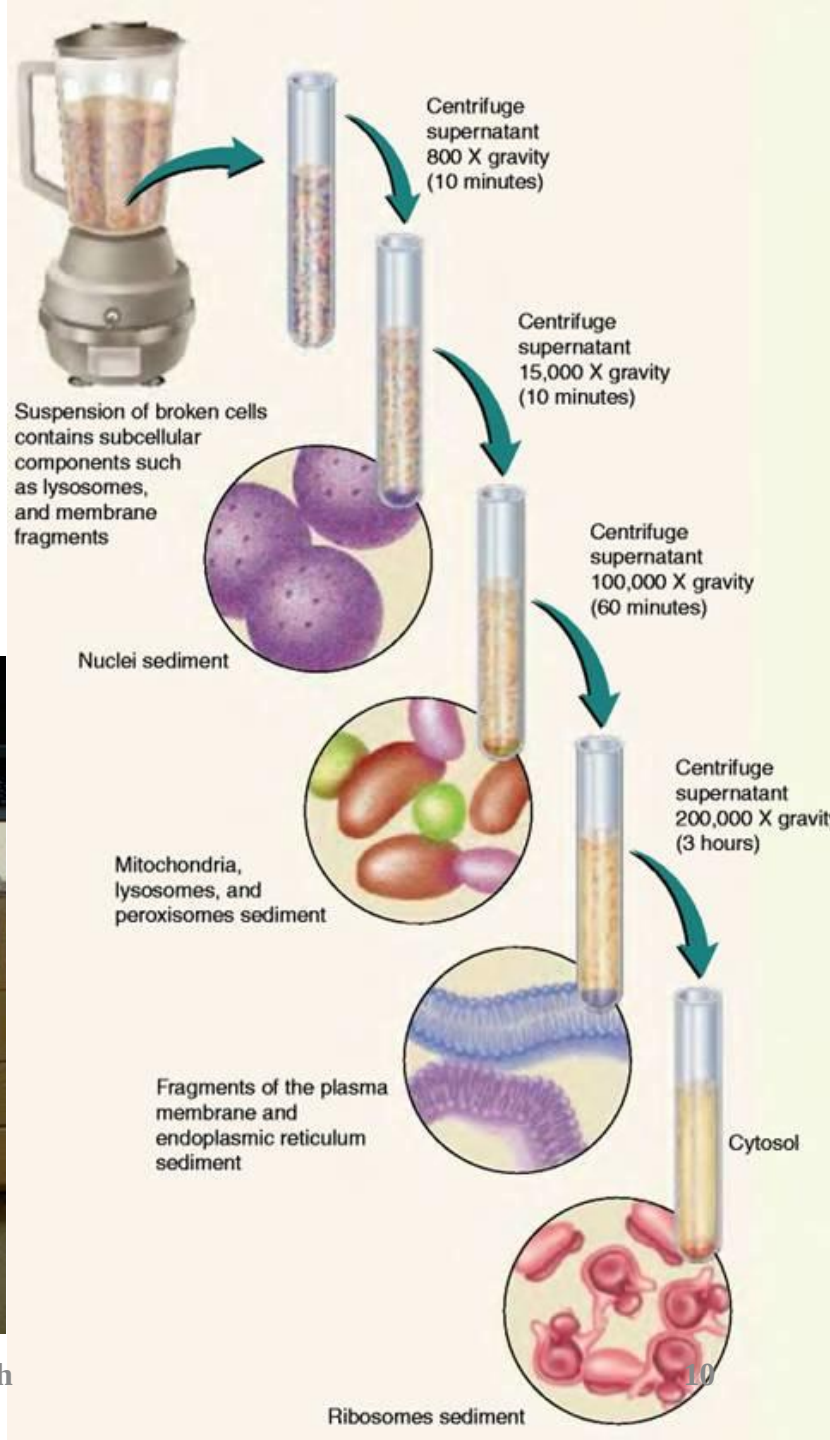
Sediment contains ribosomes, ER

Soluble portion of cytoplasm. No sediment

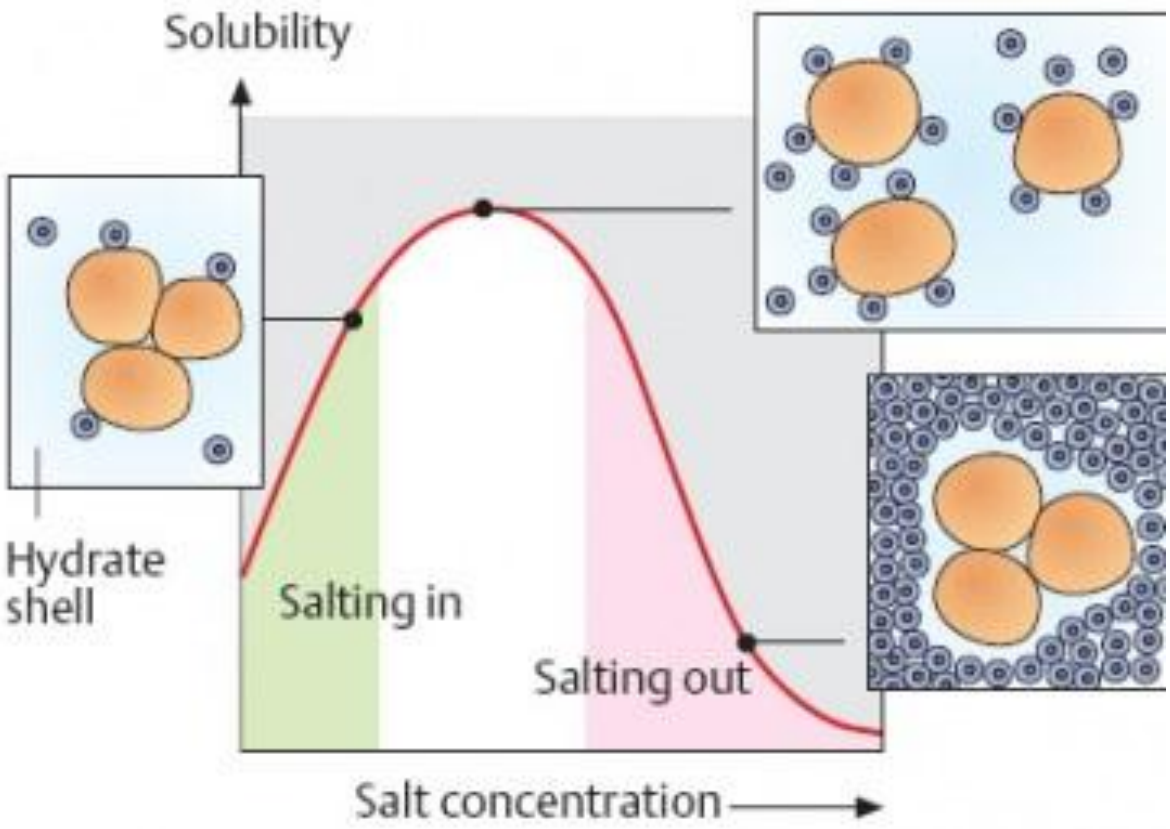
يفصل التنبيذ التفاضلي Differential Centrifugation مكونات الخلية تبعاً لحجمها وكتلتها وكثافتها



يحتاج التنبيذ التفاضلي إلى التنبيذ العادي والتنبيذ الفائق ultracentrifugation



Ammonium Sulfate Precipitation الترسيب بسلفات الأمونيوم

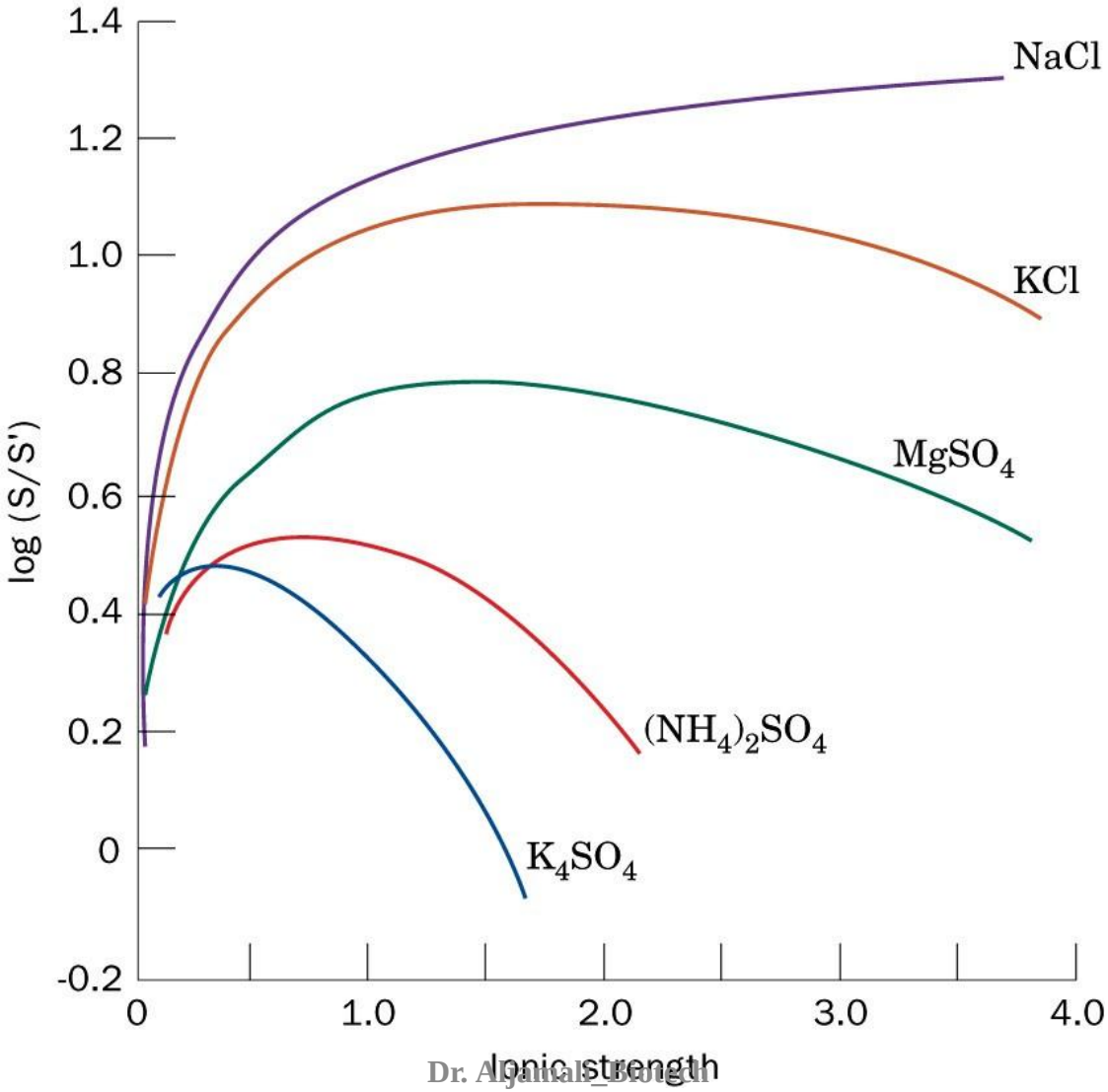


- يعتمد الترسيب بالأملاح على إضافة تركيز عالٍ جداً من الشوارد بحيث يتحول البروتين من الشكل المنحل إلى المترسب وهو ما يسمى بالترسيب بالملح salting out

الترسيب بالملح Salting Out

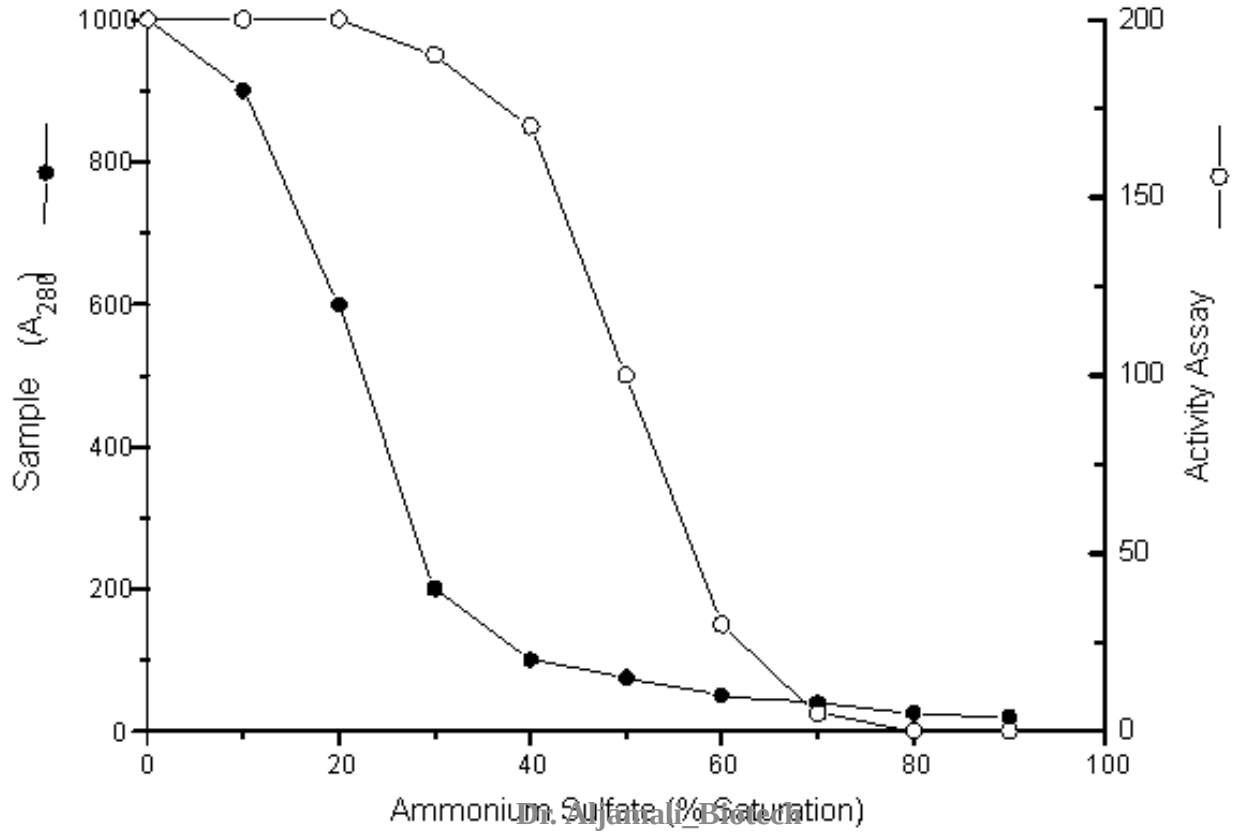
- تعدّ طريقة الترسيب بالملح من أكثر الطرق استخداماً في تنقية البروتين وتجري عادة مع التبريد لمنع تمسّخ البروتينات..
- وعبر تعديل تركيز الملح المستخدم في المحلول الحاوي على خليط من البروتينات إلى النقطة التي تسبق تماماً التركيز الذي يترسّب عنده البروتين المرغوب تنقيته، يمكن بذلك التخلص من العديد من البروتينات التي تشوب محلول البروتين.
- يمكن بعدها جمع وإزالة الراسب (الحاوي على البروتينات الأخرى) عبر الترشيح filtration أو التنبيذ، وعندها يمكن زيادة تركيز الملح لترسيب البروتين المرغوب نفسه.
- يعدّ ملح سلفات الأمونيوم من أكثر الأملاح شيوعاً حيث يملك خاصتين رئيستين هما:
  - انحلالية عالية (تصل حتى 3.9 مول/ل في الماء بالدرجة 0 مئوية)
  - قوة شاردية عالية في المحلول (تصل إلى 23.5 في الماء بالدرجة 0 مئوية)
- يجب الانتباه إلى أنه يمكن لشوارد أخرى مثل Ba^{+} I^{-}, Li^{+}, Mg_2^{+}, Ca_2^{+} and أن تزيد من انحلال البروتينات بدلاً أن تنقصه كما يمكن أن تؤدي إلى تمسّخ البروتينات.

مثال 1: انحلالية كربوكسي هيموغلوبين (عند درجة pH معيّنة) وبتأثير القوة الشاردية لأملاح مختلفة

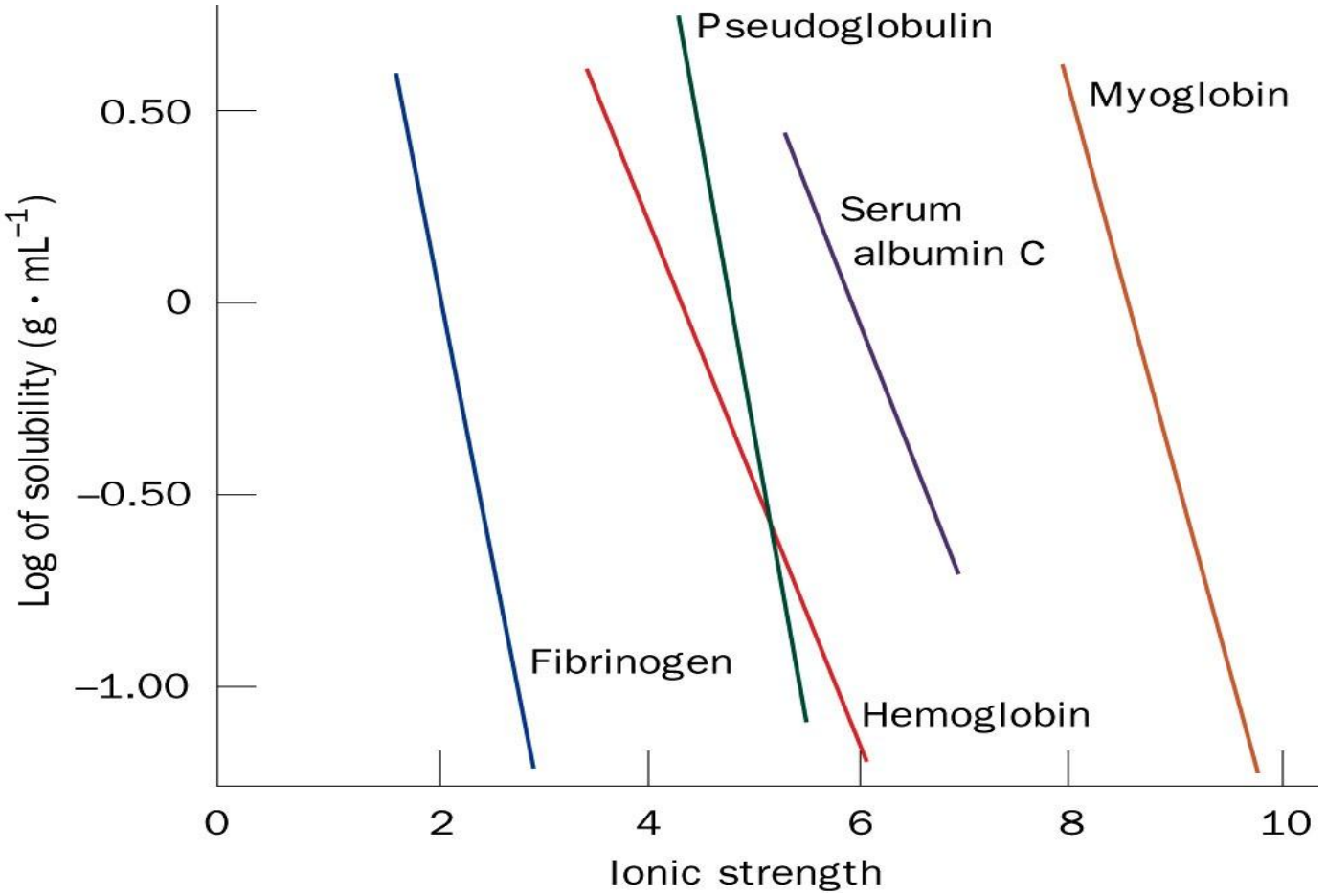


مثال 2: ويبيّن قدرة فصل البروتين المرغوب تنقيته عن باقي البروتينات المنحلة عند زيادة تركيز سلفات الأمونيوم

Ammonium Sulfate (% saturated)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Sample A_{280}	1000	900	600	300	100	75	50	40	25	20
Activity assay (units)	200	200	200	190	170	100	30	5	0	0



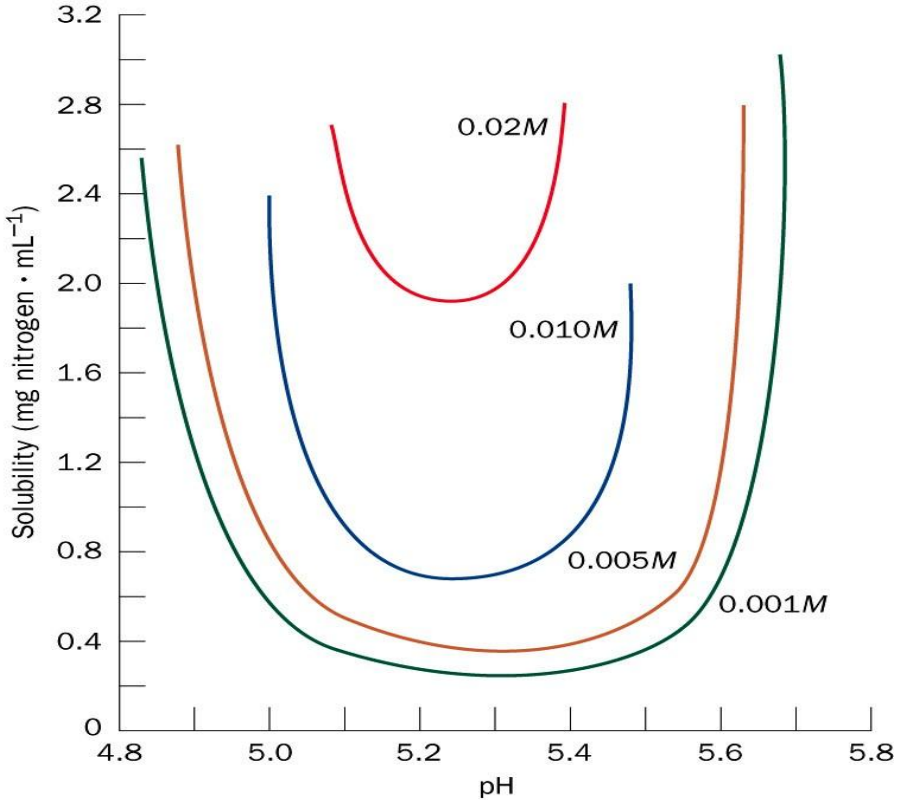
مثال 3: انحلالية العديد من البروتينات في محاليل سلفات الأمونيوم



الترسيب بالمحل (أو بالطور العضوي) Solvent precipitation

- يمكن للمحلّات العضوية المختلطة بالماء (كالأستون والإيتانول) أيضاً أن ترسّب البروتين.
- وبسبب امتلاك هذه المحلّات ثابتات ثنائية التكهرب منخفضة low dielectric constants فهي تخفض القوة الانحلالية لمحاليلها المائية الحاوية على الشوارد المنحلّة.
- تستخدم هذه الطريقة أيضاً عند درجات حرارة منخفضة (غالباً 0 درجة مئوية) بسبب كون المحل يتبخّر عند درجات عالية.
- يمكن لهذه الطريقة أن تزيد من الفائدة من طرق الترسيب بالملح (أي نستخدم الطريقتين معاً)
- ملاحظة: بعض المحلات العضوية المختلطة بالماء مثل (DMF و DMSO) تكون جيّدة في تعظيم انحلالية البروتينات (بسبب امتلاكها ثابتات ثنائية التكهرب عالية)

ملاحظة هامّة

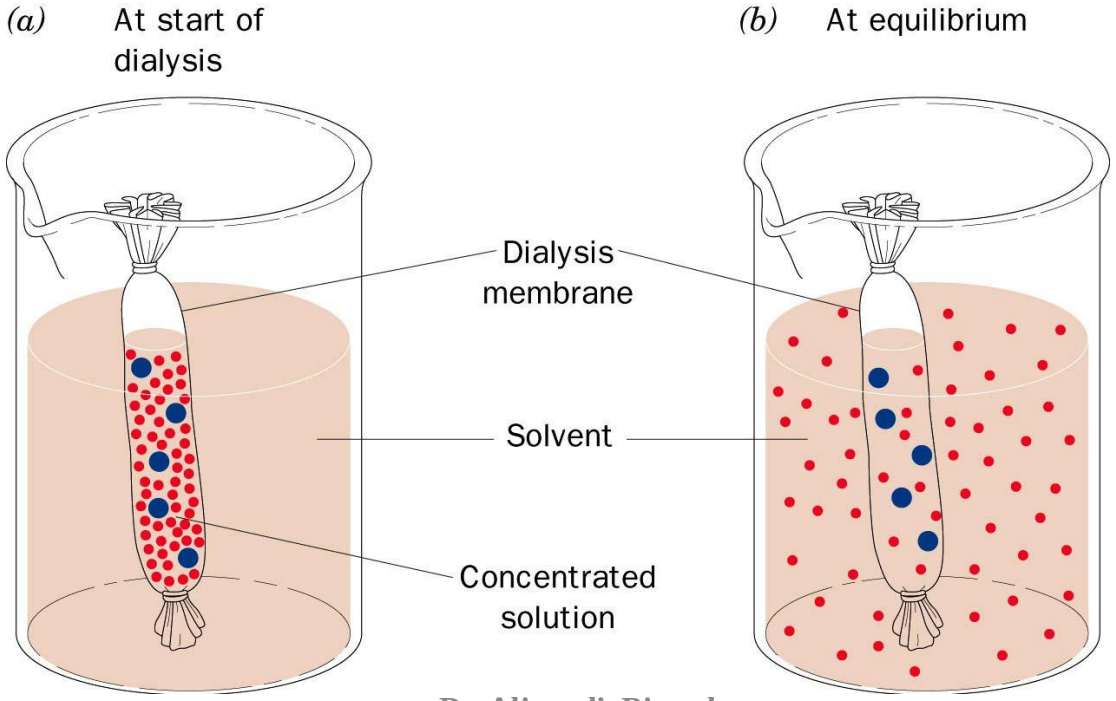


Solubility of β-lactoglobin as a function of pH at several (rather low) NaCl concentrations.

- تمتلك معظم البروتينات مجموعات متشردة عديدة لها درجات تشرد حمض/أساس مختلفة pKs.
- وتدعى النقطة التي تتساوى عندها جميع الشحنات الموجبة والسالبة للجزيء في درجة pH محددة بنقطة تساوي الشحنة isoelectrical point (PI)، ولا يملك عندها البروتين أي شحنة ويكون غير قابل للحركة نحو أي من القطبين السالب أو الموجب إذا ما تعرّض محلول البروتين إلى حقل كهربائي.
- وهكّذا، فإن انحلالية البروتين تتأثّر بتغيرات الباهاء pH كما يبدو في الشكل المقابل.

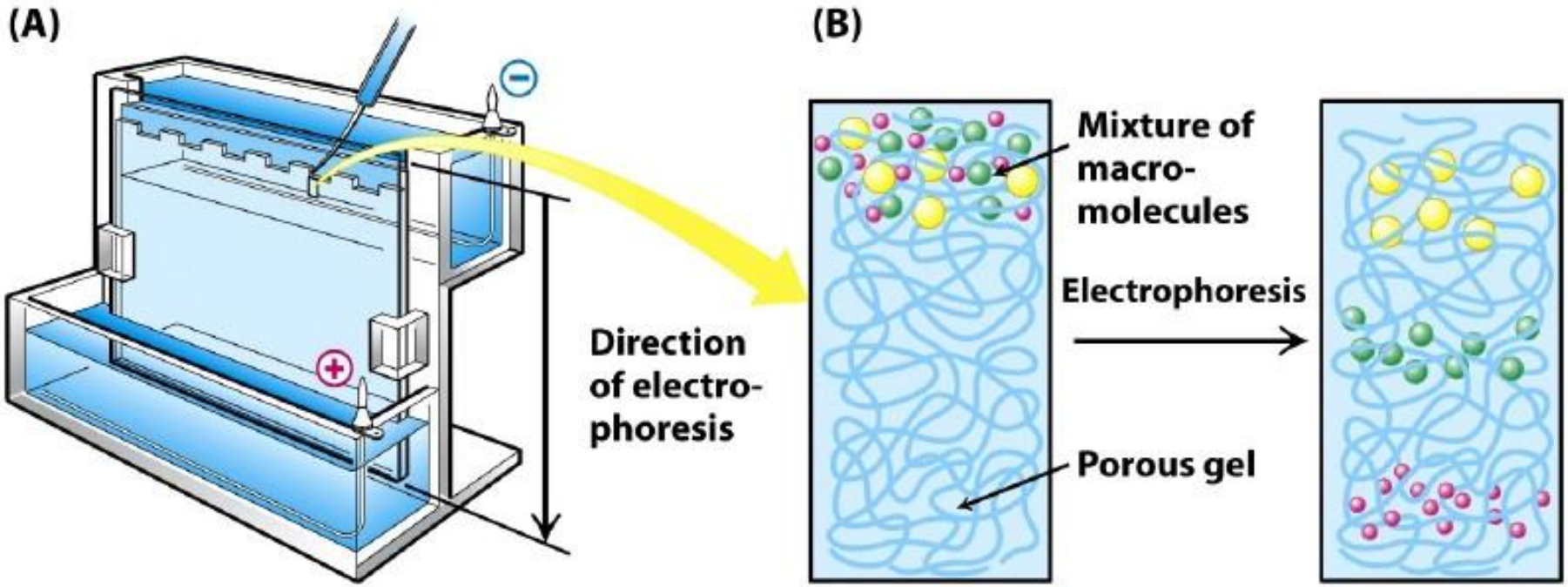
التّحال Dialysis

- يستخدم التّحال لإزالة الكم الأكبر من الأملاح، خاصّة تلك التي استخدمت خلال عملية ترسيب البروتين
- يعتمد التّحال على مبدأ الحلول osmosis حيث تنتقل جزيئات/شوارد الملح من التركيز الأعلى إلى التركيز الأدنى عبر طرفي غشاء نصف نفوذ. ويتم تبديل وسط التّحال عدة مرات إلى أن نتخلّص من معظم الأملاح المشوبة للبروتينات

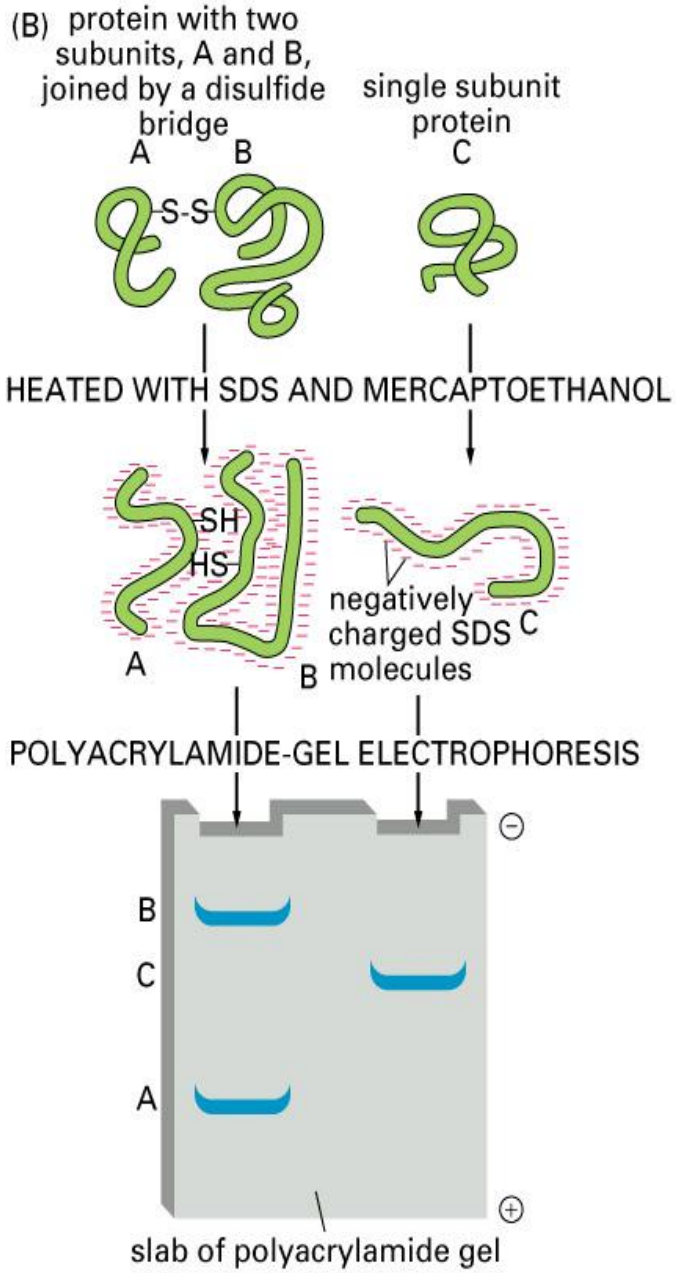


الرحلان الكهربائي للبروتينات على هلامة البولي أكريل أميد
Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

- يفصل الرحلان الكهربائي العمودي vertical باستخدام هلامة البولي أكريل أميد البروتينات بناءً على حجم size وشحنة charge البروتينات واللذان يسببان حركة البروتين إلى القطب الموجب أو السالب، حيث ترحل البروتينات الصغيرة بشكل أسرع من البروتينات الكبيرة كما ترحل البروتينات ذات الشحنة الموجبة أسرع من السالبة.



SDS PAGE



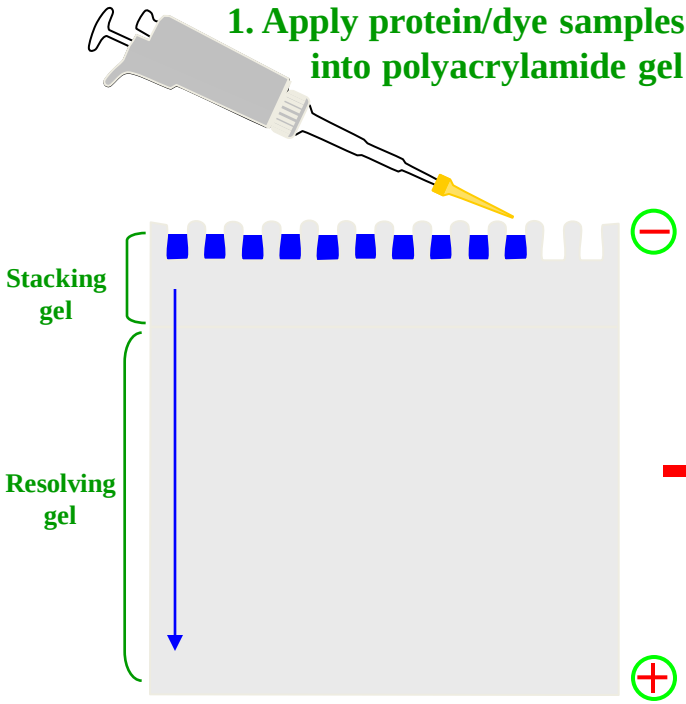
- تستخدم عادةً مادتي mercaptoehanol (ME) و sodium dodecyl sulfate (SDS) لجعل اتجاه الرحلان لجميع البروتينات نحو القطب الموجب
  - تستخدم مادة ME لتمسخ البروتينات، فهي مادة مرجعة تحطّم الجسور ثنائية الكبريت بين السلاسل عديدة الببتيد المكوّنة للبروتينات وبالتالي تعمل على تمسّخ البروتينات
  - بينما تُضفي مادة SDS شحنة سالبة كلّية على جميع البروتينات مما يجعلها تتجه جميعاً نحو القطب الموجب وبشكل يكون فيه الوزن الجزيئي هو المحدد الوحيد لرحلان البروتين وليس شحنته.
- يمكن تلوين الهلامة بعد الرحلان بأصبغة ترتبط بالبروتينات وتكشف عنها مثل صبغة زرقة الكومازي Coomassie Blue أو التلوين بالفضة silver staining ويكون الأخير أكثر حساسية في الكشف عن البروتينات

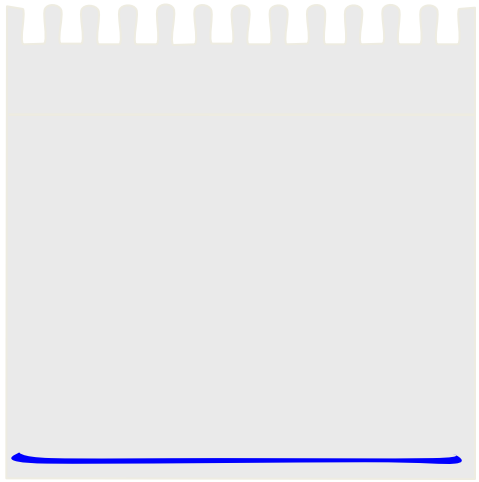
Protein separation using SDS-PAGE

(Laemmli system)

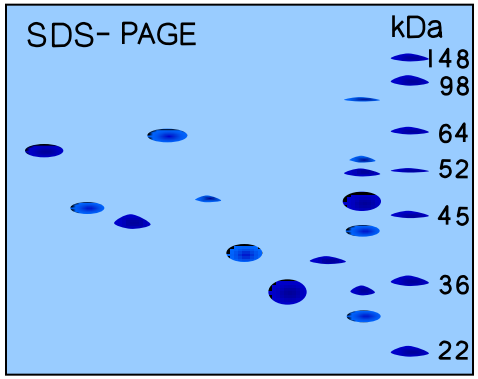
1. Apply protein/dye samples into polyacrylamide gel wells

2. Run the electrophoresis until dye reaches the end of the gel

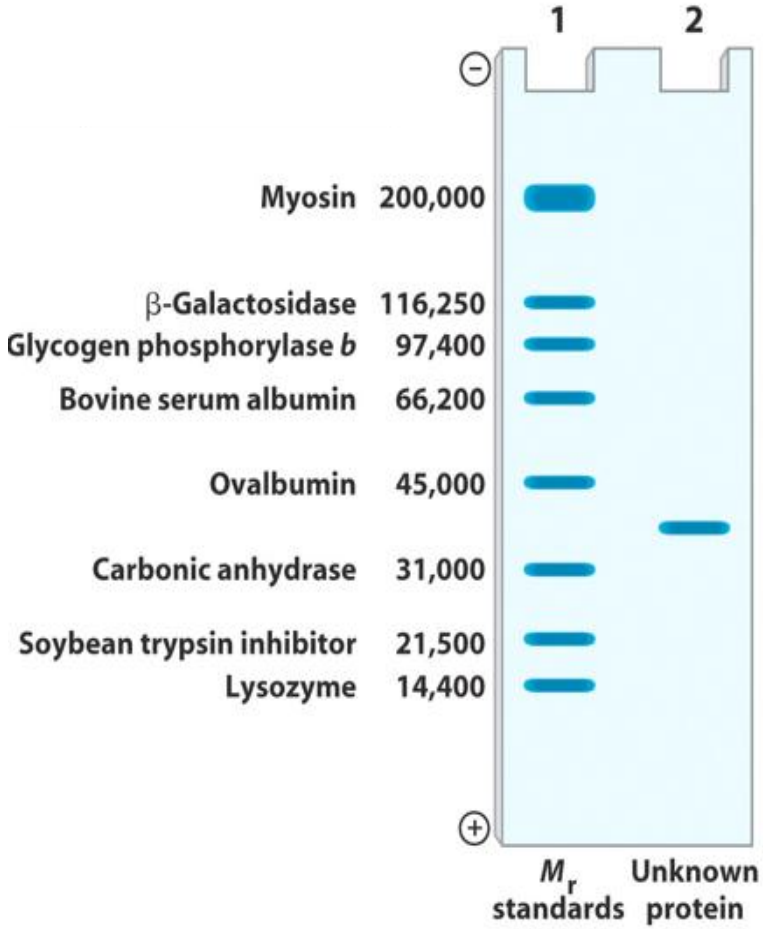


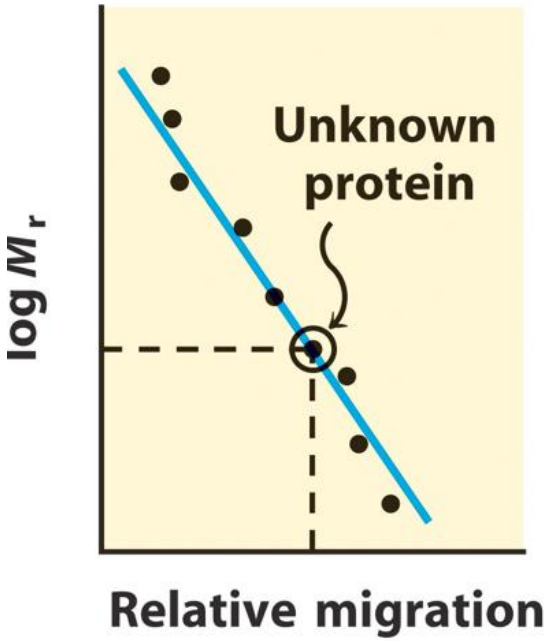


3. Remove the gel from the apparatus and stain for proteins

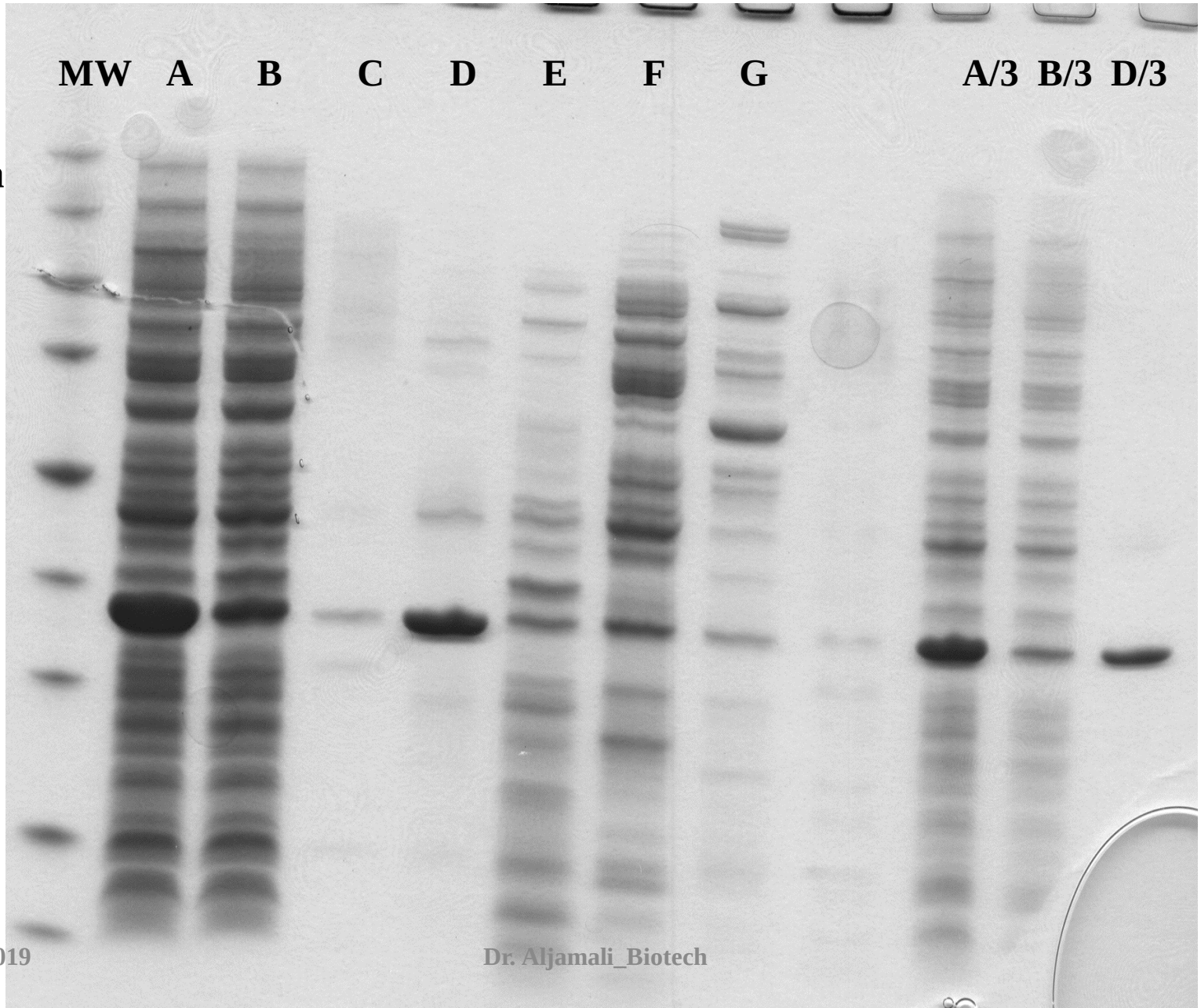


يمكن حساب الوزن الجزيئي للبروتينات بعد الرحلان على SDS PAGE باستخدام عياريات تتألف من بروتينات معروفة الوزن الجزيئي. ويمكن معرفة الوزن الجزيئي للبروتين المرغوب إما مباشرة من الهلامة الملوّنة أو بعد رسم منحني بياني للمسافة التي قطعها كل بروتين معروف الوزن الجزيئي بمقابل وزنه الجزيئي نفسه واستقراء الوزن الجزيئي للبروتين المرغوب





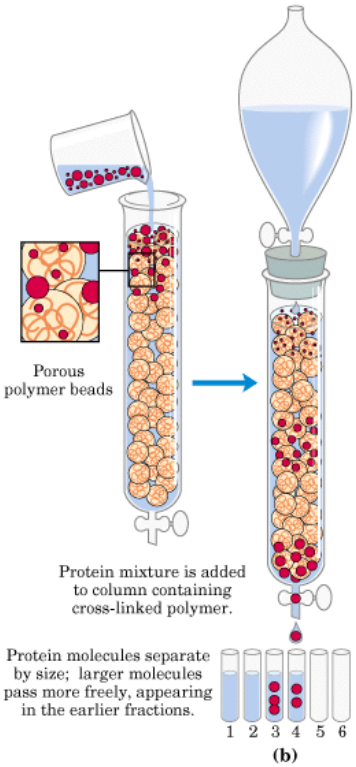
مثال: هلامة ملوّنة بالفضة إثر انتهاء الرحلان الكهربائي لعينات مختلفة من الخلاصات البروتينية

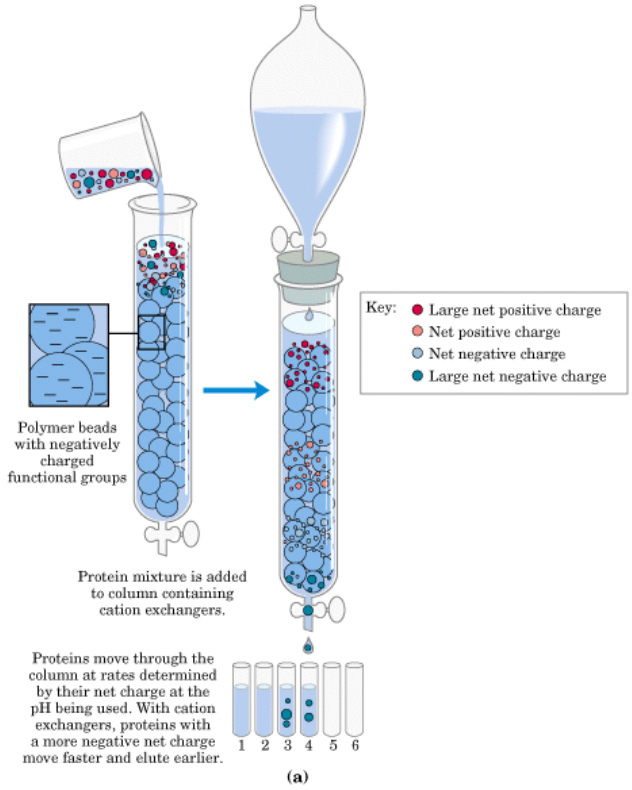


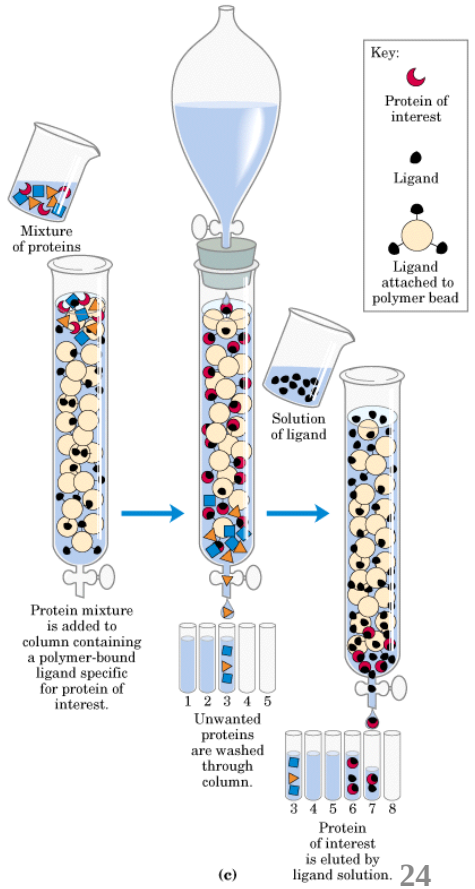
Column Chromatography الاستشراب على العمود

- يعدّ الاستشراب على العمود الطريقة الأفضل لتنقية كميات كبيرة من البروتينات، ويحقّق المستوى الأعلى من النقاوة كما لا يتطلب جهدا كبيراً ويحمي البروتينات من التمسّخ، ويعدّ لذلك كله الطريقة المعيارية في صناعة وتنقية البروتينات الصيدلانية

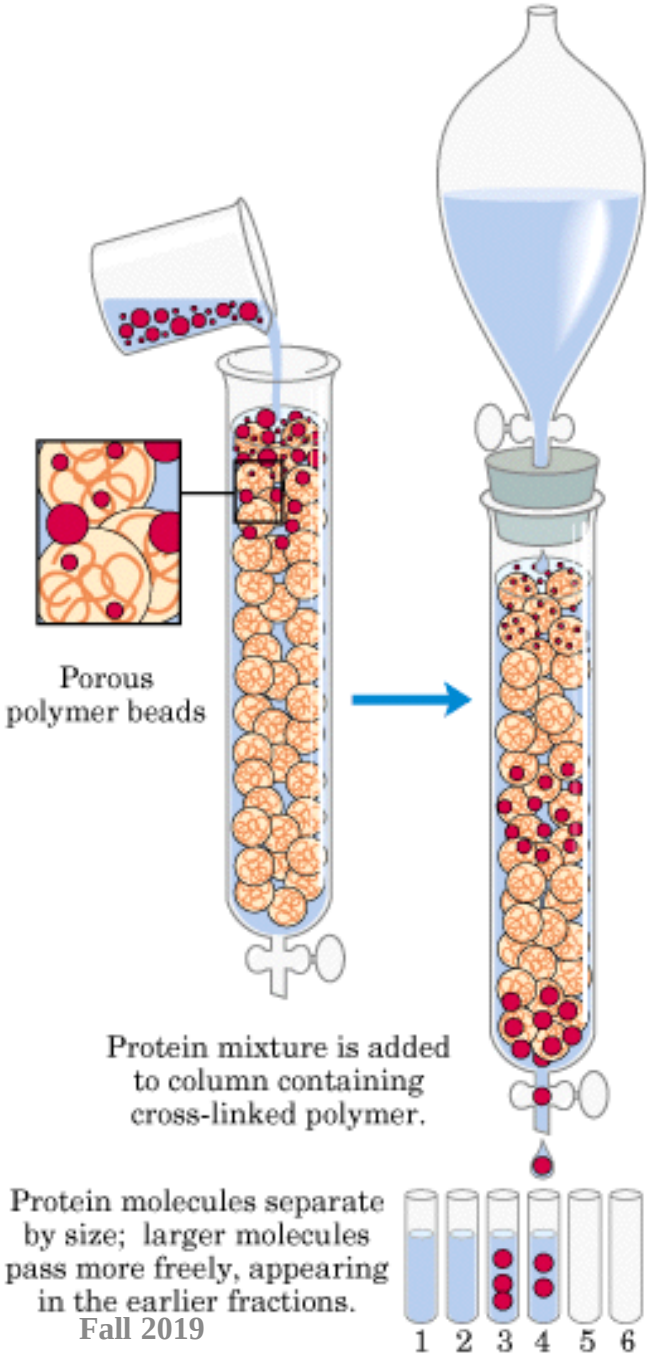
- Gel Filtration
- Ion Exchange
- Affinity





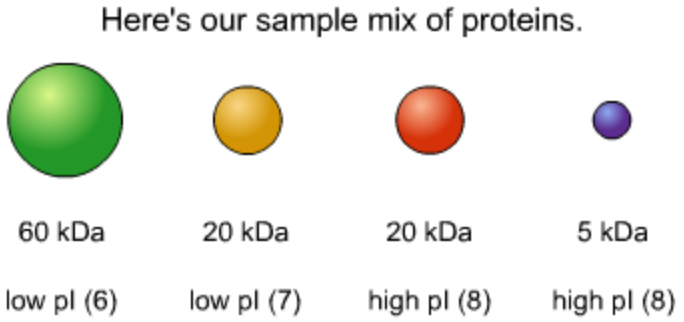


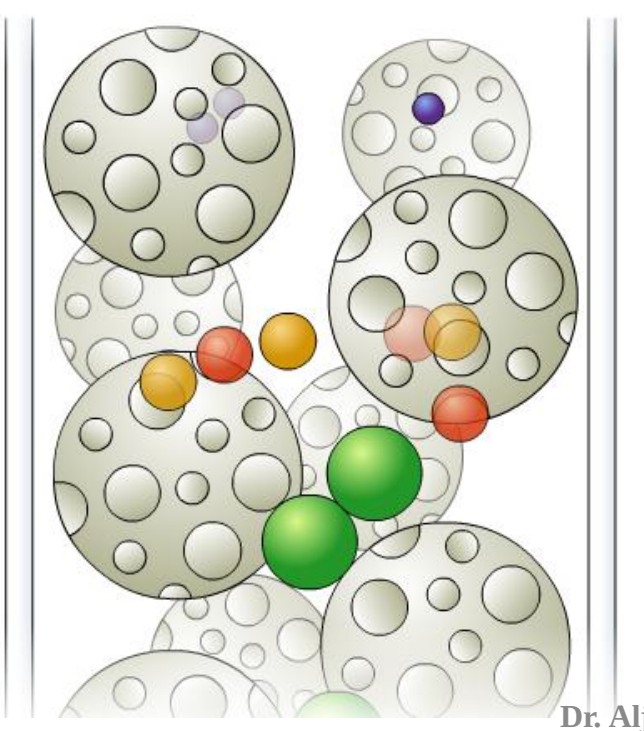
الاستشراب بالاستبعاد SEC أو الاستشراب على الهلامة Gel C

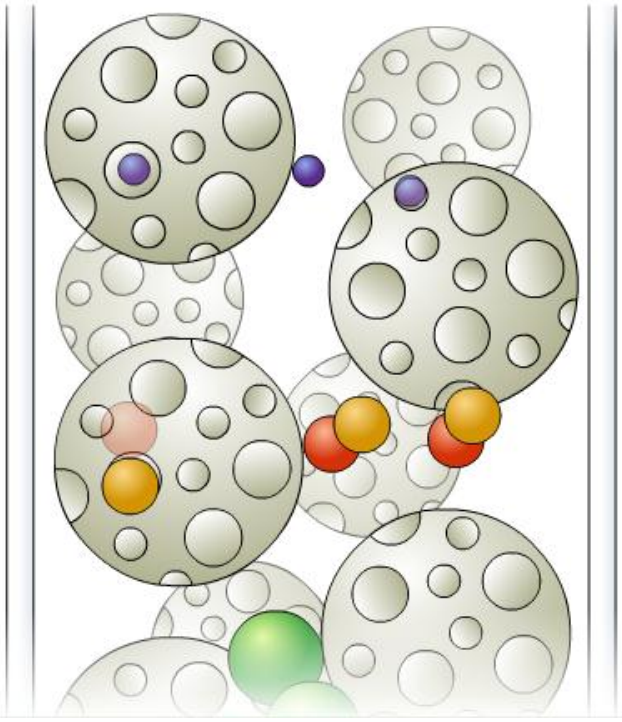


- يتألّف العمود من مواد هلامية بشكل خرزات beads ذات مسامات pores مختلفة الأحجام.
- يطبّق السائل الحاوي على خليط من البروتينات ذات الأوزان الجزيئية المختلفة
- عندما يبدأ السائل بالدخول إلى العمود، يتم قبط البروتينات صغيرة الوزن الجزيئي داخل مسامات العمود بينما يتم استبعاد البروتينات الكبيرة والتي تمرّ عبر العمود بسرعة لتكون بذلك أول البروتينات "المشطوفة" eluted proteins أو الخارجة من العمود.
- وكلما أضفنا كمية من وقاء الشطف buffer elution خرجت كمية مماثلة تحتوي بعض البروتينات الأصغر ثمّ الأصغر إلى أن يخرج كامل البروتين من العمود بعد استخدام كميات كبيرة من وقاء الشطف.
- يمكن قياس الامتصاص على طول موجة 280 نم لتقدير تراكيز البروتينات المشطوفة في الأجزاء المختلفة الناتجة عن شطف العمود، كما يمكن قياس الفعالية البروتينية (الإنزيمية مثلاً) في كل من تلك الأجزاء لتحديد الجزء الحاوي على البروتين المرغوب

Size-exclusion chromatography

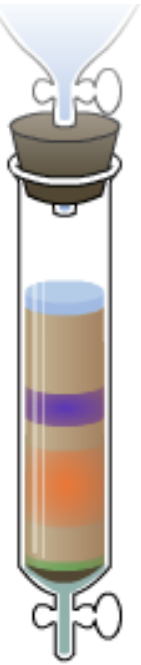


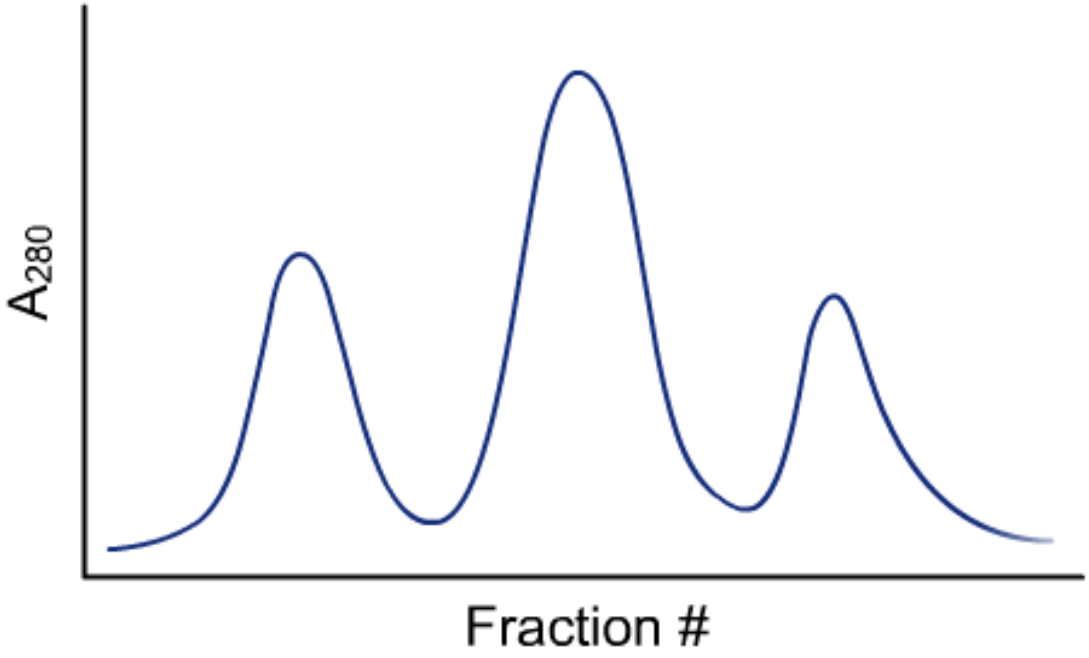


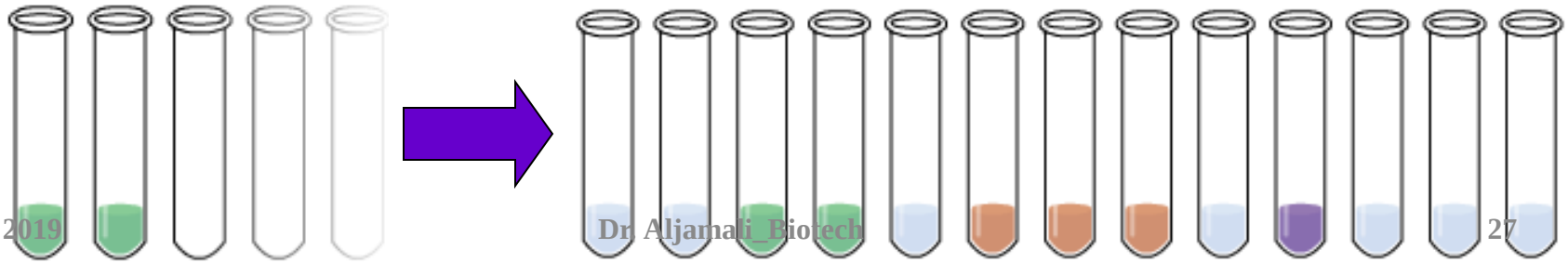


Size-exclusion chromatography

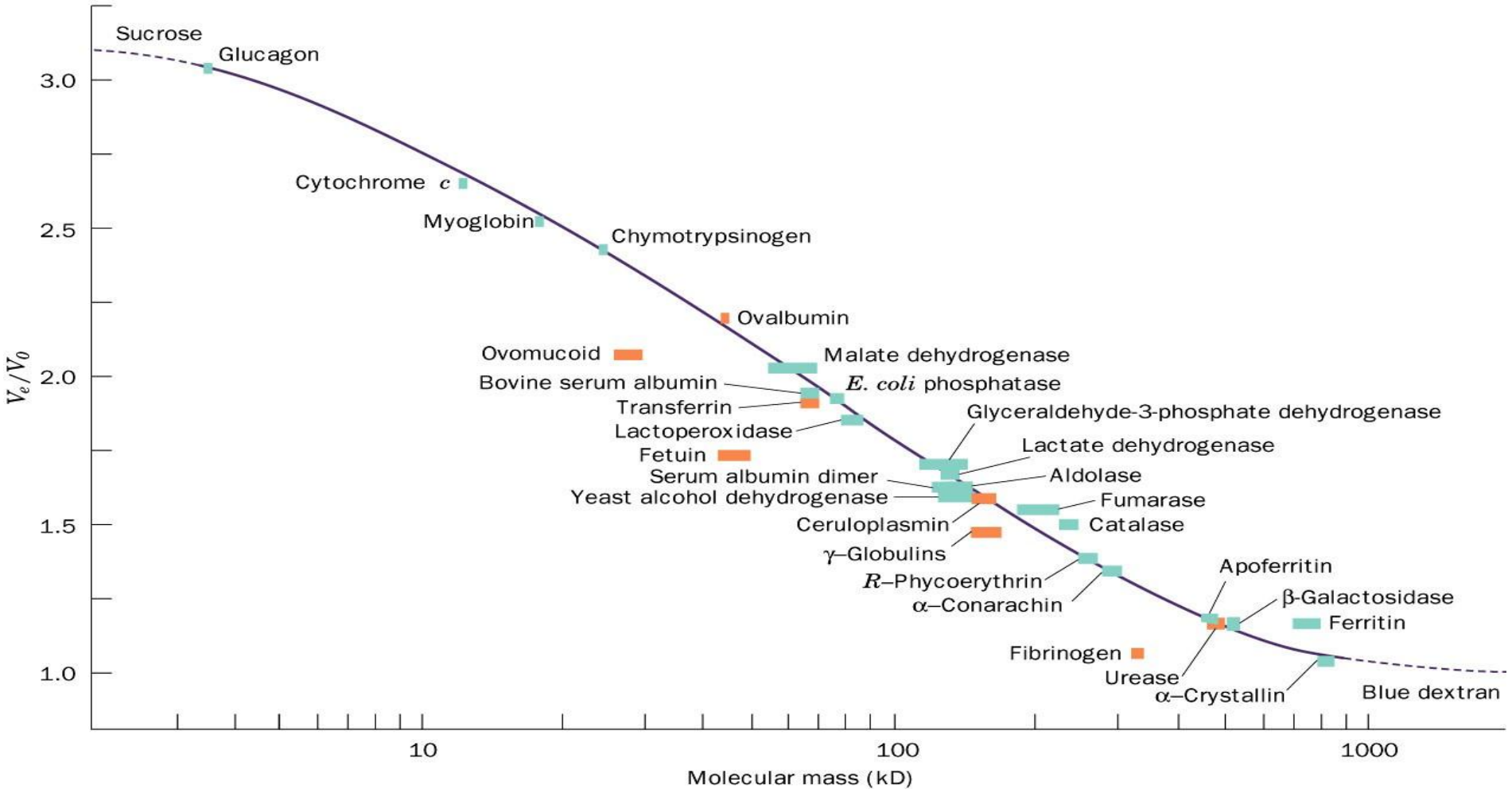
Absorbance at 280 is used to identify protein-containing fractions. You can also perform an enzyme specific assay.







يمكن قياس الوزن الجزيئي عبر قياس نسبة حجم الشطف elution volume (Ve) اللازم لخروج البروتين إلى حجم السائل المحتفظ به ضمن جزيئات العمود نفسه والذي يسمّى بالحجم المفرغ void volume (V0). ويبيّن الشكل التالي تناقص حجم السائل اللازم لشطف بروتينات معيّنة مع ازدياد أوزانها الجزيئية

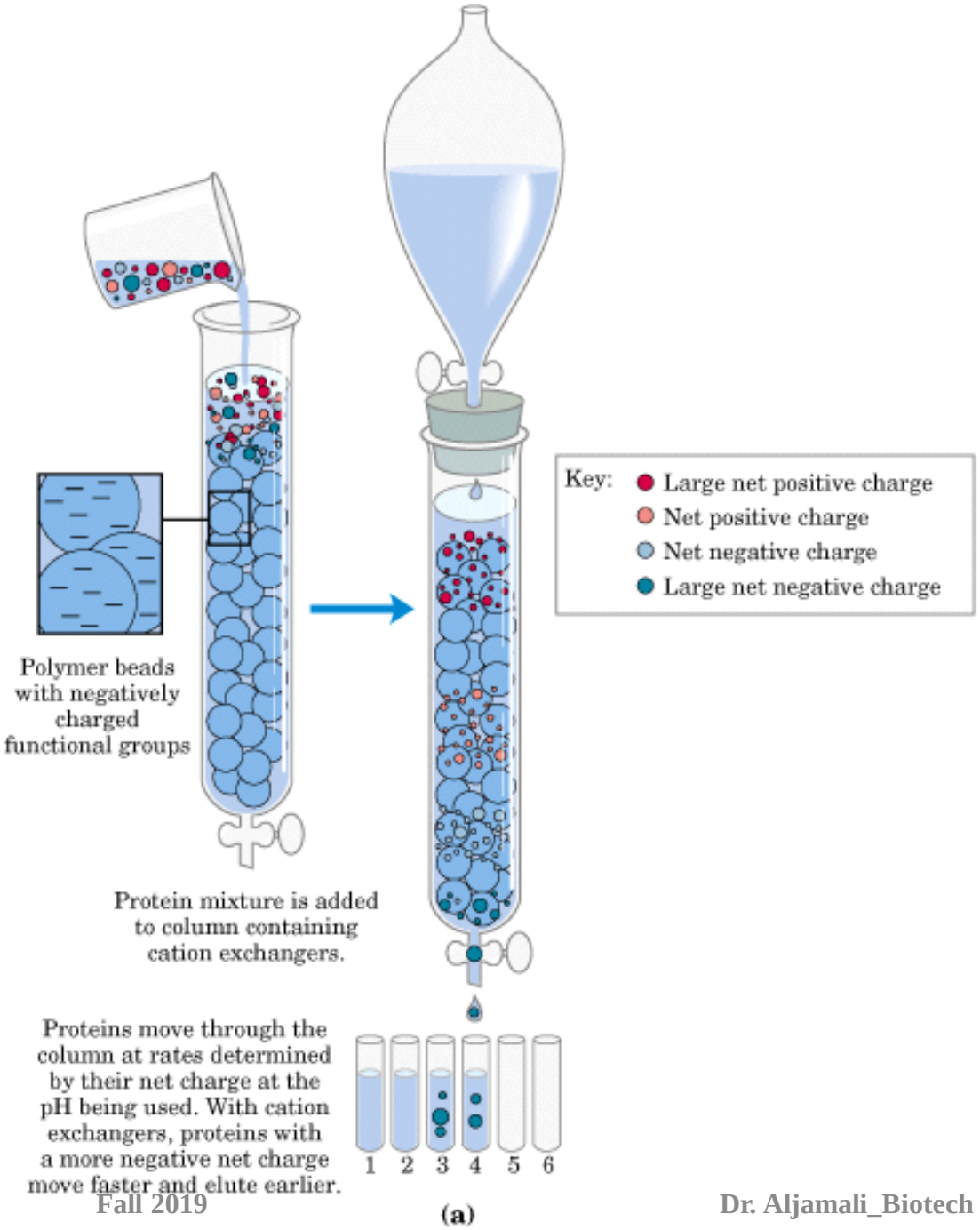


أكثر المواد استخداماً في الاستشراب على الهلامة، وهي بشكل رئيسي أنواع من الدكستران أو البولي أكريل أميد أو الآغاروز تختلف عن بعضها البعض بمجال التجزيء مقدّراً بالكيلو دالتون من الوزن الجزيئي للبروتينات

Name[a]	Type	Fractionation Range (kD)
Sephadex G-10	Dextran	0.05–0.7
Sephadex G-25	Dextran	1–5
Sephadex G-50	Dextran	1–30
Sephadex G-100	Dextran	4–150
Sephadex G-200	Dextran	5–600
Bio-Gel P-2	Polyacrylamide	0.1–1.8
Bio-Gel P-6	Polyacrylamide	1–6
Bio-Gel P-10	Polyacrylamide	1.5–20
Bio-Gel P-30	Polyacrylamide	2.4–40
Bio-Gel P-100	Polyacrylamide	5–100
Bio-Gel P-300	Polyacrylamide	60–400
Sepharose 6B	Agarose	10–4,000
Sepharose 4B	Agarose	60–20,000
Sepharose 2B	Agarose	70–40,000
Bio-Gel A-5	Agarose	10–5000
Bio-Gel A-50	Agarose	100–50,000
Bio-Gel A-150	Agarose	1000–150,000

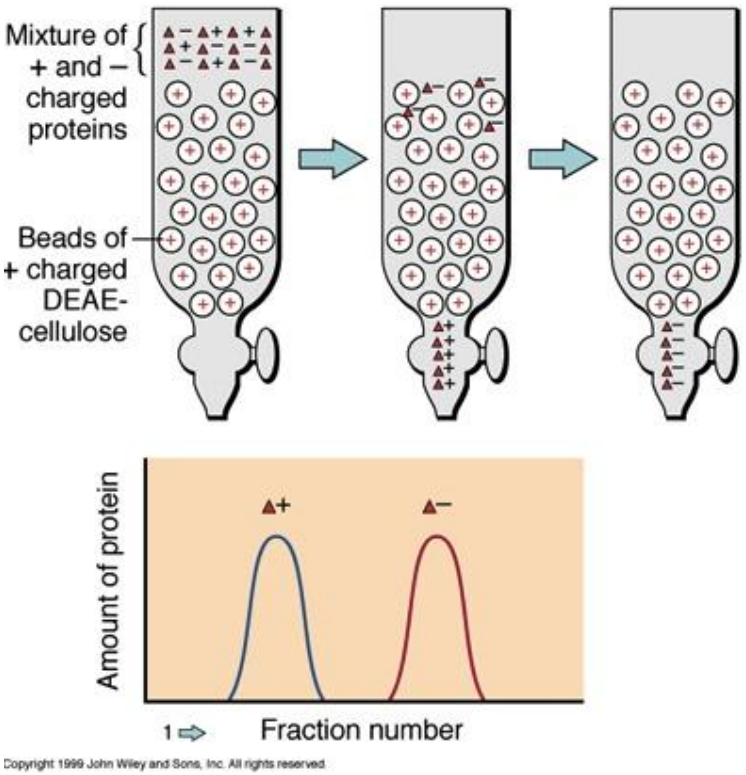
[a]Sephadex and Sepharose gels are products of Amersham Pharmacia Biotech; Bio-Gel gels are manufactured by BioRad Laboratories.

الاستشراب المبادل للشوارد IEC



- يعتمد IEC على فصل البروتينات بناءً على "ادمصاص شحنتها charge adsorption).ويمتلك قدرة الفصل الأعلى بالمقارنة مع طرق الاستشراب الأخرى.

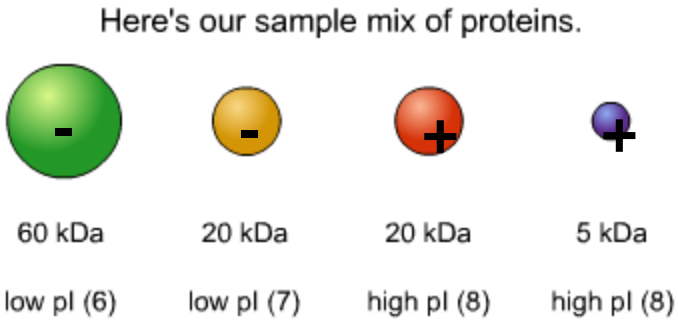
الاستشراب المبادل للشوارد IEC



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

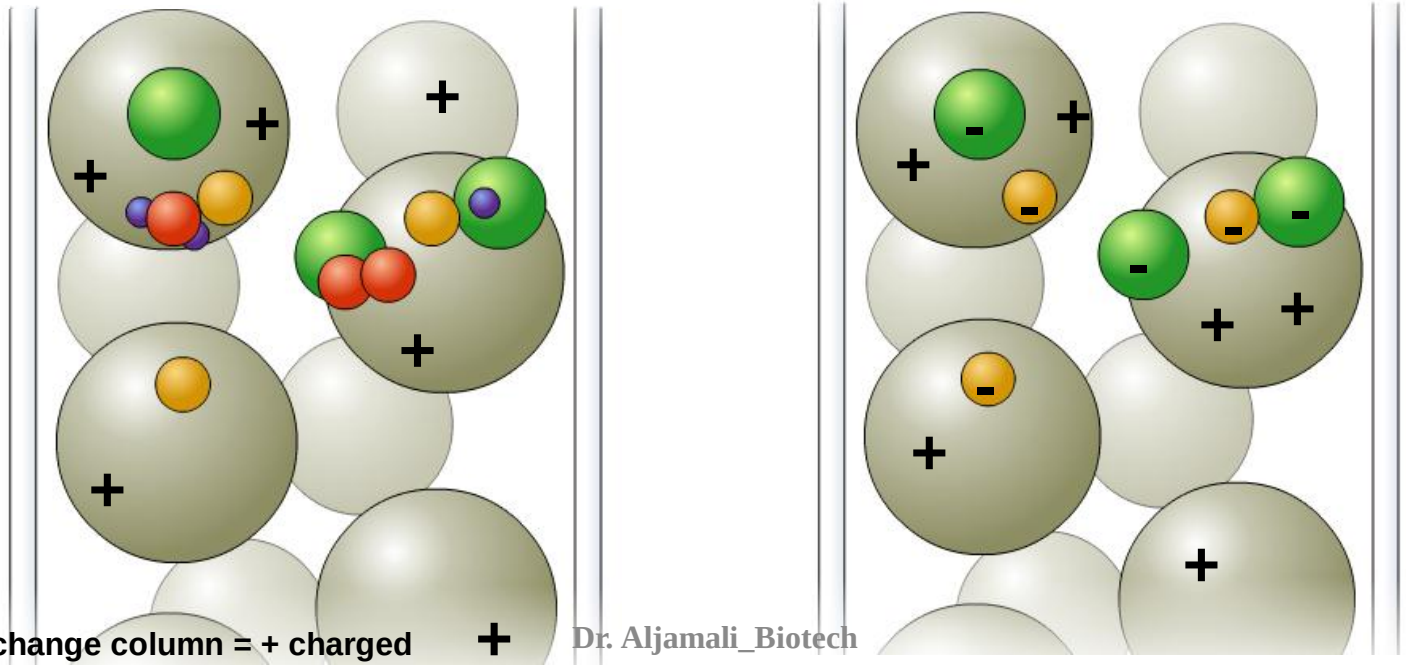
- يتألف العمود المبادل للشوارد من ركازات تحمل شحنات موجبة أو سالبة، بحيث ترتبط البروتينات إلى جزيئات العمود بإلفة مختلفة ترتبط بنوع الشحنة المسيطرة على البروتين عند درجة باهاء محدّدة.
- بعد الارتباط، يتم شطف العمود بوقاء الشطف فتتحرك البروتينات ذات إلفة الارتباط الضعيفة بسرعة أكبر من غيرها خلال العمود وفي طريقها إلى خارجه، بينما تتحرّك تلك البروتينات ذات إلفة الارتباط العالية بصورة بطيئة.
- يمكن شطف البروتينات بتغيير وقاء الشطف إلى وقاء يحتوي تركيزاً ملحياً عالياً أو بتغيير درجة الباهاء (يمكن أن يتم ذلك عبر تغيير متقطّع stepwise أو متواصل بشكل مدروج من التراكيز الملحية المتزايدة)

Ion-Exchange chromatography



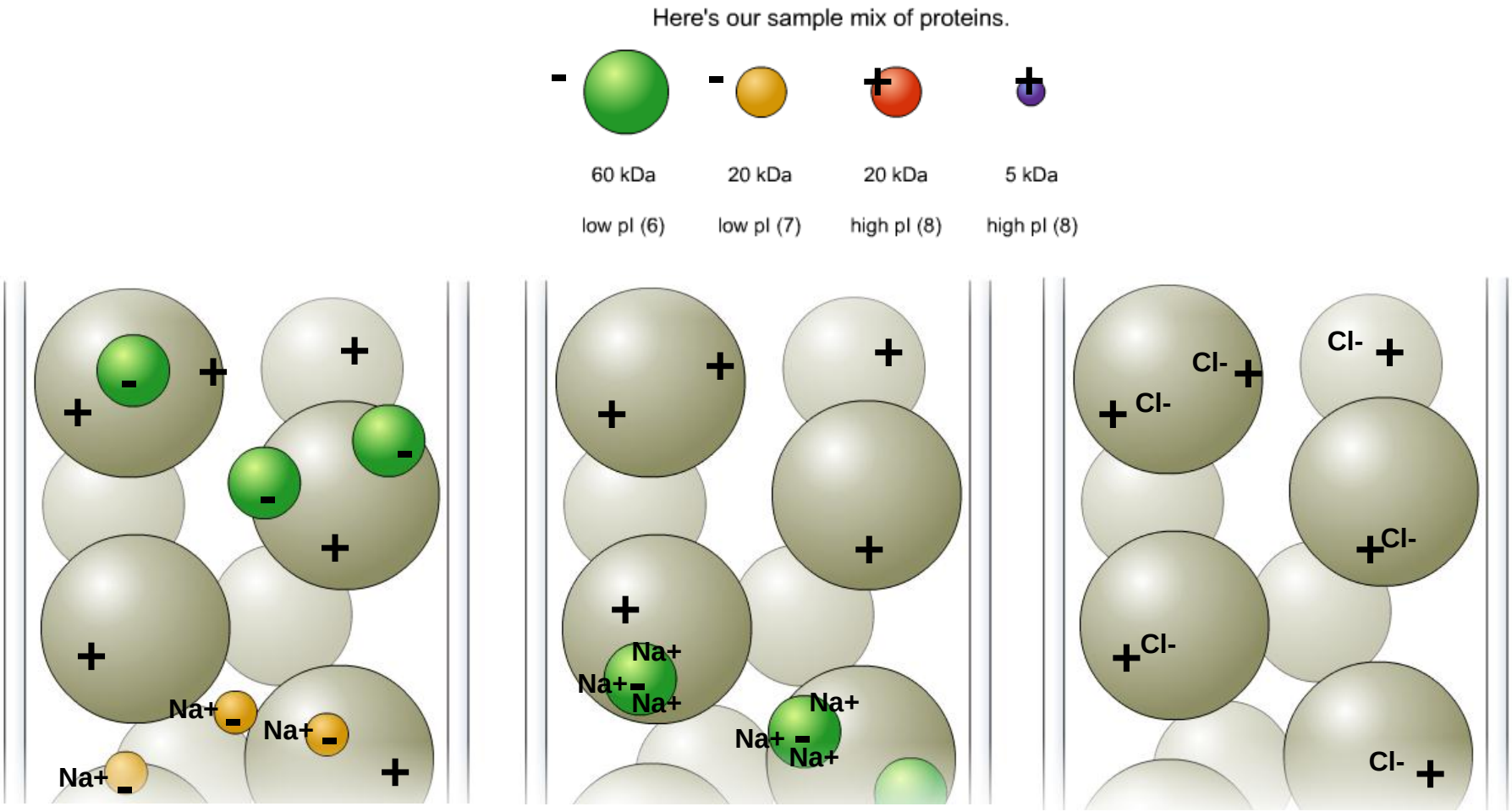
If pH mobile phase =7.2

Then charge of the proteins: **(-)** **(-)** **(+)** **(+)**



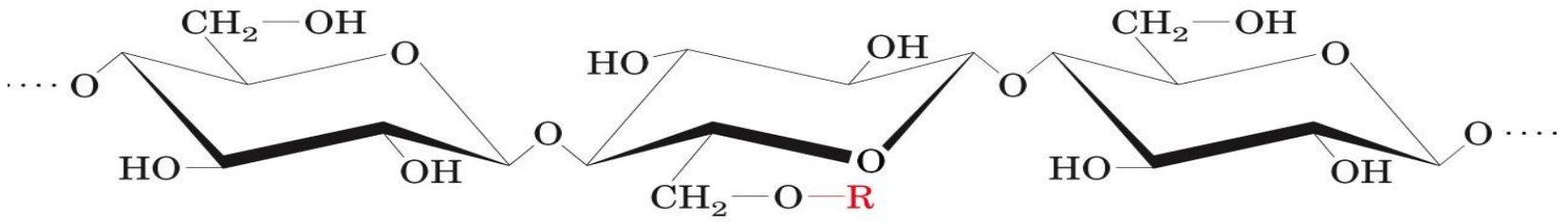
Anion exchange column = + charged

Ion-Exchange chromatography



الاستشراب المبادل للشوارد IEC

- يمكن أن يتألّف العمود المبادل للشوارد من سللوز شاردي cellulosic ions أو من هلامة شاردية gel-type ions.
- وبينما يكون السللوز الشاردي الأكثر استعمالاً، يمكن مرافقة الهلامات الشاردية مع الاستشراب بالاستبعاد مما يحقق فصلاً أكبر للبروتينات على العمود نفسه. إلا أن الهلامات عادة ما تكون مضغوطة مما يجعل شطف العمود أصعب عادة.



DEAE: $R = -CH_2-CH_2-\overset{+}{N}H(CH_2CH_3)_2$

CM: $R = -CH_2-COO^-$

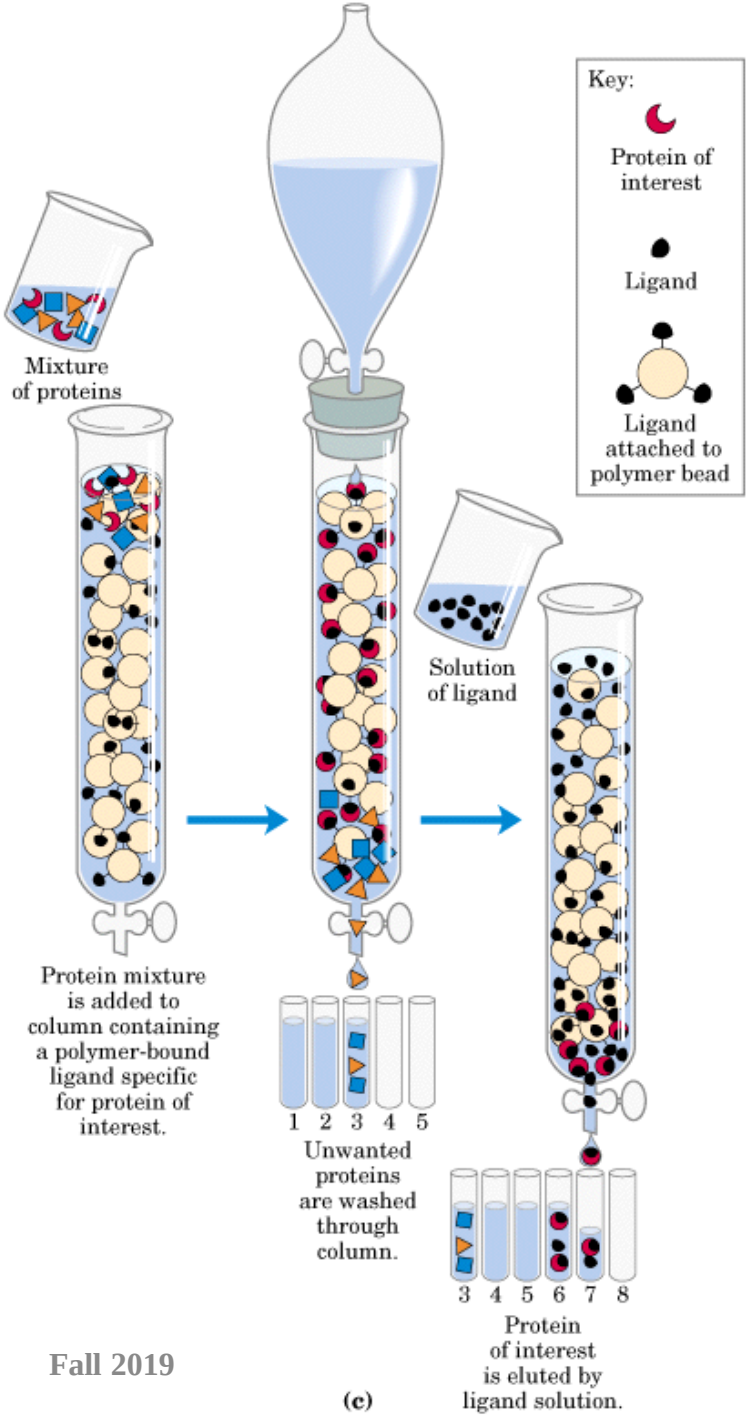
بعض أنواع المواد المستخدمة في العمود المبادل للشوارد

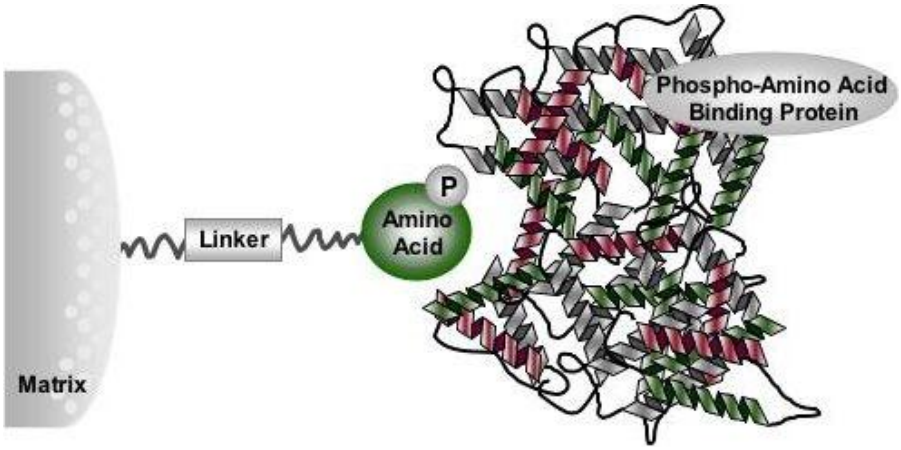
Name[a]	Type	Ionizable group	Remarks
DEAE-cellulose	Weakly basic	Diethylaminoethyl $-CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$	Used to separate acidic and neutral proteins
CM-cellulose	Weakly acidic	Carboxymethyl $-CH_2COOH$	Used to separate basic and neutral proteins
P-cellulose	Strongly and weakly acidic	Phosphate $-OPO_3H_2$	Dibasic; binds basic proteins strongly
Bio-Rex 70	Weakly acidic, polystyrene-based	Carboxylic acid $-COOH$	Used to separate basic proteins and amines
DEAE-Sephadex	Weakly basic cross-linked dextran gel	Diethylaminoethyl $-CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$	Combined chromatography and gel filtration of acidic and neutral proteins
SP-Sepharose	Strongly acidic cross-linked agarose gel	Methyl sulfonate $-CH_2SO_3H$	Combined chromatography and gel filtration of basic proteins
CM Bio-Gel A	Weakly acidic cross-linked agarose gel	Carboxymethyl $-CH_2COOH$	Combined chromatography and gel filtration of basic and neutral proteins

[a]Sephadex and Sepharose gels are manufactured by Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey; Bio-Rex resins and Bio-Gels are manufactured by BioRad Laboratories, Hercules, California.

الاستشراب بالإلفة
Affinity Chromatography

- يرتبط البروتين (بشكل قابل للعكس) مع مادة متممة له (لجين ligand أو ضد antibody) مثبّتة على طور صلب.
- إن الاستشراب بالإلفة أفضل ب 1000 مرة من أي من الطرق الأخرى بمفردها، وهو مفضّل إن كان ذلك ممكناً.



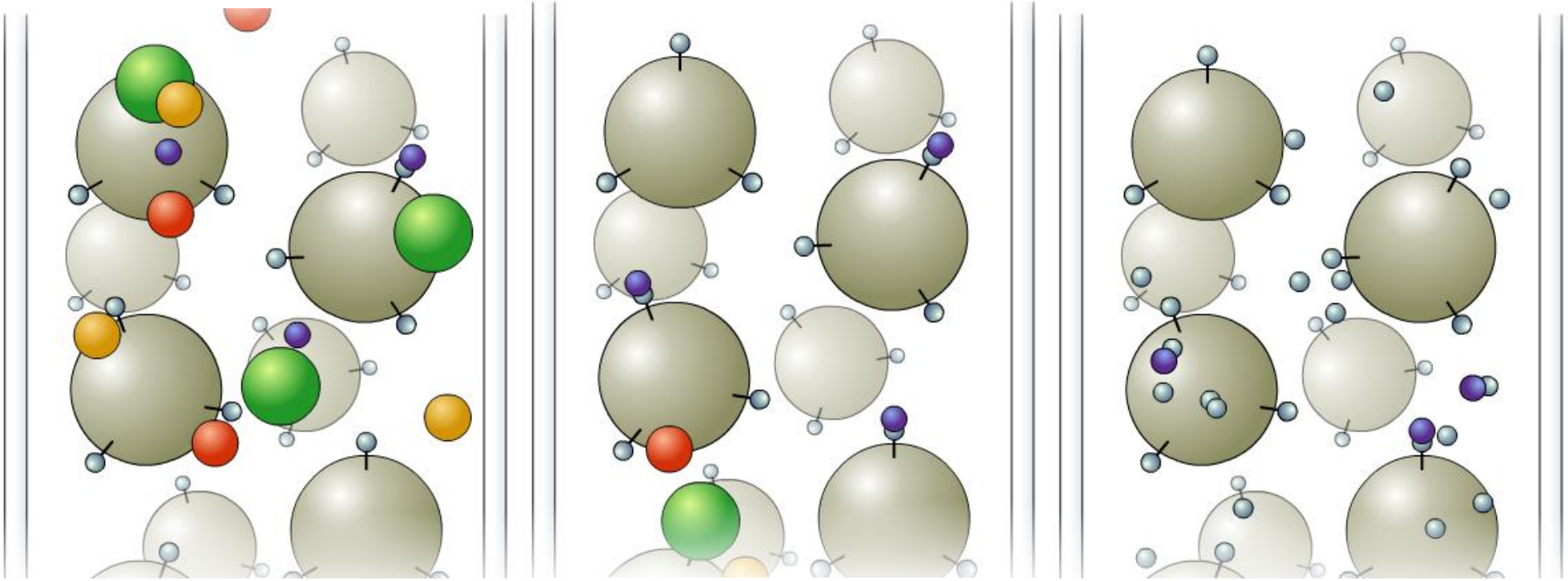


Affinity chromatography

1- Incubate crude sample with the immobilized ligand

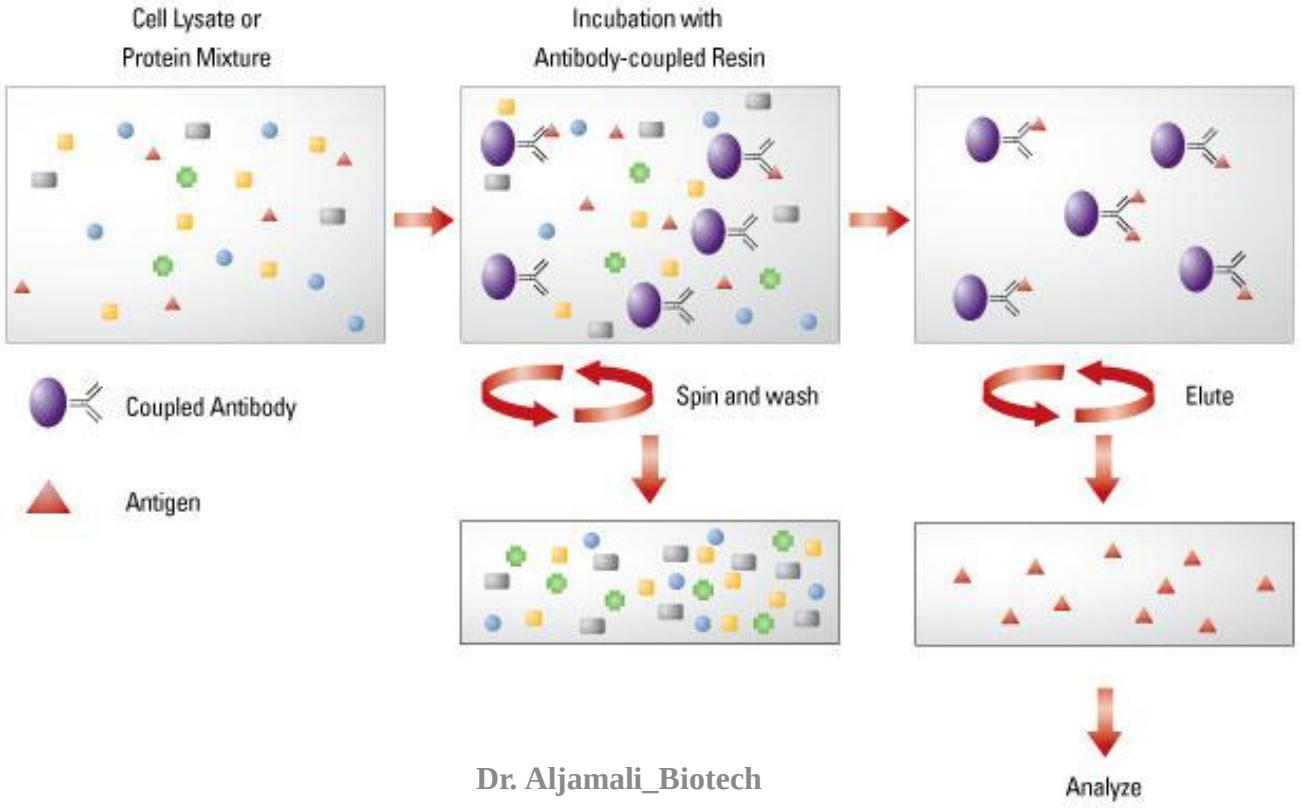
2- Wash away non bound sample components from solid support

3- Elute

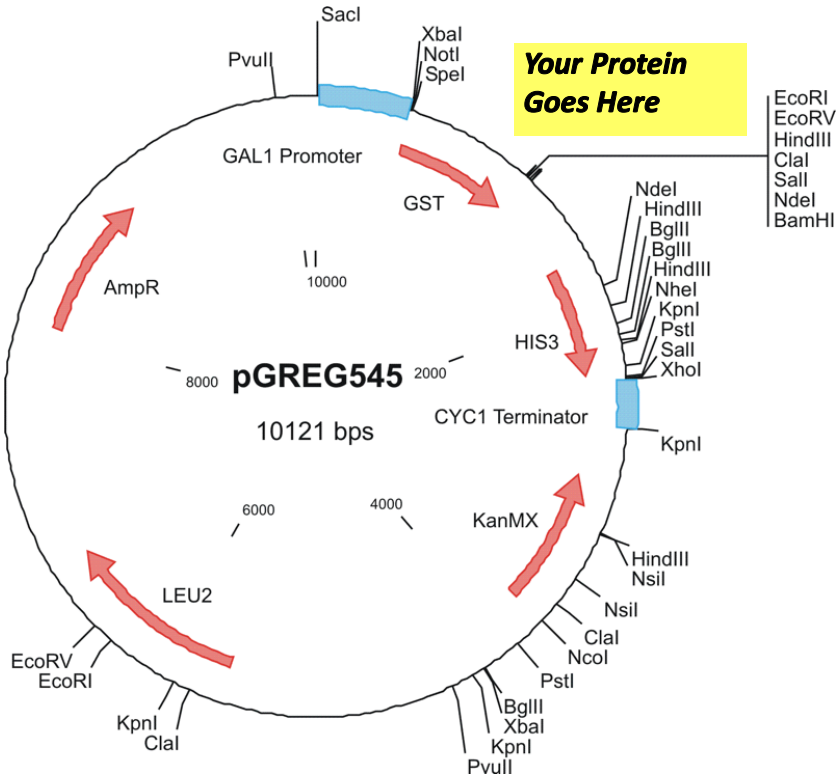


الترسيب المناعي Immunoprecipitation

- يمكن ربط اللجين أو الضد على طور صلب وإضافته مباشرة إلى خليط البروتينات الذي يحتوي على البروتين النوعي للجين أو الضد. بعد الارتباط النوعي، يتم تنبيذ الأنبوب حيث يرسب الضد المرتبط مع البروتين والطور الصلب ويزال السائل الطافي الحاوي على البروتينات الأخرى. يتم عادة غسل الراسب عدة مرات بوقاء مناسب، يتبع كل غسل بالتنبيذ. وأخيراً يجري فك الارتباط بين البروتين ومعقّد ضد–طور صلب، وبحيث نحصل على نقاوة عالية من البروتين المرغوب. تدعى هذه الطريقة بالترسيب المناعي، وتستخدم بشكل كبير في الأبحاث.

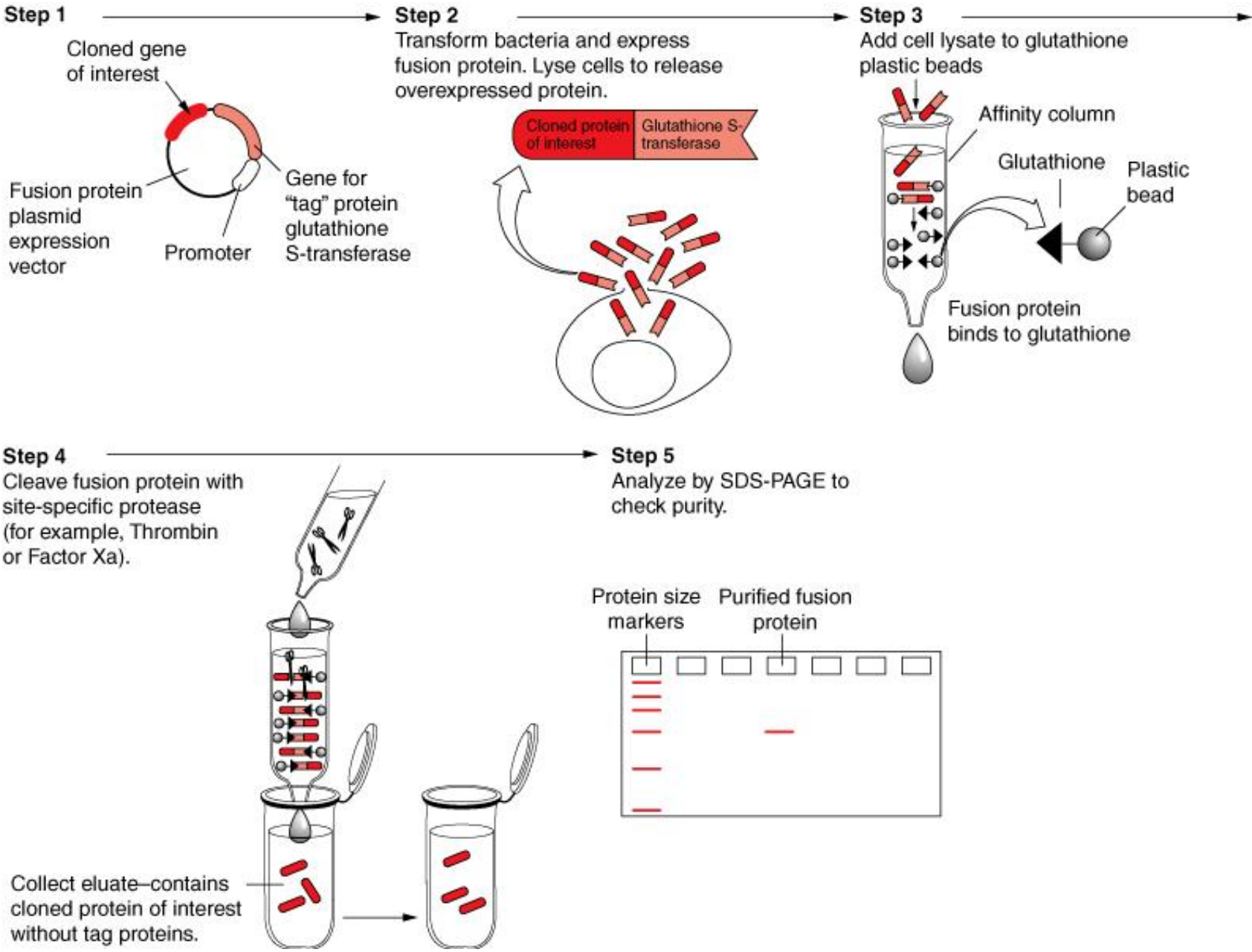


التعبير عن بروتين مندمج Fusion Protein بهدف تنقية البروتين

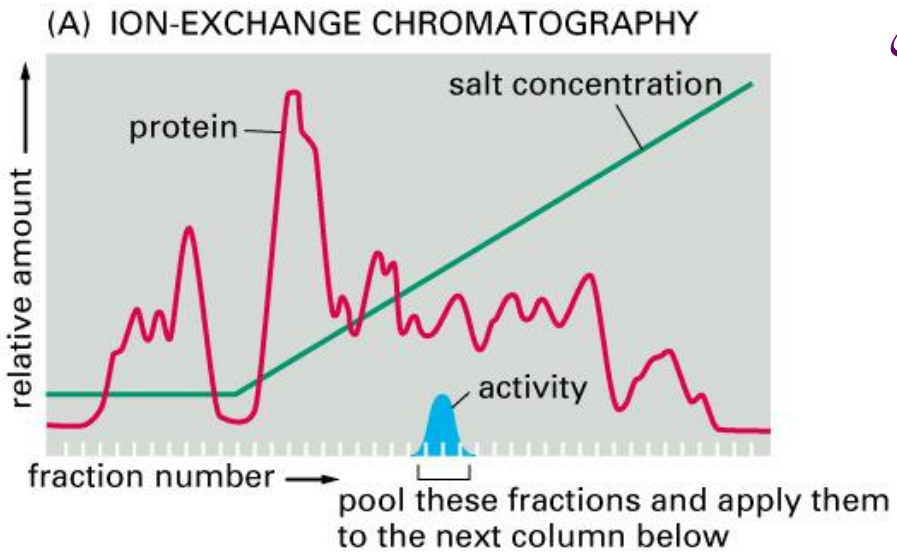


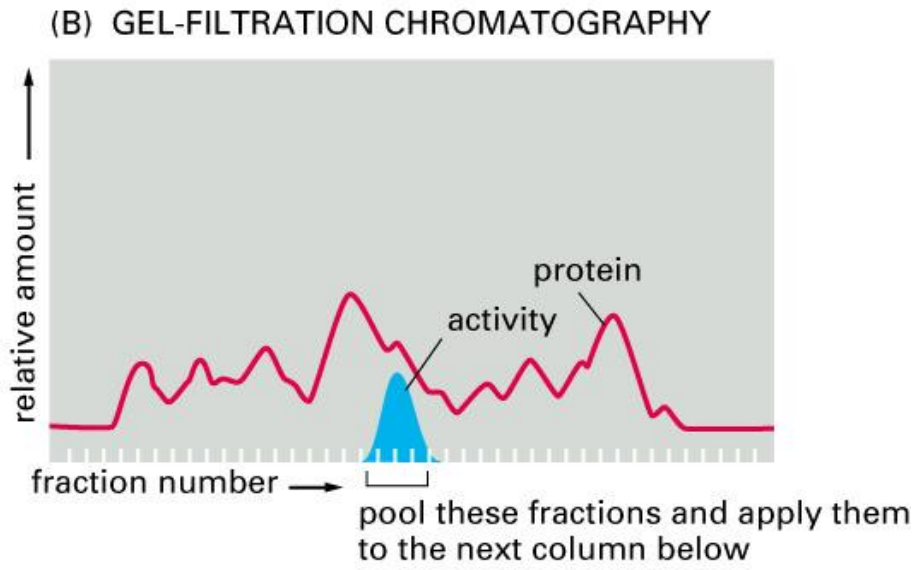
- يمكن التعبير عن بروتين مندمج إلى إحدى السلاسل الببتيدية/البروتينية التي تستخدم بمثابة "كواشف" عامة في تنقية البروتين، حيث يكفي أن تُغرس مورّثة البروتين المطلوب تنقيته قبل أو بعد المنطقة المشفّرة لتلك السلاسل الببتيدية والتي تشكّل هدفاً لارتباط لجينات أو أضداد مثبتة على طور صلب خامل. من تلك الببتيدات:
- Glutathione-S-transferase (GST)، والذي يساعد في تنقية البروتين المندمج معه بارتباطه مع الغلوتاتيون المثبّت على طور صلب، ويجري الشطف بالغلوتاتيون.
- البروتين الرابط للمالتوز Maltose-binding protein (MBP). ويمكن تنقية البروتين المندمج على عمود من الأميلوز amylose ويجري شطف البروتين بالمالتوز.
- ستة ثمالات من الهستيدين (His Tag) or 6XHis. ويمكن تنقية البروتين المندمج بمعدن النيكل أو الكوبالت الذي يربط الهستيدين السداسي، ويجري الشطف بالإيميدازول imidazole أو في باهاء منخفضة.

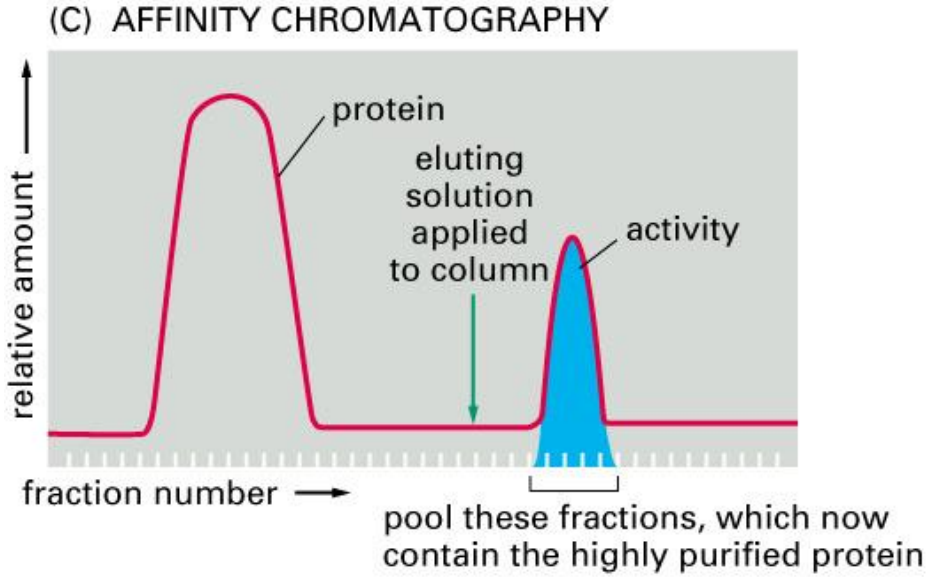
Protein Purification by Fusion



مقارنة بين الطرق الثلاثة لتنقية البروتينات على العمود Column Chromatography







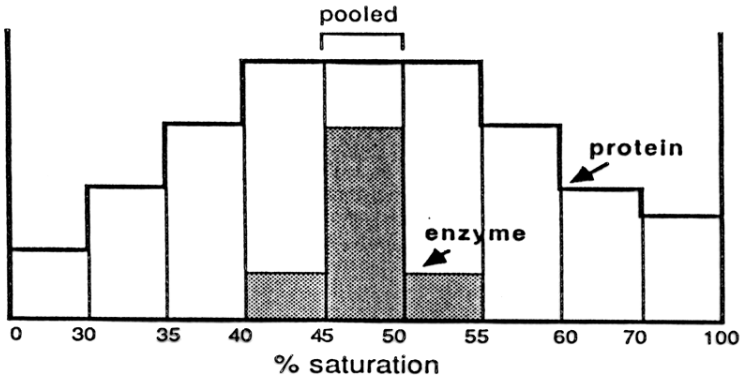
Typical Protein Purification Scheme

START

100gm wet weight E. coli =20gm
dry weight=12gm protein
(100%enzyme,100% protein,
purity factor=1)

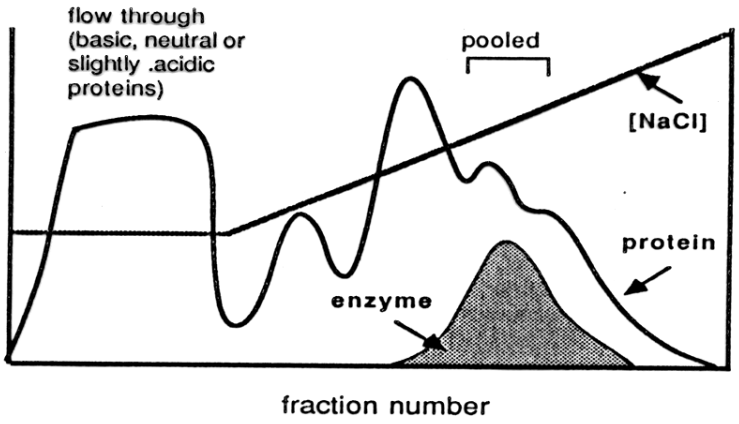
Ammonium Sulfate Precipitation

(45-50% cut has 75% of enzyme,
15% of total protein,
purity factor=5)



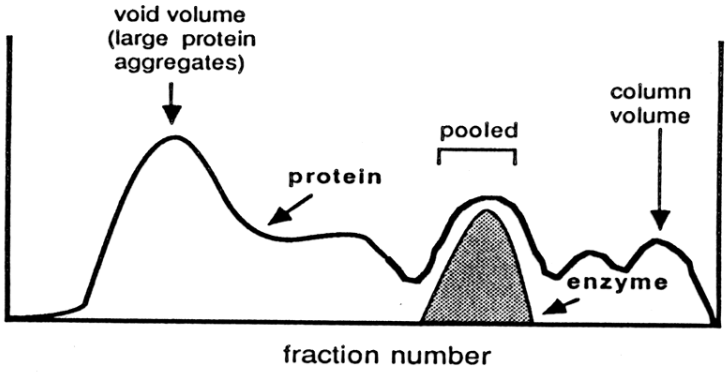
Ion Exchange Chromatography

salt gradient elution
(pooled fractions contain 60% of
enzyme,2% of protein,
purity factor=30)



Gel Filtration Chromatography

(pooled fractions contain 45% of
enzyme, 0.3% of protein,
purity factor=150)



Dialysis into storage buffer
containing 50% glycerol
for storage at -20°C or -70°C

FINAL PRODUCT
(36 mg)

SDS PAGE of Purification

- 10 micrograms of proteins loaded in each lane

- Definition of lanes
  1. Complete mix of proteins
  2. High Salt
  3. Ion exchange
  4. Gel-filtration
  5. Affinity

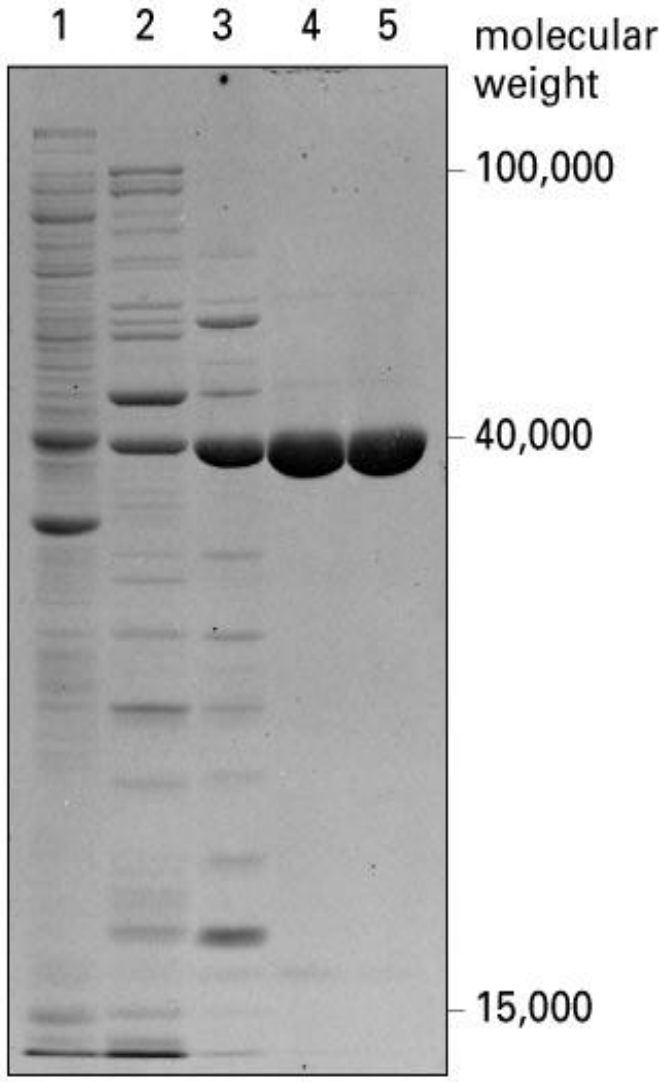
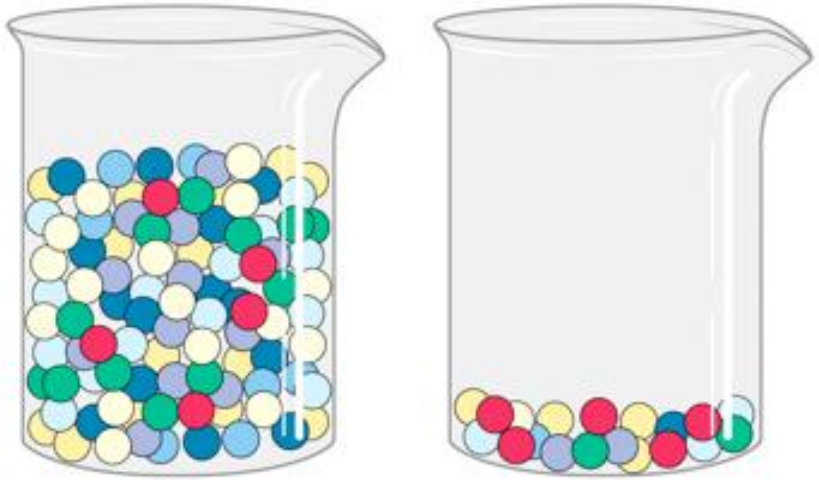


TABLE 3–5 A Purification Table for a Hypothetical Enzyme

Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

Note: All data represent the status of the sample *after* the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 94.



Specific activity=

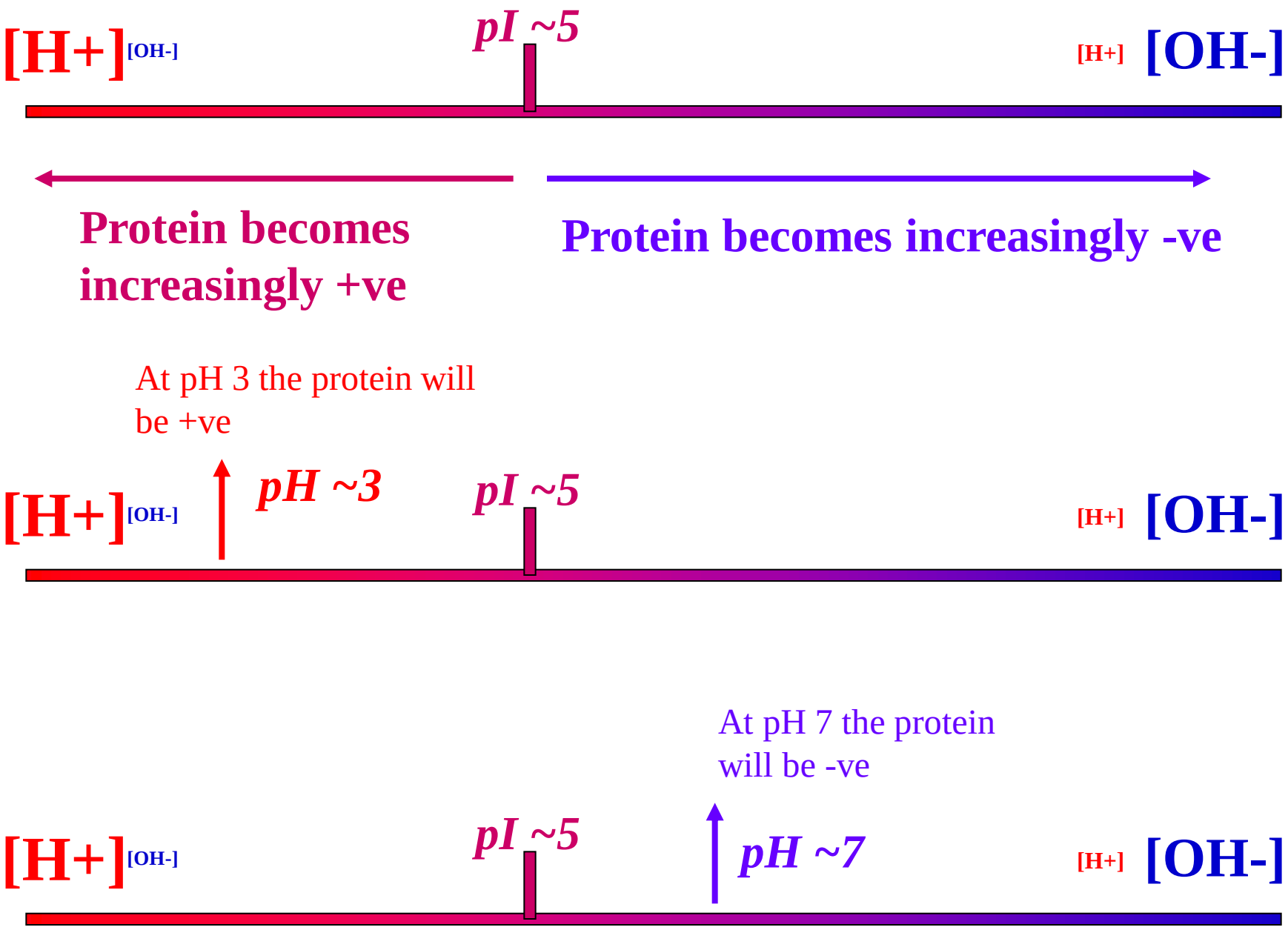
enzyme activity / amount of protein (mg)

التبئير (البأر) متساوي التكهرب Isoelectrical Focusing (IEF)

- تعرّف نقطة تساوي التكهرب isoelectric point (IP) بأنها درجة الباهاء pH التي تتساوى عندها الشحنات الموجبة والسالبة في جزيء البروتين ويكون البروتين غير مشحون.
- عند نقطة PI يكون البروتين قريباً من الترسب بسبب عدم امتلاكه لشحنات تمكّنه من التآثر مع الشوارد الموجودة في المحلول، ويمكن للأملاح أن تثبط التآثرات بين جزيئات البروتينات نفسها وتعزز بذلك تكدّس البروتينات aggregation وترسبها precipitation.
- يمكن استخدام نقطة PI للبروتينات لترسيبها.
- كما يمكن اعتماد الاختلاف في نقاط PIs بين البروتينات لفصلها وتنقيتها في درجات باهاء معيّنة، وهو الأساس لتقنية التبئير متساوي الشحنة (التكهرب) IEF والتي تستخدم عادةً كخطوة في الرحلان الكهربائي ثنائي الأبعاد.
- يتم فصل البروتينات في تقنية IEF باستخدام هلامة تحتوي على مدروج من درجات الباهاء بحيث تتوزع البروتينات وفقاً لشحنتها بين القطبين السالب والموجب إلى أن تصل إلى منطقة pH تتساوى عندها الشحنات الكلية في البروتين وبالتالي يصبح غير قادراً على الرحلان نحو أي قطب منهما.

TABLE 3–6 The Isoelectric Points of Some Proteins

Protein	*pI*
Pepsin	<1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β-Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome *c*	10.7
Lysozyme	11.0


[H+]
[OH-]
pI ~5
[H+]
[OH-]
Protein becomes increasingly +ve
Protein becomes increasingly -ve
At pH 3 the protein will be +ve
[H+]
[OH-]
pH ~3
pI ~5
[H+]
[OH-]
At pH 7 the protein will be -ve
[H+]
[OH-]
pI ~5
pH ~7
[H+]
[OH-]

Isoelectric Focusing التبئير متوازي الشحنة

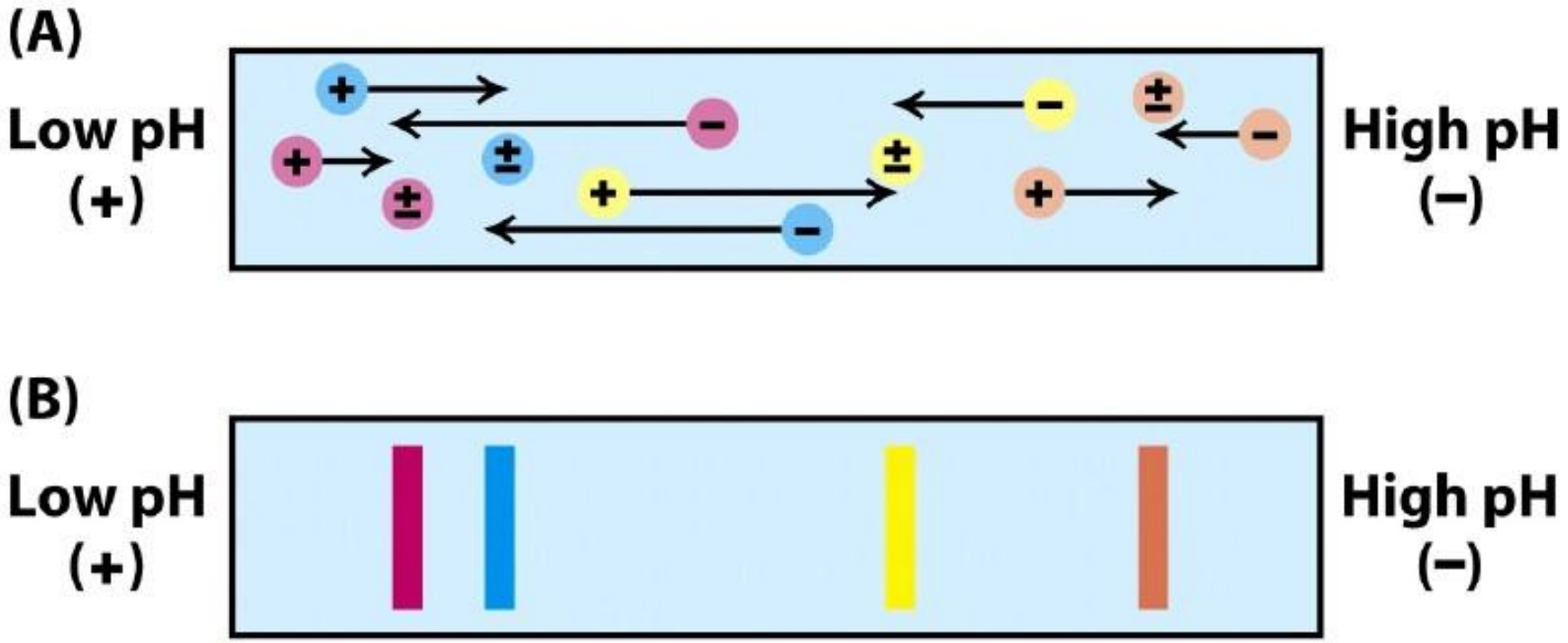
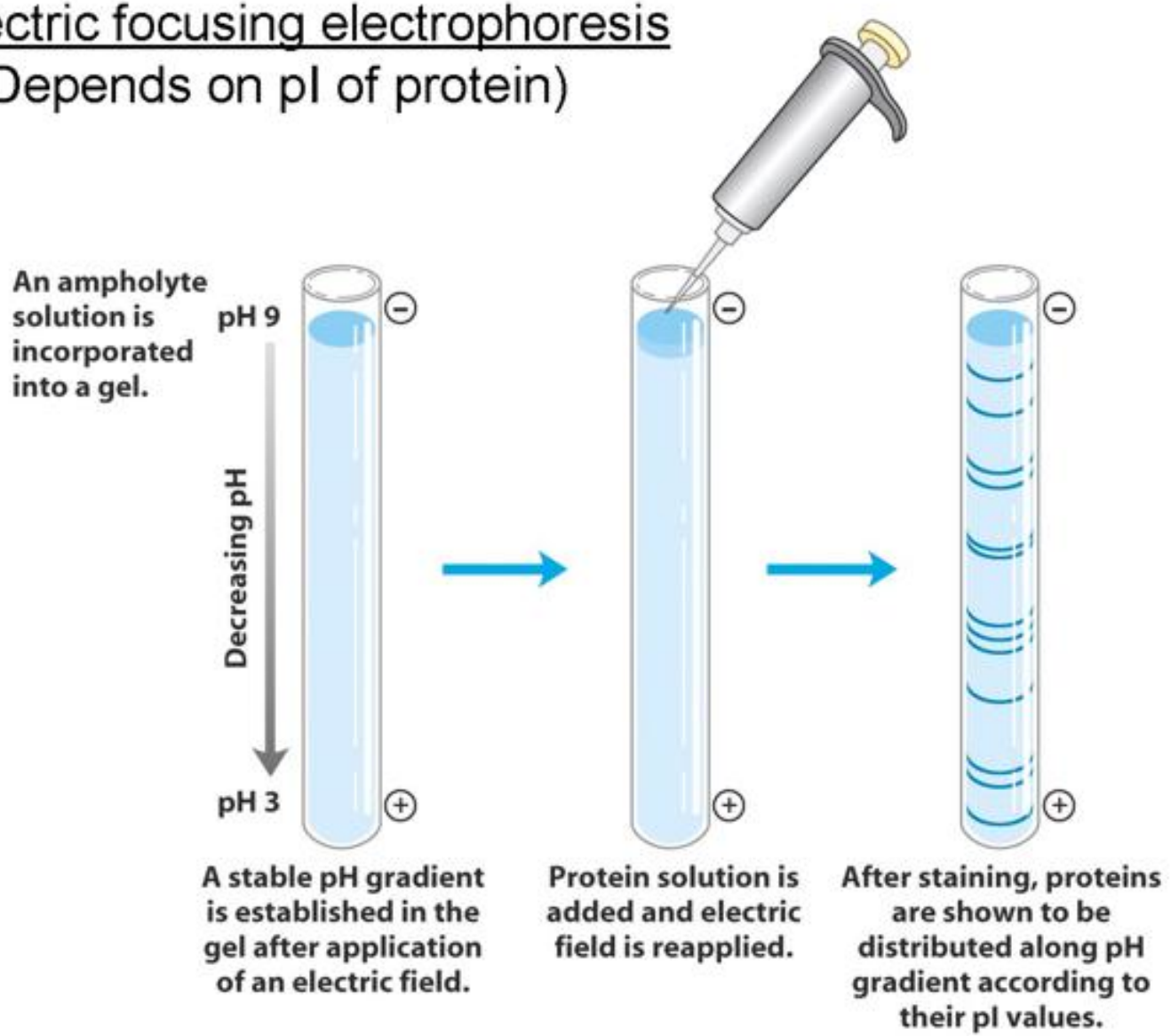


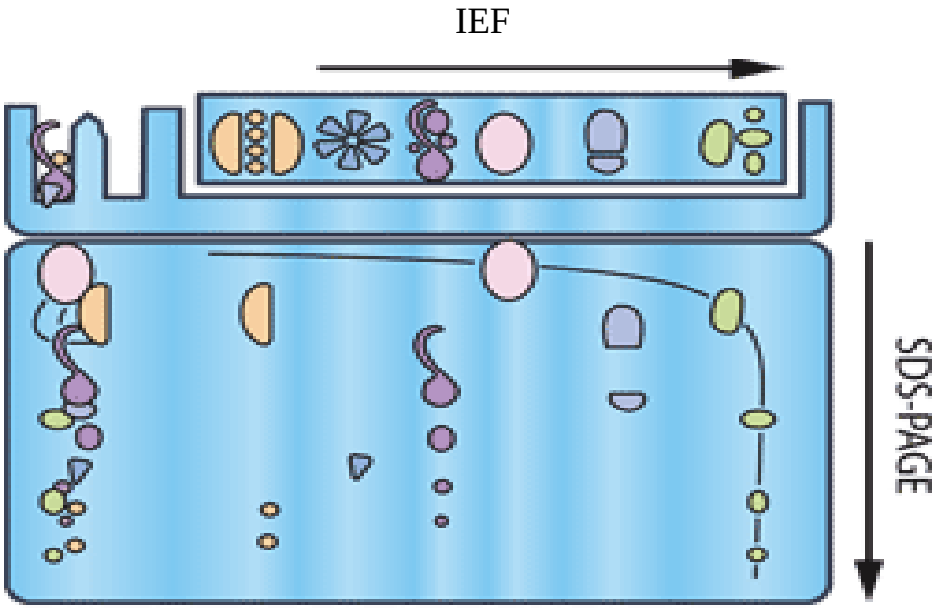
Figure 3-11
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Isoelectric focusing electrophoresis
(Depends on pI of protein)



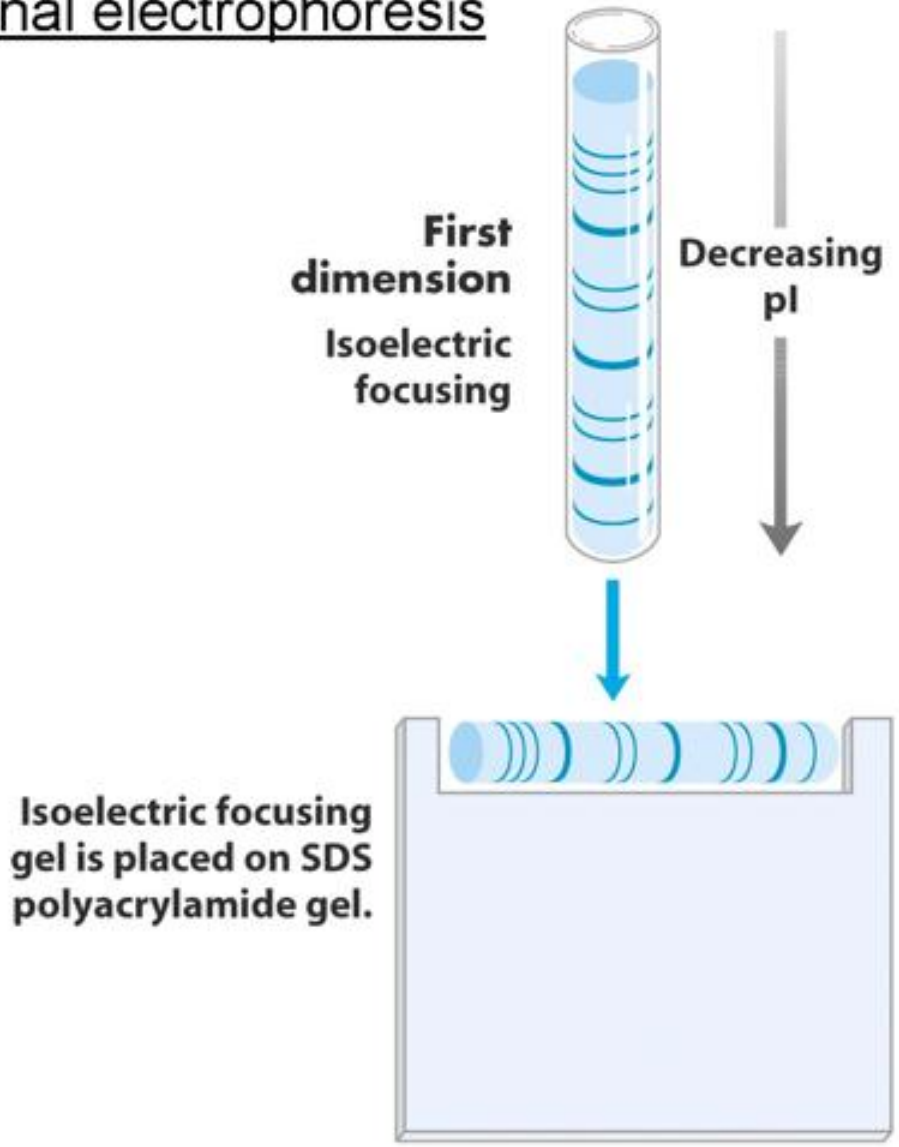
الرحلان الكهربائي ثنائي الأبعاد 2D Gel Electrophoresis (2D GE)

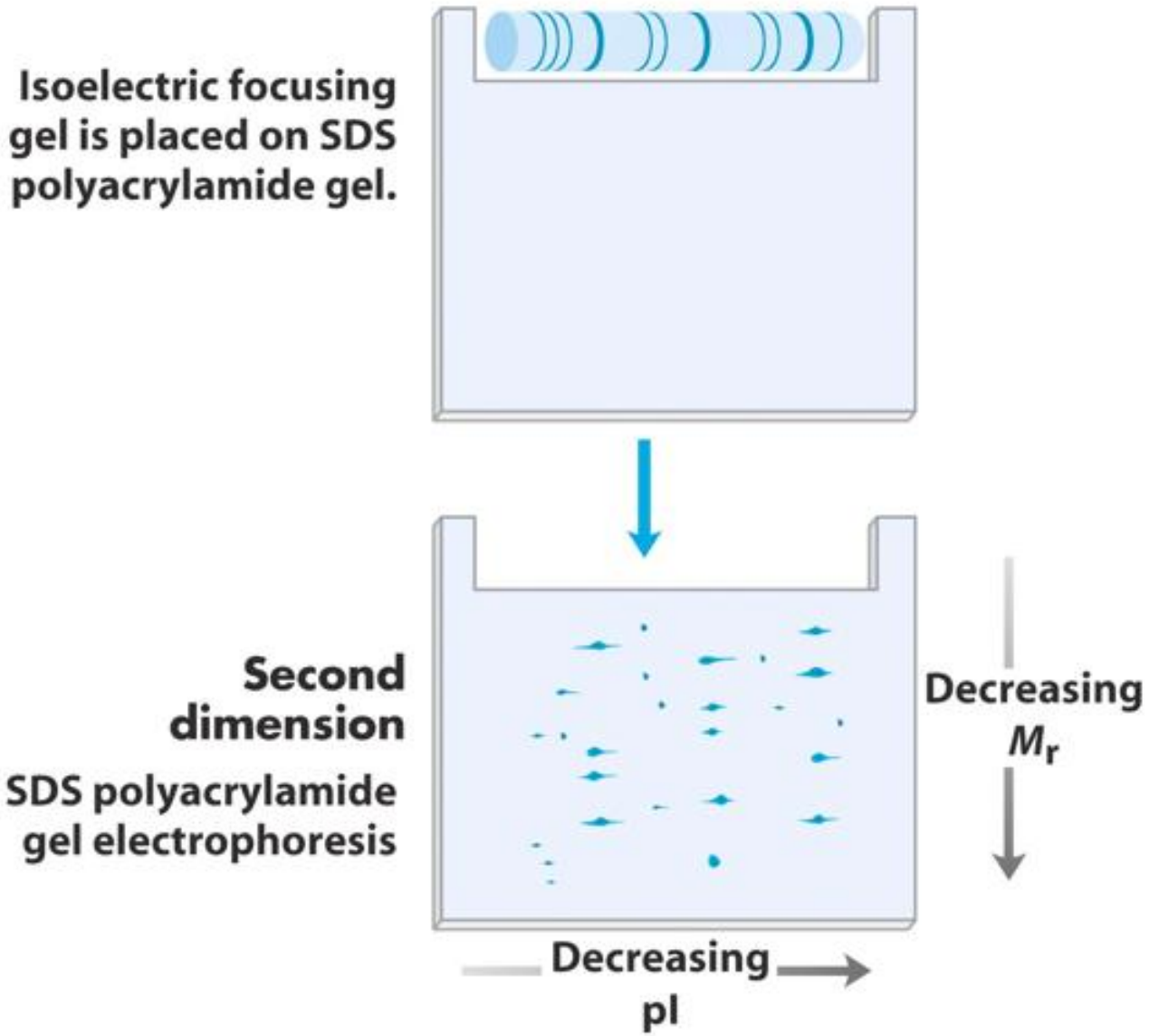
- تعتمد تقانة 2D GE على خطوتين يتم في كل منهما فصل البروتينات حسب خواصها المختلفة
  - في الخطوة الأولى: تفصل البروتينات بالتبئير متساوي الشحنة وباستخدام مدروج من درجات الباهاء
  - في الخطوة الثانية: تفصل البروتينات بالرحلان الكهربائي تبعاً لاختلاف أوزانها الجزيئية
- غالباً ما يجرى رحلان كهربائي أفقي في الخطوة الأولى ثم تؤخذ الهلامة الحاوية على البروتينات المفصولة تبعاً لنقاط PI المختلفة لتلك البروتينات وتوضع الهلامة على سطح هلامة ثانية شاقولية يتم بواسطتها تطبيق الرحلان الكهربائي العادي الذي يفصل البروتينات تبعاً لأوزانها الجزيئية.



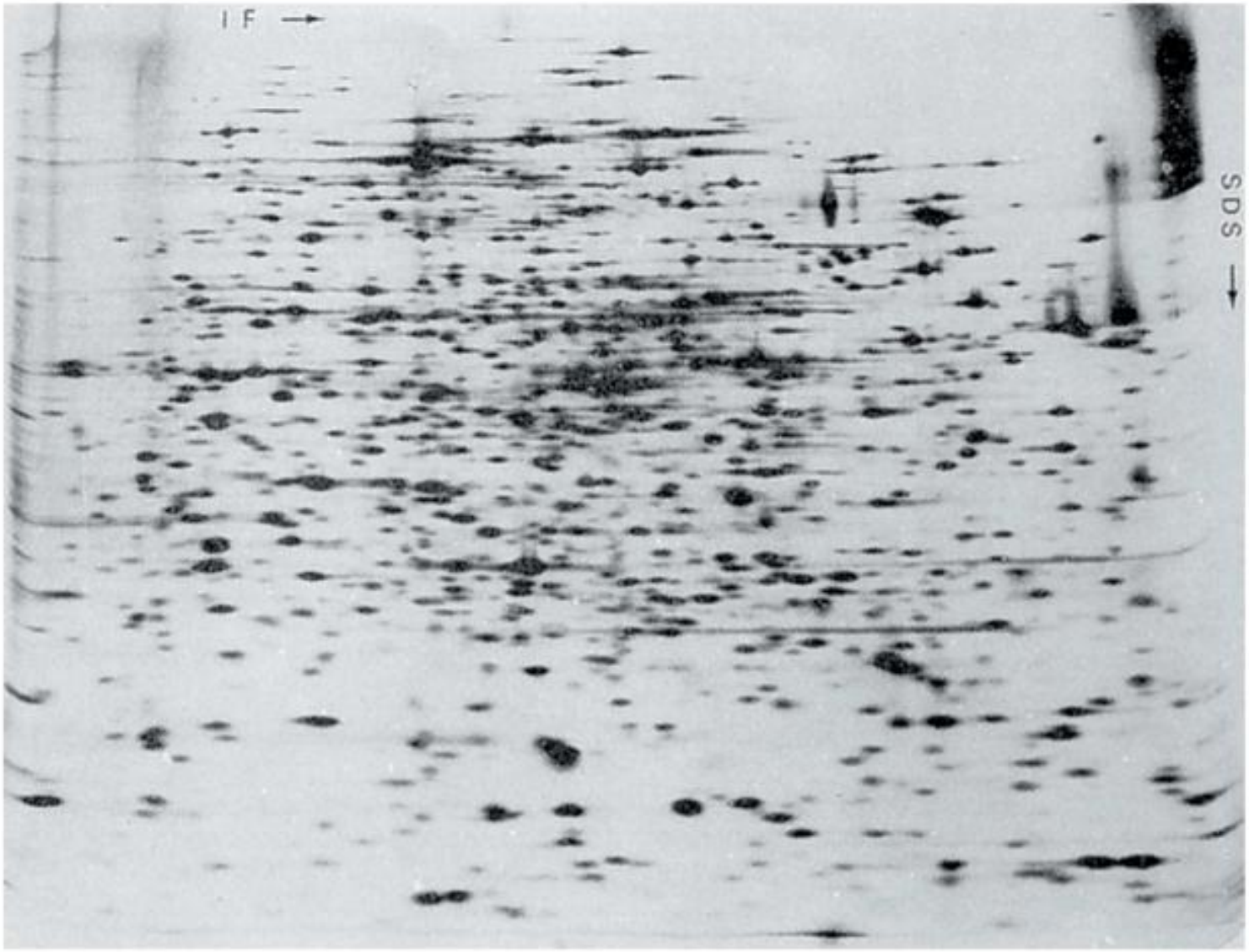
- تكمن الفائدة الجمّة من تطبيق 2D GE في فصل دقيق للبروتينات عن بعضها البعض، وتعدّ هذه التقانة إحدى المرتكزات الأساسية لدراسة البروتيوم proteome لخلايا أو نسج معيّنة، أو لدراسة التغيّر في التعبير الجيني بين شروط مختلفة، حيث يلاحظ ظهور أو اختفاء عصابات البروتين لدى تعرض الخلايا لظروف مختلفة (غذاء، دواء، شدّة stress، إلخ)

Two-dimensional electrophoresis




Isoelectric focusing gel is placed on SDS polyacrylamide gel.
Second dimension
SDS polyacrylamide gel electrophoresis
Decreasing M_r
Decreasing pI

Typical 2-D Gel from Whole Cell or Tissue Sample



Gene Expression changes according to nutrients