



TÁMOP 4.1.2.B.2-13/1-2013-0007  
„ORSZÁGOS KOORDINÁCIÓVAL A PEDAGÓGUSKÉPZÉS MEGÚJÍTÁSÁÉRT”

# BIOKÉMIA GYAKORLATI JEGYZET

**összeállította:**  
**Dr. Venekei István**  
**Molnár Tamás**  
**Porrogi Pálma**

**Lektorálta:**  
**Szilágyi László**

**SZÉCHENYI** 



MAGYARORSZÁG  
KORMÁNYA

**Európai Unió**  
Európai Szociális  
Alap



**BEFEKTETÉS A JÖVŐBE**

# 1. GYAKORLAT

## Spektrofotometria Fehérjekoncentráció mérése

### Bevezetés

#### A. Fotometria

A spektrofotometria az egyik leggyakrabban használt analitikai eljárás a biokémiában. A módszer igen alkalmas kismennyiségű anyag gyors, egyszerű, rutinszerű mérésére. A mérés feltétele az, hogy a vizsgált anyagnak a színek valamelyik pontján abszorpciós maximuma legyen. Ha az abszorpciós maximum a spektrum látható (VIS, 320-800 nm) tartományába esik, az anyag színes. A látható tartományban elvégezhető analízisek száma igen nagy. Ha a vizsgálandó anyagnak magának nincs színe, valamilyen kémiai reakciót kell végezni a kérdéses anyaggal, ami színes vegyület képződéséhez vezet. Ezen kívül az ultraibolya (UV, 190-320 nm) tartományú analízisek is széles körben elterjedtek, mivel sok színtelen anyagnak van ezen a területen intenzív elnyelési sávja.

A spektrofotometriás mennyiségi analízisek az oldatok fényelnyelésére vonatkozó Lambert-Beer-törvényen alapulnak. A fényelnyelés nagyságából az abszorbeáló komponens koncentrációjára lehet következtetni, a következő összefüggések alapján:

Ha a fény  $I_0$  intenzitása a közeg  $L$  vastagságú rétegén áthaladva  $I$ -re csökken, akkor a Lambert-Beer-törvény értelmében:

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot L$$

A  $\log \frac{I_0}{I}$  kifejezést extinkciónak ( $E$ ) vagy abszorbanciának ( $A$ ), esetleg optikai sűrűségnek (optikai denzitás,  $OD$ ) nevezzük. Olyan hullámhossznál, amelynél az oldószer nem abszorbeál, a Lambert-Beer-törvény szerint  $E$  arányos az oldat  $c$  koncentrációjával, ha az oldott anyag a hígítás alkalmával nem megy át molekuláris változáson. A törvény csak adott hullámhosszú monokromatizált fény esetén érvényes.  $\varepsilon$  az oldott anyag koncentrációjától független állandó, melyet extinkciós koefficiensnek hívunk. Ha a koncentrációt mol/l-ben fejezzük ki, akkor moláris extinkciós koefficiensről, vagy moláris abszorptivitásról beszélünk. A moláris abszorptivitás megadja, hogy adott hullámhosszon 1 cm-es rétegvastagság esetén 1 mol/l ( $M$ ) koncentrációjú oldatnak mekkora extinkció felel meg, mértékegysége a  $M^{-1}cm^{-1}$ . Értéke az adott anyagra jellemző, de függ az oldószertől és a hőmérséklettől.

A fenti összefüggések alapján tehát a fényelnyelés mértékéből a koncentráció kiszámítható:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot L}$$

Ha  $\varepsilon$  a moláris extinkciós koefficiens, akkor a  $c$  moláris koncentrációnak adódik.  $L$  a kivetta (plánparallel üvegből, műanyagból, vagy kvarcból készült mérőedény) optikai úthosszúsága cm egységben kifejezve.

Ha a mérendő anyag nem követi pontosan a Lambert-Beer törvényt, egyéb módon pontosan meghatározott koncentráció sorozat segítségével kalibrációs görbét készítünk. Ennek alapján megfelelő korrekcióval elvégezhetőek a mérések.

Régebbi fotométerekben a transzmisszió (transzmittancia) értékét mérték:

$$T = \frac{I}{I_0} \text{ vagy } T\% = \frac{I}{I_0} \cdot 100$$

Összefüggése az extinkcióval:

$$E = \log \frac{100}{T\%} \text{ vagyis } E = 2 - \log T\%$$

## B. Az UV-VIS fotométer

A spektrofotométer abszorbancia mérésére alkalmas műszer, amely egy általunk meghatározott hullámhosszúságú fényt állít elő, a mintára irányítja (amely általában oldott állapotban egy küvetében van), és megméri az átjutó fénysugár intenzitását. Mindehhez fényforrás, monokromátor, mintatartó, detektor és kijelző egység szükséges.

A fényforrás a 200 és 320 nm közötti tartományban deutérium, nagynyomású hidrogén, esetleg nagynyomású xenon lámpa, a látható és közeli infravörös tartományban pedig wolframszálas lámpa. Egy kombinált UV-VIS spektrofotométerben mindkét típusú lámpa megtalálható.

A monokromátor feladata az említett fényforrások folytonos spektrumából egy adott hullámhosszúságú fény kiválasztása. A modern készülékekben a régebben használt prizma helyett rácisos monokromátor van. A kilépő fény nem szigorúan monokromatikus, egy viszonylag szűk hullámhossz tartománnyal jellemezhető. A monokromátorban a be- és kilépő fény réseken halad keresztül, melyek szélessége meghatározza a sáv szélességet. Minél szélesebb a rés, annál szélesebb a kilépő fény hullámhossz tartománya. Ugyanakkor a rés szűkítésével a fényintenzitás is csökken, tehát a rés megfelelő beállításával kompromisszumot keresünk a spektrális tisztaság és a kellő fényintenzitás között.

A mintatartó: a fény keresztülhalad a mintán, amit műanyagból, üvegből, kvarcból vagy egyéb átlátszó anyagból készült mintatartóba helyeztünk. A műanyag és az üveg olcsó, de 280 illetve 320 nm alatt nem használhatók, mert itt túl nagy a fényelnyelésük. Rövidebb hullámhosszak esetén kvarc küvetát használunk. A kivetta minősége és állapota a mérés kritikus tényezője. Egyes készülékek alkalmasak arra, hogy a mérés során a minta hőmérsékletét állandó értéken tartsuk, ami például kémiai reakciók sebességének mérésekor fontos.

Az olcsóbb készülékek általában egysugarasak, azaz egy kivetta befogadására alkalmasak. A jobb minőségű készülékek kétsugarasak, vagyis két küvetán mérnek egyszerre. Az egyikben a vizsgálandó molekulát is tartalmazó oldat van, a másikban (referencia) pedig olyan oldat van, amely ezt az anyagot nem tartalmazza, de ettől eltekintve összetétele megegyezik az előző oldatével. A készülék a minta abszorbanciájából automatikusan kivonja a referenciaoldat abszorbanciáját, így

differenciálspektrumot mér, ami egyrészt jobban jellemzi a mérendő molekulát, másrészt a kivonás a lámpa fényintenzitásának ingadozásából eredő hibát is csökkenti.

A detektor: a mintán átjutó fény intenzitását fényérzékeny elektronikus eszközzel (fotodióda, fotoelektron-sokszorozó) mérik. Ennek fajtája, minősége erősen befolyásolja a készülék tulajdonságait. A fotoelektron-sokszorozókat rendkívül nagy sebesség és széles hullámhossz tartományban is nagy érzékenység jellemzi. A kis mérettel és mérsékelt érzékenységgel jellemezhető fotodiódákat az ún. fotodiódasoros (diode-array) készülékekben használják, melyekben egyidőben zajlik egy teljes spektrum felvétele.

Nemcsak egyetlen hullámhosszon mérhetünk, hanem a hullámhosszat változtatva spektrumokat is felvehetünk, amely az abszorbancia hullámhossztól való függését mutatja meg. Az egyszerűbb készülékek mérési tartománya 0-1 abszorbancia egység (AU), komolyabb készülékek 0-2 AU, vagy még szélesebb tartományban mérnek.

### **C. A fotometria során leggyakrabban felmerülő problémák**

- a.) Ha a minta zavaros, az hibát eredményez, hiszen a fény szóródik, és egy része nem jut a detektorba, ami látszólagos (nem valós) fényelnyelést eredményez.
- b.) Ha egy molekula asszociációra képes, és az asszociált ill. disszociált formák fényelnyelése eltérő, akkor nem érvényesül a Lambert-Beer törvény, hiszen a disszociáció foka függ a koncentrációtól.
- c.) Nagyon fontos, hogy a kuvetta legyen karcolásmentes és tiszta. A kuvetta fényútba eső oldalait nem szabad megfogni.

### **D. Fehérjekoncentráció meghatározása**

A gyakorlatban sokszor van szükség oldott fehérjék mennyiségének pontos meghatározására. Erre számos módszer létezik. Kromogén (színképző) eljárásnak nevezzük, amikor a fehérje és egy szerves vegyület által létrehozott színes komplex elnyelését mérjük. A koncentráció meghatározható a fehérjék saját UV-elnyelése alapján is. Érdeemes megjegyezni, hogy bármelyik eljárást választjuk, mindegyiknél előfordulhat, hogy más-más fehérjék azonos mennyiségeire eltérő eredményt adnak, és az is igaz, hogy egy adott fehérje esetén az egyes módszerek adhatnak eltérő értékeket. Nincs tökéletes fotometriás fehérje-meghatározó eljárás. Mindegyik módszernek van előnye és hátránya, ezeket mérlegelve kell választani közöttük, de a valósághoz legközelebb eső eredményt a 280 nm-en végzett mérés adja, ha ismerjük a fehérjénkre vonatkozó  $\epsilon$  értéket. Az eredményt befolyásoló legfontosabb faktorok a specificitás, az érzékenység, a mérhető koncentrációtartomány, a pontosság, a mérendő fehérje természete, a mérést zavaró anyagok jelenléte, és a mérésre szánt idő.

### **Biuret-módszer**

A két, vagy több peptidkötéssel rendelkező molekulák alkalikus körülmények között reagálnak  $\text{Cu}^{2+}$  ionnal, és lila komplex keletkezik. A koordináció a peptidkötések nitrogén és oxigén atomjai valamint a rézion között jön létre. A keletkezett komplex mennyisége arányos a peptidkötések számával.

A gyakorlatban a fehérjemennyiség meghatározását kalibrációs görbe alapján végezzük, amelyet ismert mennyiségű fehérje segítségével készítünk. A biuret reagenssel kezelt fehérjét a színes termék kialakulása után fotometráljuk 540 nm-en.

Előnye: csak néhány anyag zavarja (pl. Trisz és aminosav pufferek), gyorsan elvégezhető, nem érzékeny a mérendő fehérjék aminosavösszetételére. Hátránya: kicsi az érzékenysége, a méréshez legalább 1 mg fehérje szükséges.

### **Bradford-módszer**

Talán a legelterjedtebb fehérjemeghatározási módszer. Az eljárás a Coomassie Brilliant Blue G-250 festék azon tulajdonságán alapszik, hogy savas közegben kötődik a fehérjékhez (elektrosztatikus és van der Waals kölcsönhatással), és ekkor elnyelési maximuma 465-ről 595 nm-re tolódik el.

Előnye: nagyon érzékeny, a hasznos mérési tartomány 1-20 µg, és gyorsan kivitelezhető. Viszonylag kevés olyan anyag van, ami zavarja a mérést (urea és guanidin-hidroklorid jelenlétében is lehet mérni vele), de sajnos a detergenssek ilyenek. Nyomnyi mennyiségű mosogatószer is meghamisíthatja a kapott eredményt. Hátránya: a módszer meglehetősen aminosavösszetétel-függő és megfesti a küvetákat is.

### **Spektrofotometriás módszer UV-elnyelés alapján**

A módszer alapja, hogy az aromás aminosavak közül a triptofán és tirozin 280 nm környékén erős elnyelési csúcsot mutat. Előnye, hogy gyors és egyszerű. Mivel nem kell a méréshez a fehérjét kémiai reakcióba vinni, ezt az eljárást használják fehérjék ill. peptidek kromatográfiás elválasztásának folyamatos követésére. Hátránya, hogy mivel az egyes fehérjék különböző arányban tartalmaznak aromás aminosavakat, inkább csak ugyanazon fehérje különböző oldatainak összevetésére alkalmas, nem abszolút módszer. A probléma kiküszöbölhető, ha ismerjük a fehérjemolekulában található tirozin és triptofán aminosavak számát, amiből a moláris extinkciós koefficiens jól becsülhető. A módszer érzékenysége mérsékelt, 50 µg körül van. A mérést zavarja minden 280 nm-en elnyelést mutató anyag, leggyakrabban DNS (a nukleinsavak elnyelési maximuma 260 nm-nél van, de 280 nm-en még erős elnyelést mutatnak). Warburg és Christian módszere kiküszöböli a nukleinsavak által okozott hibát. Eszerint meghatározzuk a minta  $A_{280}/A_{260}$  értékét, majd egy táblázatból keressük ki a megfelelő fehérje és nukleinsav arányát. A fehérjekoncentráció számolható a következő összefüggés alapján:

$$C_{prot}(\text{mg/ml}) = 1,55 \times E_{280\text{nm}} - 0,76 \times E_{260\text{nm}}$$

Megjegyzendő, hogy a fehérjék ill. a peptidek 220-240 nm között is igen intenzív elnyelést mutatnak, ami a peptidkötéseknek és a karboxil-oldalláncoknak tulajdonítható. Mennyiségi meghatározásra azonban ez a hullámhossz tartomány csak rendkívül tiszta oldatok esetén használható, mert ebben a tartományban számos más anyag nagy mértékben elnyel.

## A gyakorlat kivitelezése

*A fotométer használati útmutatója a készüléknél található*

### 1. Fehérjék mennyiségi meghatározása

#### 1.a: Biuret-módszer

##### Anyagok:

- Biuret-reagens
- **5 mg/ml BSA, referenciaoldat**
- ismeretlen fehérjeoldat

##### Eljárás:

1. Számozzunk meg 8 pár kémcsövet! Az első öt pár csőbe mérjük rendre 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, és 2,0 ml 5 mg/ml-es BSA-oldatot. A következő két pár csőbe mérjük 0,4 és 1,0 ml ismeretlen koncentrációjú fehérjeoldatot, az utolsó két csőbe pedig ne tegyünk fehérjeoldatot (ez lesz a referencia oldat)!
2. A térfogatot egészítsük ki 3 ml-re számított mennyiségű desztillált víz hozzáadásával minden egyes csőben.
3. Adjunk minden csőhöz 2 ml Biuret-reagenst, erősen keverjük meg őket kémcsőkeverővel (vortex).
4. 30 percig inkubáljuk (szobahőmérsékleten állni hagyjuk), majd meghatározzuk az abszorbanciát 540 nm-en.
5. Az utolsó két csövet használjuk referenciaoldatként, ezek fényelnyelését vonjuk ki a mért értékekből.

**Feladat: Ábrázoljuk az abszorbancia értékeket a fehérjemennyiség (mg) függvényében, majd ennek alapján határozzuk meg az ismeretlen oldat fehérjekoncentrációját (mg/ml)!**

#### 1.b: Bradford-módszer

##### Anyagok:

- Bradford-reagens
- **0,5 mg/ml BSA, referenciaoldat**
- 0,15M-os NaCl oldat

*A Bradford módszernél csak vadonatúj pipettahegyeket használjunk, mert a mosott hegyeken maradhat némi detergens, ami meghamisítja a mérést! Továbbá, mivel ez*

*a módszer igen érzékeny fehérje szennyezésekre is, ügyeljünk arra, hogy sem a pipetták hegyét, sem az Eppendorf csövek kupakjának belső oldalát ne érintsük!*

**Eljárás:**

- 1) 4 pár Eppendorf-csőbe mérjük be 5, 10, 15 és 20  $\mu\text{l}$  0,5 mg/ml-es BSA-t ill. 3 pár Eppendorf csőbe 5, 10 és 20  $\mu\text{l}$  ismeretlen koncentrációjú fehérjeoldatot, és 0,15 M-os NaCl-oldattal egészítsük ki a térfogatukat 100  $\mu\text{l}$ -re. Egy-egy Eppendorf-csőbe mérjük be 100  $\mu\text{l}$  0,15 M-os NaCl-oldatot (ez a referenciaoldat).
- 2) *Vadonatúj 1 ml-es pipettahegyeket használva* adjunk minden csőhöz 1 ml Bradford-reagenst, és alaposan keverjük össze.
- 3) Mérjük meg 595 nm-en a fényelnyelést 1 ml-es küvettában a desztillált vízzel szemben.

A standard görbét úgy vesszük fel, hogy ábrázoljuk az 595 nm-en mért, *a referenciaoldat fényelnyelésével csökkentett abszorbancia értékeket* a BSA fehérje mikrogrammokban megadott mennyiségének függvényében.

**Feladat: Határozzuk meg a standard görbe és az ismeretlen fehérjére kapott abszorbancia alapján a fehérjeoldat koncentrációját (mg/ml)!**

## **2. Különböző biomolekulák spektrofotometriája**

Az alábbi minták egy részét törzsoldatokból kell elkészíteni. Ezek felsorolását lásd a fejezet végén. A hígításhoz desztillált vizet kell használni.

Referenciaként minden méréshez desztillált vizet használjunk.

*Az egyes anyagok neve előtti koncentrációk mindig az elkészített mintában lévő végkoncentrációjukat jelentik.*

### **2.a: tirozin és triptofán elnyelési spektruma**

1. minta:   készen kapják  
              100  $\mu\text{M}$  tirozin  
              0,1 M foszfát puffer pH 7,5
2. minta:   készen kapják  
              100  $\mu\text{M}$  triptofán  
              0,1 M foszfát puffer pH 7,5  
              Hullámhossz tartomány: 240-320nm

### **2.b: egy fehérje, a szarvasmarha-szérumalbumin elnyelési spektruma**

3 ml minta: a feladatleírás végén felsorolt törzsoldatokból készítendő  
0,5 mg/ml szarvasmarha-szérumalbumin (BSA)  
0,1 M NaCl  
0,01 M foszfát-puffer pH 7,5  
Hullámhossz tartomány: 240-320nm

### **2.c: DNS elnyelési spektruma**

3 ml minta: a felsorolt törzsoldatokból készítendő  
25 µg/ml DNS  
0,1 M NaCl  
0,01 M foszfát puffer pH 7,5  
Hullámhossz tartomány: 240-320nm

Törzsoldatok: 3M NaCl  
0,1 M foszfát puffer, pH 7,5  
5 mg/ml szarvasmarha-szérumalbumin (BSA)  
1 mg/ml DNS

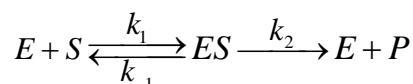
**Feladatok: Értékelje ki az egyes spektrumokat, és az előadásokon tanultak alapján határozza meg, hogy az egyes abszorpciós maximumok a molekula melyik részletének tulajdoníthatók, valamint a koncentrációk ismeretében számolja ki a moláris abszorpciós koefficienseket ( $\epsilon$ )!**



## Enzimkinetikai bevezetés a 2. és 3. gyakorlathoz

Az élő szervezetben a kémiai reakciók enzimek segítségével játszódnak le. Ezek a katalitikus reakciók nagy specifitást mutatnak az egyedi reakcióutakra és szubsztrátokra nézve. Néhány szubsztrát kovalens intermedierben kötődik az enzimhez, mások nem.

Az enzimreakciók alapmodellje, a Michaelis-Menten kinetika a reakciót két egymást követő elemi lépésre bontja. Az elsőben kialakul az enzim-szubsztrát komplex, a másodikban a termék távozik az enzimről.



A reakció általános sebességi egyenlete:

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (1.)$$

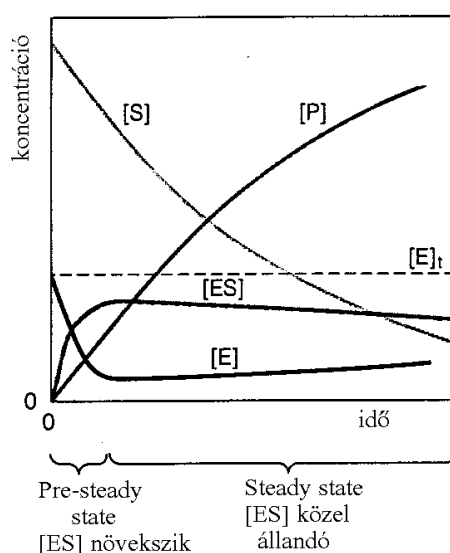
A modellnek megfelelően, ha a szubsztrátkoncentráció elég nagy ahhoz, hogy az összes enzim komplexbe kerüljön, a termék képződés lesz a sebesség meghatározó lépés, vagyis a szubsztrát koncentrációjának további növelése már nem befolyásolja a reakció sebességét.

Az enzim-szubsztrát komplex keletkezésének sebességét a teljes szubsztrátkoncentráció-tartományban a következő egyenlet írja le:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (2.)$$

Ezt az egyenletet nem lehet expliciten integrálni, csak egyszerűsítések után oldható meg.

*Steady-state (állandósult állapot) megközelítés (Briggs és Haldane)*



1. ábra

A 1. ábrán látható a reakció különböző résztvevőinek koncentrációváltozása a reakció előrehaladtával, ha a szubsztrát koncentrációja sokkal nagyobb, mint az enzimm koncentráció. Az átmeneti fázisnak (pre-steady-state) nevezett kezdeti szakasz után (amely olyan rövid, hogy csak speciális technikákkal detektálható, így a laborgyakorlaton nem találkozunk vele) az  $[ES]$  közelítőleg konstans marad mindaddig, amíg a szubsztrát koncentráció nem csökken jelentősen. Ilyenkor ugyanis az ES keletkezésének sebessége megegyezik az ES bomlásának a sebességével, vagyis az  $[ES]$  steady-state, azaz állandósult állapotban van:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (3.)$$

Vegyük észre, hogy míg az előző modell egy termodinamikai egyensúlyt vezetett be, ez a modell egy folyamatos átalakulást (stacionárius állapotot) vezet be, ahol csak a fenti feltételek teljesülésekor, tehát csak egy bizonyos ideig állandó az  $[ES]$ .

Ebből a megközelítésből kiindulva levezethető a kezdeti reakciósebességet ( $V_0$ ) kifejező egyenlet:

$$V_0 = \left\langle \frac{d[P]}{dt} \right\rangle_{t=0} = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad (4.)$$

ahol

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (5.)$$

A  $K_M$  az úgynevezett Michaelis konstans.

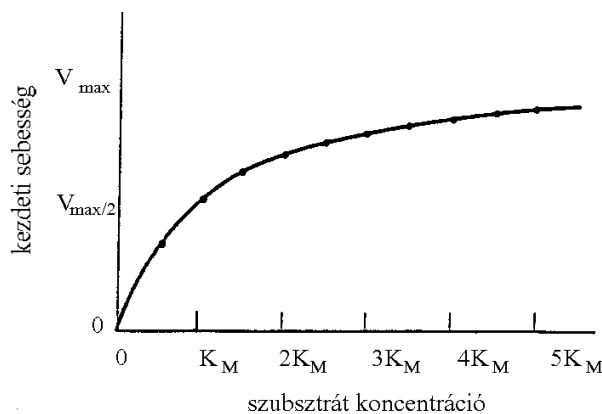
Kezdeti sebességet határozunk meg, ezért legfeljebb annyi ideig mérjük a reakció zajlását, amíg a szubsztrátnak még csak kevesebb, mint 10%-a alakult át terméké, vagyis a szubsztrát koncentráció, és ezért a sebesség, praktikusán még a kiindulásinak (állandónak) tekinthető. A maximális sebességét a reakció akkor éri el, amikor a szubsztrát koncentráció elég magas ahhoz, hogy minden enzim molekulát komplexbe vigyen. Ez a telítési állapot, ahol  $[ES] = [E]_T$ .

$$V_{max} = k_2 [E]_T \quad (6.)$$

Így a kezdeti sebességet felírhatjuk a (4.) és (6.) kombinálásával:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (7.)$$

Ez az egyenlet az enzimkinetika alapegyenlete, a Michaelis-Menten egyenlet. Ahogy a 2. ábra mutatja, egy hiperbolát ír le a függvény.



2. ábra

A Michaelis konstansnak van egy egyszerű gyakorlati jelentése. Azon a szubsztrátkoncentráción ahol  $[S]=K_M$  a (7.) alapján:  $V_0=V_{max}/2$ . Tehát a  $K_M$  számértéke megadja azt a szubsztrátkoncentrációt, ahol a reakció sebessége eléri a maximálisan elérhető sebesség felét. Ebből következik, hogy ha egy enzim kis  $K_M$  értékkel rendelkezik, akkor már kis szubsztrátkoncentrációnál eléri a maximális katalitikus hatását.

Definiálható az enzim katalitikus konstansa is, a  $k_2$ . Ez az érték jelzi, hogy egyetlen enzim molekula (egyetlen aktív hely) hány reakciót tud katalizálni egységnyi idő alatt. A katalitikus konstans kifejezésre emiatt az „átviteli szám” kifejezést is használják. A Briggs és Haldane megközelítését megelőzően Michaelis és Menten  $k_{cat}$  jelölést használt, de néhány bonyolultabb echanizmusú enzimreakciótól eltekintve  $k_{cat}=k_2$ .

Definiáljuk még a  $\frac{k_{cat}}{K_M}$  értéket (specifitási konstans), mely a katalitikus hatékonyságot jellemzi, mivel ez az adat mutatja meg, hogy nagyon alacsony szubsztrátkoncentráció esetén mennyire hatékony az enzim.

### A kinetikai paraméterek meghatározása

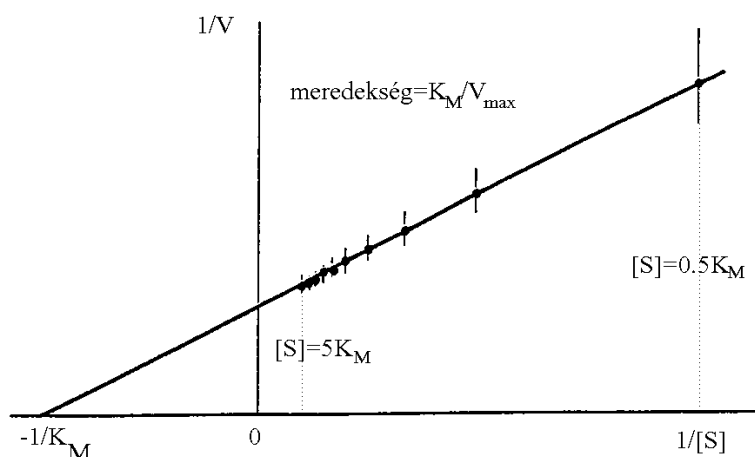
Számos módszer van a Michaelis-Menten egyenlet paramétereinek meghatározására. Nagyon nagy szubsztrátkoncentráció esetén  $V_0$  aszimptotikusan közelít  $V_{max}$  - hoz, a gyakorlatban azonban nagyon nehéz pontosan meghatározni a  $V_{max}$  -ot a  $V_0$  -  $[S]$  függvényből (2. ábra.)

#### A kettős reciprok módszer

Hans Lineweaver és Dean Burk javasolt egy módszert  $K_M$  és  $V_{max}$  értékeinek meghatározására. Ha felírjuk a Michaelis-Menten egyenlet reciprokát:

$$\frac{1}{V_0} = \left\langle \frac{K_M}{V_{max}} \right\rangle \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (12.)$$

akkor  $1/V_0$ -t  $1/[S]$  függvényében ábrázolva lineáris függvényt kapunk melynek meredeksége  $K_M/V_{max}$ , az  $1/V_0$  tengelymetszete  $1/V_{max}$ , az  $1/[S]$  tengelymetszete pedig  $1/K_M$  (3. ábra).



3. ábra: Lineweaver-Burk félé kettős reciprok ábrázolás

A Lineweaver-Burk félé ábrázolás előnye, hogy az adatsorhoz történő egyenes illesztés egyszerűen elvégezhető. Nagy hátránya viszont az, hogy a kettős reciprok ábrázolás miatt a legkisebb szubsztrátkoncentrációknál mért, elkerülhetetlenül nagyobb hibával meghatározott pontok dominálnak az egyenes illesztésénél. Ennek következtében mind a  $V_{max}$ , mind a  $K_M$  értéke bizonytalan lehet.

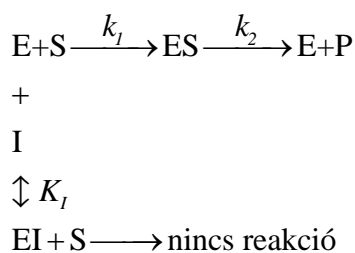
### Enzimátlás

Egy-egy adott enzim esetében rendszerint számos olyan anyag ismert, mely befolyásolja annak működését úgy, hogy megváltoztatja a szubsztrát kötődését és/vagy az enzim katalitikus hatékonyságát. Azokat az anyagokat melyek ilyen módon csökkentik az enzim aktivitását, inhibitoroknak nevezzük.

#### *Kompetitív inhibíció*

Azokat az anyagokat, amelyek reverzibilisen kötődnek az enzim szubsztrátkötő részéhez "kiszorítva" onnan a valódi szubsztrátot, kompetitív (versengő) inhibitoroknak nevezzük. Ezek a vegyületek olyan molekulák, melyek szerkezetükben hasonlítanak a szubsztráthoz de nem, vagy csak nagyon lassan vesznek részt reakcióban. Mivel ezek a molekulák rendszerint hasonlítanak a szubsztráthoz, az ilyen inhibitorokat általánosan használják az enzim szubsztrátkötő régiójának, a szubsztrátkötés mechanizmusának vizsgálatára.

A kompetitív inhibíció általános modellje a következő reakciósémán látható:



ahol I inhibitor gyors egyensúlyban reverzibilisen kötődik az enzimhez, így:

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (14.)$$

és EI az enzim-inhibitor komplex, amelyben az enzim inaktív.

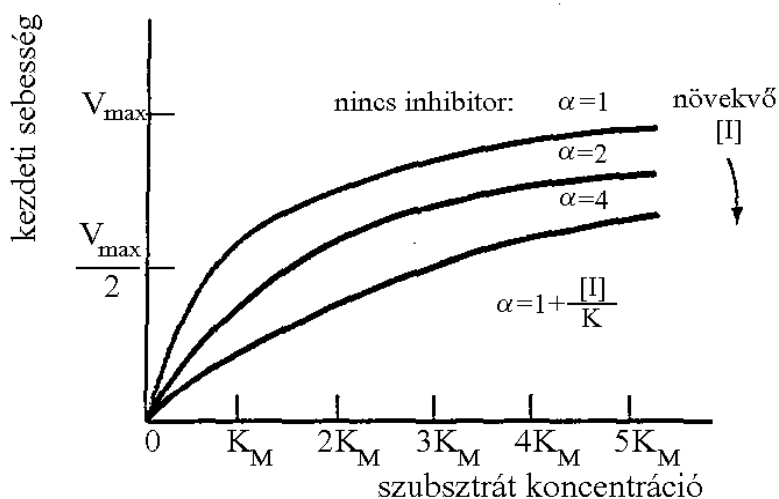
Ha kifejezzük  $V_0$ -t a mérhető paraméterekkel, a következő egyenletet kapjuk:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{aK_M + [S]} \quad (15.)$$

ahol:

$$\alpha = \frac{[I]}{[K_I]} \quad (16.)$$

Az  $\alpha$  mindig nagyobb, mint 1, mivel az aktuálisan mért  $K_M$  kompetitív inhibitor jelenlétében mindig nagyobb, mint inhibitor nélkül: a versengő inhibitor jelenlétében magasabb szubsztrátkoncentráció kell a fél-maximális reakciósebesség eléréséhez, mint inhibitor nélkül. (4. ábra)

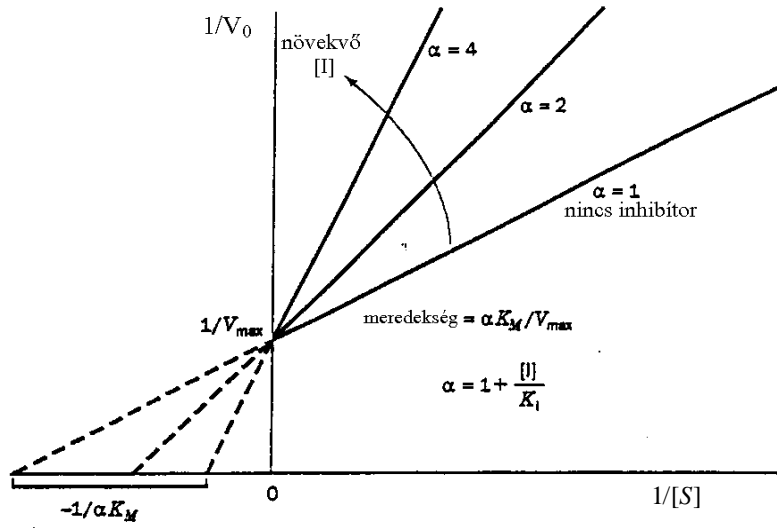


4. ábra

A 15. egyenlet reciprokát felírva az alábbi egyenletet kapjuk.

$$\frac{1}{V_0} = \left\langle \frac{\alpha K_M}{V_{max}} \right\rangle \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (17.)$$

Ezt ábrázolva egy lineáris függvényt kapunk, melynek meredeksége  $\alpha K_M / V_{max}$ ,  $1/[S]$  tengelymetszete  $-1/\alpha K_M$ ,  $1/V_0$  tengelymetszete pedig  $1/V_{max}$ . Különböző inhibitor-koncentráció mellett felvéve a függvényt mindig azonos  $1/V_{max}$  tengelymetszetet kapunk, ami megkülönbözteti a kompetitív inhibitorot más jellegű inhibitoroktól.  $K_I$  kiszámolható a 15. egyenletből. (5. ábra)



5. ábra: Kompetitív gátlás Lineweaver-Burk fële kettős reciprok ábrázolása

## 2. GYAKORLAT

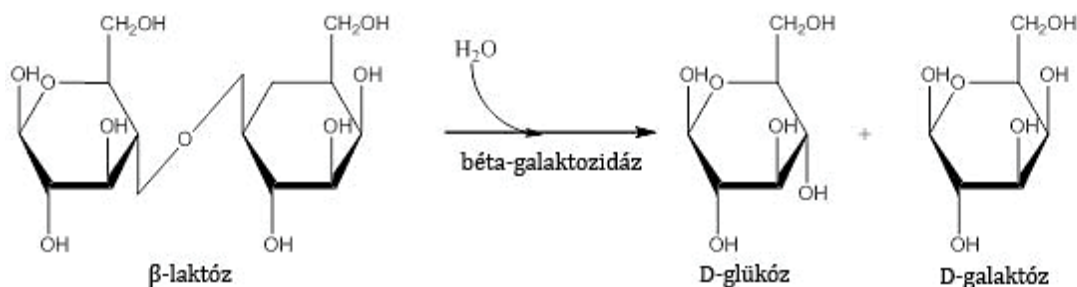
### A $\beta$ -galaktozidáz enzim preparálása és aktivitásának mérése csíráztatott búza levélből

#### Bevezetés

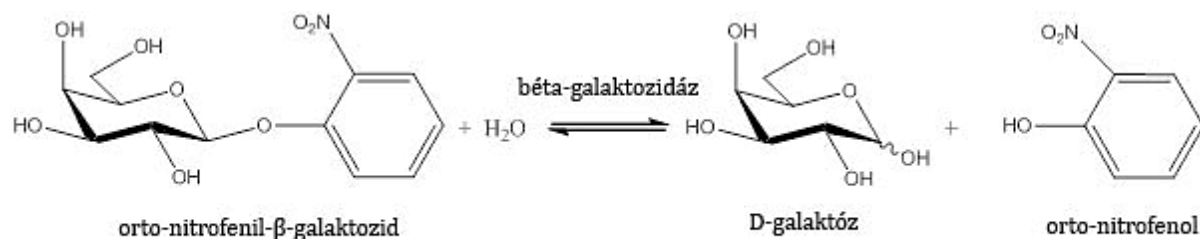
##### A $\beta$ -galaktozidáz enzmről és aktivitásának méréséről

A növényi  $\beta$ -glükozidázok sokféle  $\beta$ -glükozid hidrolízisét katalizálják. A  $\beta$ -galaktozidáz olyan hidroláz és exoglikozidáz enzim, ami a diszacharid  $\beta$ -glikozidos kötését hasítja monoszachariddá. Szerepet játszhat a sejtfa vastagodásában, a lignin bioszintézisben való részvétele alapján, a mikrobiális fertőzések által kiváltott védekező reakcióban, tartalék szénhidrátok mobilizálásában, hormonok koncentrációjának szabályozásában glükozil konjugátumaik hidrolízise révén stb.

Az enzim aktivitásának mérése természetes szubsztrátok használatával igen nehézkes, ezért erre a célra szintetikus szubsztrátot fejlesztettek ki. Az általunk használt szintetikus szubsztrát (p-nitrofenil  $\beta$ -D-glükozid, PNPG) hasadása során glükóz és nitrofenol szabadul fel. A p-nitrofenolnak 410 nm-en elnyelési maximuma van, így ezen a hullámhosszon követjük a reakció előrehaladását.



2.1. ábra: A  $\beta$ -galaktozidáz természetes szubsztráton történő hasítása



2.2. ábra: A  $\beta$ -galaktozidáz mesterséges szubsztráton (ONPG) történő hasítása

A gyakorlaton, az ábrán feltüntetett mesterséges szubsztrát analógot a PNPG-t használjuk, ami nem orto, hanem para-nitrofenolt eredményez.

## A gyakorlat kivitelezése

### Anyagok és eszközök:

- búzalevél
- polivinil-pirrolidon
- 50 mM citrát puffer pH =5,0  
Elkészítése: 4,31 g citromsav és 8,68 g  $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$  1000 ml-ben desztillált vízben oldva
- 200 mM p-nitrofenil  $\beta$ -D-glükózid N,N-dimetilformamidban oldva (PNPG)  
a p-nitrofenol moláris extinkciós koefficiense 410 nm-en:  $\epsilon_{410}=17500M^{-1}s^{-1}$
- 25 mM glükono-D-lakton 50 mM citrát pufferben oldva
- 100 mM  $Na_2CO_3$
- 2 mM-os, 20mM-os és 40mM-os-os PNPG
- asztali táramérleg
- porcelán dörzsmozsár
- asztali Eppendorf centrifuga
- 37°C-os termosztát (vízfürdő)
- spektrofotométer

### A mérés menete:

1. Friss csíráztatott búzalevélből asztali táramérlegben kimértünk 0,5 g-ot.
2. 1 v/v %-os polivinil-pirrolidon oldatot készítünk 10 ml citrát pufferben, majd dörzsmozsárban elhomogenizáljuk benne a korábban kimért 0,5 g búzalevelet.
3. A homogenizátummal megtöltünk két Eppendorf-csövet, majd 5 percig centrifugáljuk asztali centrifugán maximális fordulatszámom. A tiszta felüliszót pipettával óvatosan leszívjuk, átviszük kétszeresére hígított citrát pufferrel egy tiszta kémcsőbe és jégre helyezzük. A továbbiakban ezzel az enzimpreparátummal dolgozunk.
4. A mérésekhez a szükséges számú Eppendorf-csöveket megszámozzuk (lásd az alábbi táblázatokat). A reakcióelegy komponenseit a táblázatokban megadott sorrendben a csövekbe pipetázzuk, **a szubsztrát vagy az enzim extraktum kivételével**. A reakciót ezek hozzáadásával indítjuk, gyors keverés (vortexel) után a csöveket 37°C-on inkubáljuk. 15 perc után a reakciót 1ml  $Na_2CO_3$  hozzáadásával állítjuk le. A méréshez **szubsztrátot nem tartalmazó kontrollokat is készítünk**.
5. A kémcsövek tartalmát egyesével átöntjük a küvettába és a fotométerbe helyezzük. A kialakult sárga színt 410 nm-en fotometráljuk. A mérésekhez készített **kontollok abszorbancia értékeit mérjük le elsőként!** Mivel maga az enzimpreparátum is jelentős elnyelést mutat 410 nm-en, ezért a minták abszorbancia értékeiből a kontrollnak megfelelő értéket majd rendre le kell vonjuk.

A 15 perc inkubációs enzim reakció alatt bekövetkezett abszorbancia változásból — vagyis a görbe meredekségéből — a termék moláris extinkciós koefficiense segítségével kiszámítjuk a reakciók kezdeti sebességét ( $V_0$ ) [ $\mu M/min$ ] egységben.



## 1. A reakciósebesség függése az enzim koncentrációjától

Mivel az öt mintában különböző az enzimpreparátum mennyisége, mindegyikhez külön kontrollokat készítünk. Ezek esetében a szubsztrát helyett is puffert adunk a reakcióelegyhez!

*A reakciót a szubsztrát (PNPG) hozzáadásával indítjuk!* Gyors keverés után a csöveket 37°C-on inkubáljuk.

A reakcióelegyek összetétele:

	1.	2.	3.	4.	5.
citrát puffer	50 µl	40 µl	30 µl	20 µl	-
enzim preparátum	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	60 µl
20 mM PNPG	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl

A kontrollok:

	1.	2.	3.	4.	5.
citrát puffer	110 µl	100 µl	90 µl	80 µl	60 µl
enzim preparátum	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	60 µl

15 perc után a reakciót 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hozzáadásával állítjuk le, majd mérjük az abszorbancia értékeket!

**Feladat:** Ábrázoljuk a kezdeti sebességet ( $V_0$ ) [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ] egységben a bemért enzimpreparátum térfogatának ( $\mu\text{l}$ ) függvényében! Hogyan függ a reakció kezdeti sebessége az enzimkoncentrációtól?

## 2. A reakciósebesség függése a szubsztrát koncentrációjától

0,167-20 mM szubsztrát koncentráció tartományban mérjük a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitását. Az első minta nem tartalmaz szubsztrátot, ez a kontroll.

*A reakciót az enzim extraktum hozzáadásával indítjuk!* Gyors keverés után a csöveket 37°C-on inkubáljuk.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
	<b>Kontroll</b>	<b>Reakcióelegyek</b>					
citrát puffer	90 µl	75 µl	60 µl	80 µl	70 µl	60 µl	60 µl
2 mM PNPG	-	15 µl	30 µl	-	-	-	-
20 mM PNPG	-	-	-	10 µl	20 µl	30 µl	-

40 mM PNPG	-	-	-	-	-	-	30 µl
enzim preparátum	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

15 perc után a reakciót 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hozzáadásával állítjuk le, majd mérjük az abszorbancia értékeket 410 nm hullámhosszon! (Ne feledjük a kontrol abszorbancia értékével korrigálni a többi abszorbanciát!)

**Feladatok:** Ábrázoljuk a kezdeti sebességet ( $V_0$ ) a szubsztrát koncentráció  $[S]$  függvényében, majd készítsük el a kettős reciprok ábrázolást is (Lineweaver–Burk ábrázolás), vagyis ábrázoljuk a kezdeti sebesség reciprokát a szubsztrát koncentráció reciprokának függvényében! Az ábrák segítségével határozzuk meg a maximális reakciósebességet ( $V_{max}$ ) [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ] egységben és a  $\beta$ -galaktozidáz Michaelis konstansát ( $K_M$ ) [ $\text{mM}$ ] egységben!

### 3. Enzimaktivitás gátlásának vizsgálata

Az első minta nem tartalmaz szubsztrátot, ez a kontroll.

A reakciót az enzim extraktum hozzáadásával indítjuk! Gyors keverés után a csöveket 37°C-on inkubáljuk.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
	<b>Kontroll</b>	<b>Reakcióelegyek</b>					
citrát puffer	70 µl	55 µl	40 µl	60 µl	50 µl	40 µl	40 µl
25 mM glükono-D-lakton	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
2 mM PNPG	-	15 µl	30 µl	-	-	-	-
20 mM PNPG	-	-	-	10 µl	20 µl	30 µl	-
40 mM PNPG	-	-	-	-	-	-	30 µl
enzim preparátum	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

15 perc után a reakciót 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hozzáadásával állítjuk le, majd mérjük az abszorbancia értékeket 410 nm hullámhosszon! (Ne feledjük a kontrol abszorbancia értékével korrigálni a többi abszorbanciát!)

**Feladatok:** Ábrázoljuk az inhibitor jelenlétében és hiányában kapott mérési eredményeket egy grafikonon: ábrázoljuk a kezdeti sebességeket ( $V_0$ ) [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ] egységben a szubsztrát koncentráció [ $\mu\text{M}$ ] függvényében, majd készítsük el a kettős reciprok ( $1/V_0$  - $1/[S]$ ) ábrázolást is! A grafikonok segítségével állapítsuk meg a gátlás típusát, továbbá a 2. és 3. fejezethez írt enzimkinetikai bevezető 15. és 16. egyenlete segítségével számítsuk ki a glükono-D-lakton inhibitor  $K_I$  értékét!

### 3. GYAKORLAT

#### Tripszin aktivitásának mérése mesterséges szubsztráttal

##### Bevezetés

##### A mérés elvi alapja

A tripszin a hasnyálmirigy által termelt enzim, mely a peptidkötések hidrolízisét katalizálja. A specifitásáért felelős kötőzsebe negatív töltésű, ezért a bázikus aminosavak karboxil csoportjánál hasítja a peptidkötéseket. A tripszin nem csak természetes fehérjék peptidkötéseit hasítja, hanem szintetikus vegyületek amid, sőt észter kötéseit is. A tripszin tehát fehérjebontó enzim, és mivel maga is fehérje, a tripszin molekulái képesek egymás peptidkötéseinek elhasítására, ami végül az enzim inaktiválódásához vezet. Ennek elkerülésére a tripszint olyan (általában savas) oldatban tároljuk, amelyben aktivitása csaknem nulla.

Az általunk használt szintetikus szubsztrát hasadása során *para*-nitroanilin szabadul fel. A *para*-nitroanilinnak 405nm-en elnyelési maximuma van, így ezen a hullámhosszon követhetjük a reakció előrehaladását.

Az enzimreakciókat kétféleképpen indíthatjuk. Utoljára vagy a szubsztrátot, vagy az enzimet mérjük be. Mint említettük, a tripszin képes lebomlani, ezért a reakciót általában a savas közegben tárolt enzim adásával indítjuk el.

Kivételt képez ez alól a 3. feladat (gátlás természetes inhibitorral). A tripszin-STI komplex lassan alakul ki, ezért a 2 ml pufferbe először bemérjük az inhibítort és a tripszint, majd 20 perc inkubálás után a szubsztrát hozzáadásával indítjuk a reakciót.

#### A gyakorlat kivitelezése

##### Anyagok:

- 0,1 M benzoil arginin *para*-nitroanilid (BAPNA) dimetilszulfoxidban (DMSO) oldva
- 5 mg/ml tripszin 1 mM HCl-ban (Ms: 25.000)
- 0,5 mg/ml szójabab tripszin inhibitor (STI; Ms: 22.500)
- 50 mM Trisz-HCl puffer pH = 7,0, 8,0, 9,0
- 50 mM MES puffer pH 6,0
- 50 mM borát puffer pH 10,0, 11,0

A hullámhossz: 405 nm, a termékként keletkező *para*-nitroanilin moláris extinkciós koefficiense:  $\epsilon_{405} = 8100 \text{ l}/(\text{M}\cdot\text{cm})$ . A fotométer használatát lásd a készülék melletti tájékoztatón.

A háromféle mérés során először mérjük 2ml megfelelő pH-jú puffert kisméretű kémcsőbe. Ezután mérjük ebbe bele a szubsztrátot illetve a gátlószert és keverjük össze vortex készülékkel. A reakciót, közvetlenül a mérés megkezdése előtt, mindig az enzim hozzáadásával indítjuk. Azonnali keverés után az oldatot haladéktalanul öntsük át



### 3. feladat: mérjen tripszin-gátlást természetes inhibitorral

Mérje a tripszin aktivitását növekvő koncentrációjú szójabab tripszin inhibitor jelenlétében!

A reakcióelegyek összetétele (minden ponton két párhuzamos mérést végzünk!):

	1-2.	3-4.	5-6.	7-8.	9-10.	11-12.	13-14.
50 mM Trisz-HCl pH 8,0	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml
0,5mg/ml STI	-	5 µl	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl
tripszin	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
	20 perc inkubáció szobahőmérsékleten						
0,1 M BAPNA	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

**Feladatok:** Határozza meg a kezdeti sebességeket. Ábrázolja a kezdeti sebességet ( $V_0$ ) az inhibitor-koncentráció ( $[I]$ , nM) függvényében! Határozza meg az 50%-os gátláshoz ( $V_0=V_{max}/2$ ) tartozó inhibitor-koncentrációt (nM), és az ehhez tartozó  $[I]/[E]$  arányt, valamint a 2. és 3. fejezethez írt enzimkinetikai bevezető 15. és 16. egyenlete segítségével számítsuk ki a glükono-D-lakton inhibitor  $K_I$  értékét!.

## Bevezetés a gélelektroforetikus technikákhoz (4. és 5. gyakorlat)

### Az elektroforézisről általában

Az elektroforetikus módszerekkel töltött részecskéket választunk el egymástól elektromos tér alkalmazásával. Elektroforézis során egy-egy elektród külön-külön, egy-egy puffertartályba merül. A két puffertartály között töltött részecskék számára átjárást biztosítunk. Ha a két elektród között egy elektromos tápegységgel elektromos potenciálkülönbséget, tehát feszültséget hozunk létre, akkor ennek hatására elektronok áramlanak az anód felől a katód felé. A katódra kerülő elektronokat vízmolekulák veszik fel, hidrogéngáz és hidroxil-ionok keletkeznek. Az anódon eközben vízmolekulák adnak le ugyanannyi elektront, oxigéngáz keletkezik, és protonok (illetve ezek vízmolekulákra kerülésével hidroxónium-ionok) keletkeznek. A két puffertartály között töltött részecskék számára átjárást biztosító összeköttetésen a pozitív töltésű ionok (kationok) a negatív katód felé, a negatív töltésű ionok (anionok) pedig a pozitív anód felé vándorolnak. Az egyes ionok eltérő töltésük és méretük miatt eltérő sebességgel vándorolhatnak, tehát így elválaszthatók egymástól. A vándorlás sebességét befolyásoló legalapvetőbb fizikai összefüggések ismerete rendkívül fontos annak megértéséhez, hogy egy konkrét elektroforetikus eljárás esetén az egyes molekulák miért lesznek eltérő sebességűek, milyen elven választhatók el egymástól.

A töltéssel rendelkező testre a „ $q$ ” töltés és az „ $E$ ” elektromos térerő szorzatával egyenlő  $F_e$  elektromos erő hat.

$$F_e = q \times E$$

A vándorló részecskére kis sebességnél a sebességgel ( $v$ ) egyenesen arányos  $F_k$  közegellenállási erő hat. Az  $F_k$  a közegre és a részecskére vonatkozó információkat egyaránt tartalmazó közegellenállási együtthatóval ( $f$ ) fejezhető ki. Minél nagyobb a részecske, és minél „akadályozóbb” a közeg, annál nagyobb az ( $f$ ) értéke. Gélelektroforézisnél az ( $f$ ) értéke a gél pórusméretével szabályozható.

$$F_k = f \cdot v$$

Az elektroforézis elindításakor a részecske (egy pillanat alatt) addig gyorsul fel, míg a közegellenállási erő nagysága eléri az (ellentétes irányú) elektromos erő nagyságát. A részecske innen egyenesen sebességgel halad ( $F_e = F_k$ , tehát  $F_{eredő} = 0$ ).

$$q \cdot E = f \cdot v$$

A részecske elektroforetikus mozgékonyasága egyenesen arányos a töltésével ( $q$ ), és fordítottan arányos a közegellenállási együtthatóval ( $f$ ).

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

Az *eltérő mozgékonyaságú töltött részecskék az elektroforézis során tehát elválaszthatók egymástól, ezen alapulnak a különböző gélelektroforézis eljárások.*

A biokémiai és molekuláris biológiai felhasználás során gélelektroforézissel a töltéssel rendelkező makromolekulák közül leginkább a fehérjék és a nukleinsavak elválasztása a cél. Az ezekkel kapcsolatos eljárásokat mutatja be ez a gyakorlat.

## **A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)**

### **A) A PAGE módszerről általában**

A különböző fehérjékben a disszociációra képes, tehát savas (mint az Asp, a Glu és kisebb mértékben a Cys és Tyr) illetve bázikus (mint az Arg, Lys és His) aminosavak száma eltérő. Ennek köszönhetően az egyes fehérjék egy adott pH-n eltérő töltéssel rendelkeznek. Ha vizes oldatban elektromos erőtér alkalmazásával a fehérjéket vándorlásra készítjük, az egyes fehérjék eltérő relatív töltésük (egységnyi molekulatömegre eső töltések száma) miatt eltérő mozgékonyással rendelkeznek, vagyis azonos térerő mellett eltérő sebességgel mozognak, tehát egymástól elválaszthatók.

Fehérjék elektroforetikus elválasztására a leginkább elterjedt, rendkívül hatékony módszer a poliakrilamid gélben végzett elektroforézis, illetve ennek számos változata.

Az akrilamid vizes oldatban, megfelelő katalizátorok és iniciátorok jelenlétében gyökös polimerizációra képes, és a reakció során nagy mólsúlyú lineáris polimer, ún. poliakrilamid keletkezik. Ha megfelelő keresztkötő ágenszt, N,N-metilén-bisz-akrilamidot is alkalmazunk, a hosszú poliakrilamid láncok között "hidak" képződnek, és térhálós szerkezetű gél jön létre. Az elektroforézis során a fehérjéket ebben a gélben vándoroltatjuk.

Az eljárás különlegesen nagy felbontóképességgel rendelkezik. Ennek az oka az, hogy a relatív töltések különbségén alapuló szeparálással egyidőben a gélben a molekulák méret és alak szerint is elválnak egymástól, a gél mintegy molekulaszűrőként viselkedik. Ezt a molekulaszűrő hatást a gél átlagos pórusmérete szabja meg, ami viszont az akrilamid-monomer koncentrációjának és a térhálósító metilén-bisz-akrilamid százalékos arányának alkalmas megválasztásával tág határok között változtatható. A gél mechanikus tulajdonságai kb. 4-20% akrilamid koncentráció-tartományban kedvezőek. A keresztkötő metilén-bisz-akrilamid mennyisége az alkalmazott akrilamid-monomernek rendszerint 1-3%-a. A poliakrilamid számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik. Hidrofil, ugyanakkor nem tartalmaz töltéssel rendelkező csoportokat, melyek az elektroforetikus szeparálást károsan befolyásolnák. Kémiailag közömbös, stabil vegyület, az elválasztandó fehérjékkel nem lép specifikus kölcsönhatásba, nem zavarja a fehérjék detektálására szolgáló festési reakciókat, kompatibilis a legtöbb általánosan használt pufferrendszerrel. Ha az elektroforézist natív (nem-denaturáló) közegben, alacsony hőmérsékleten végezzük, számos enzim megőrzi natív szerkezetét és így aktivitását, ami alapján a gélben specifikusan kimutatható.

A poliakrilamid gél úgy készül, hogy az igény szerinti koncentrációjú akrilamid/metilén-bisz-akrilamid oldathoz megfelelő pH-jú pufferoldatot keverünk, majd elindítjuk a gyökös polimerizációt egy alkalmas katalizátor és iniciátor hozzáadásával. A katalizátor általában peroxidiszulfát, mely vizes közegben spontán bomlik, ezáltal szabad gyökök keletkeznek. A leggyakrabban használt iniciátor a tetrametil-etilén-diamin (TEMED). A katalizátor és az iniciátor koncentrációját úgy választjuk meg, hogy a polimerizáció, és így a gélesedés 10-30 perc alatt teljes mértékben végbemenjen. A gél

két egymással párhuzamos üveglap között hozzuk létre. Így egy géllemez alakul ki, amelyben egyidejűleg, egymás mellett, azonos körülmények között, számos mintát futtathatunk, amelyek ily módon egymással könnyen összehasonlíthatók.

Amennyiben a fehérjéket módosító kezelés nélkül (natív körülmények között) akarjuk vizsgálni, akkor elektroforézis sikerét nem csak az akrilamid koncentráció helyes megválasztása hanem pH is döntő mértékben befolyásolja. Rendszerint az izoelektromos pontnál magasabb pH-n dolgozunk. Ekkor a fehérjék negatív töltésűek, így az anód felé vándorolnak. A puffer szerepe nemcsak abban áll, hogy az elektroforézis ideje alatt a pH-t állandó értéken tartja, hanem a puffer ionjai végzik az áram vezetését is. Normális esetben a fehérjeionok az áram vezetésében csak elhanyagolható mértékben vesznek részt, vagyis a fehérjék átviteli száma kicsi. Ha azonban a puffer koncentrációja túl alacsony, megnő a fehérjék szerepe az áram vezetésében, ami általában elkenődött fehérjesávokat eredményez. Az optimálisnál magasabb pufferkoncentráció esetén viszont túl kicsi lesz a fehérjék mobilitása, ami szintén rontja az elválasztás minőségét.

Az alkalmazott pufferrendszerek szempontjából a gélelektroforetikus technikákat két nagy csoportba osztjuk. Folytonos (kontinuus) pufferrendszerről beszélünk, amikor ugyanazt a puffer rendszert alkalmazzuk a gélben, mint az elektródokat tartalmazó puffer tankokban. Ennek a módszernek a felbontóképessége valamivel rosszabb, mint a jóval bonyolultabb ún. diszkontinuus pufferrendszereket alkalmazó módszereké.

A diszkontinuus elektroforetikus technikák (mint a gyakorlat tárgyát képező SDS-PAGE is) két különböző koncentrációjú gélt, és három különböző pufferrendszert alkalmaznak. A futtató (más néven szeparáló) gél fölé egy ún. koncentráló gélt polimerizálunk. Ennek akrilamid koncentrációja a futtató gélénél jóval alacsonyabb, olyannyira, hogy itt a molekulaszűrő hatás még nem érvényesül. A három különböző pufferrendszerben két különböző aniont alkalmaznak. Mindkét gélben a puffer anion komponense egy erős sav maradéka, melynek disszociáció foka gyakorlatilag nem függ a közeg pH-jától, vagyis töltése széles pH-tartományban állandó. Ez a komponens általában a kloridion. Tankpufferként viszont olyan pufferrendszert alkalmaznak, melynek anionkomponense egy gyenge sav savmaradéka, pl. glicinát anion. A tankpufferben a pH 8,3.

A kis térfogatú fehérjemintát a koncentráló gél felszínére rétegezzük. Feszültség hatására a fehérjeionok és a tankpuffer anionjai belépnek a koncentráló gélbe. A koncentráló gélben a pH 6,8; ami alig magasabb, mint a glicin izoelektromos pontja (6,5). Ilyen pH-n a glicinmolekula csak parciálisan negatív (az idő nagy részében nettó semleges ikerionos állapotban van), elektroforetikus mobilitása lecsökken, így lokálisan csökken a töltéssel rendelkező molekulák koncentrációja. Ez helyileg megnöveli az elektromos ellenállást. Az elektromos körben az áramerősség állandó kell, hogy legyen (nincs makroszkopikus töltésszétválás). Ohm törvényének megfelelően a növekvő ellenállással arányosan megnő a térerő is, ezért a fehérjék vándorlása felgyorsul, de csak addig, amíg elérik az ionokban gazdag kloridion frontot. Minthogy a kloridion frontban az ellenállás, és így a térerő kicsi, a fehérjék sebessége csökken. Mindezek miatt a fehérjék a klorid ion front mögött mintegy összetorlódva igen vékony sávban vándorolnak a futtató gél felszínéig.

A futtató, vagy más néven szeparáló gélben a helyzet megváltozik. Mivel a szeparáló gél pH-ja 8,8-9,0 között van, a glicin parciális negatív töltése megnő, ezért mobilitása megnövekedik. Így a töltéshiányból eredő koncentráló hatás megszűnik, a fehérjék a



továbbiakban különböző fajlagos töltésük miatt eltérő sebességgel vándorolnak. Ráadásul a futtató gél akrilamid koncentrációját már úgy választjuk meg, hogy a molekulaszűrő hatás is érvényesüljön, a gél az elválasztani kívánt fehérjék mérettartományában a lehető legnagyobb mértékben szeparáljon.

Az elektroforetikus eljárások többségénél a futtatás során jelzőfestéket alkalmazunk, amit a mintába keverünk. Ez a kis molekulatömegű, negatív töltésű festék gyorsabban vándorol a gélben, mint a fehérjék, és mintegy láthatóvá teszi a futási frontot. Ez teszi láthatóvá, hogy mikor tekinthető az elválasztás befejezettnek. A leginkább használatos jelzőfesték a brómfenolkék.

Megjegyzendő, hogy a PAGE módszert nem csak fehérjék elválasztására használjuk, hanem olyan kisméretű (max. kb. 1000 bázispár) DNS molekulák esetében is, amelyek mérete még kompatibilis a PAGE módszerrel elérhető viszonylag kis pórusmérettel. A nagyfelbontású PAGE módszer nélkülözhetetlen volt a DNS szekvenálás kidolgozásánál, ahol egyetlen bázis hossz különbségű egyszálú DNS molekulákat kell egymástól elválasztani.

Fehérjék esetén a diszkontinuus poliakrilamid gélelektroforézis egyik leggyakrabban használt változata az SDS (sodium-dodecyl-sulphate) poliakrilamid gélelektroforézis.

## **B) SDS PAGE**

Az SDS (sodium-dodecyl-sulphate) egy anionos detergens. Ha a fehérjemintát SDS-sel és diszulfid-hidakat bontani képes redukálószerrel kezeljük magas hőmérsékleten, radikális konformációváltozások következnek be. A fehérjék közötti kölcsönhatások megszűnnek, az alegységszerkezet felbomlik, és a fehérjék denaturálódnak. Az SDS mintegy "kitekéri" a fehérjéket apoláros részével azok belső, hidrofób magját fellazítva, és - lévén anionos detergens - a fehérjéket negatív töltésekkel látja el.

A kötődött SDS mennyisége nem függ a polipeptidlánc szekvenciájától, ellenben egyenesen arányos a lánc hosszával, vagyis a fehérjék molekulatömegével. Ez más szóval azt jelenti, hogy az SDS kezelés után az összes fehérje relatív töltése nagyjából azonos lesz. Ráadásul a kezelés hatására az egyes fehérjék alakja is hasonlóvá válik. A negatív töltésű SDS molekulák taszítják egymást, ezért az SDS-kezelt fehérjék valószínűleg közel rúd alakúak lesznek. Mindez azt eredményezi, hogy a bevezetőben említett három tulajdonság (relatív töltés, alak, méret) szerinti szeparálás helyett itt csak méret szerinti szeparáció történik. Mivel a molekula mérete arányos a molekulatömeggel, az SDS poliakrilamid gélelektroforézis végső soron molekulatömeg szerint szeparál. Ez a legelterjedtebb módszer a fehérje alegységek molekulatömegének meghatározására. A tapasztalat szerint a fehérje relatív mobilitása (a fehérje futási távolsága osztva a jelzőfesték futási távolságával) a fehérje molekulatömeg logaritmusának függvényében monoton csökken.

Ha a mintánkat ismert molekulatömegű fehérjékkel azonos gélben futtatjuk, a standard fehérjék futása alapján készített kalibráló egyenesről a mintában lévő fehérje alegységek molekulatömege leolvasható.

Az alábbi táblázat azt mutatja, hogy különböző koncentrációjú akrilamidot tartalmazó gélek esetén milyen mérettartományban teljesül a relatív mobilitás és a molekulatömeg logaritmus között előbb említett összefüggés.

Akrilamid koncentráció (%)	Az elválasztás lineáris tartománya (kD)
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5,0	57-212

Az SDS poliakrilamid gélelektroforézis a leginkább elfogadott módszer annak eldöntésére, hogy egy fehérje ill. enzimpreparátum homogén-e. Különösen jól alkalmazható bonyolultabb fehérje-asszociátumok, multienzim-komplexek, riboszómák, miofibrillum stb. vizsgálatára.

A gyakorlat során az elektroforézist lemez-(slab) géleken, diszkontinuus puffrendszerrel végezzük. A molekulatömeg meghatározására szolgáló kalibrációs görbe felvétele céljából ismert molekulatömegű fehérjéket is futtatunk ugyanazon a gélen. A molekulatömeg meghatározásánál nem szabad megfeledkeznünk arról, hogy a denaturáló közeg miatt a módszerrel alegység ek molekulatömegét határozzuk meg, vagyis a fehérje tényleges natív molekulatömegének kiszámításához az alegységszerkezetet is ismerni kell.

### C) Festési eljárások

A futtatás után a fehérjéket a gélben valahogy láthatóvá kell tennünk. Erre több módszer is ismeretes.

#### 1. Fehérjefestékek

Számos vegyület kötődik nagy hatékonysággal fehérjékhez. Ezek használatakor célunk az, hogy lehetőleg az összes fehérjét kimutassuk a gélben. Ilyen festékek csökkenő érzékenység szerint sorba állítva:

- Coomassie Brilliant Blue R-250
- Savas Fast Green
- Amidofekete

Ezek közül leggyakrabban a Coomassie Brilliant Blue-t használják. Segítségével a gél keresztmetszetétől és az adott fehérje speciális festődési tulajdonságától függően akár már 0,1 µg fehérje is jól detektálható. Az Coomassie Brilliant Blue festék a fehérje detekcióban a fehérjék koncentrációjának Bradford szerinti meghatározásában is használatos (lásd az 1. gyakorlatot).

Ha nem az összes fehérjét akarjuk detektálni, hanem egy bizonyos fehérjét szeretnénk kimutatni, akkor két különböző eljárás áll rendelkezésünkre.

## **2. A Western „blot” (lenyomat) módszer**

Ha rendelkezünk a kimutatandó fehérjével szemben specifikus ellenanyaggal, a következő módon járhatunk el: a fehérjét első lépésben SDS gélelektroforézissel (lásd 4. gyakorlat) elválasztjuk egymástól. Ezek után egy erre a célra kialakított készülékben a géltre szorosan ráillesztünk egy nitrocellulóz membránt, majd a gél síkjára merőleges irányban egy újabb elektroforézist végzünk. Ennek segítségével a fehérjét a gélben kialakult mintázatot megőrizve rögzítjük a nitrocellulóz membránon. A membránt a specifikus ellenanyag oldatában inkubáljuk, így szelektíven megjelöljük a kimutatandó fehérjét. Ezt a jelölést leggyakrabban úgy tesszük láthatóvá, hogy a membránt egy második ellenanyag oldatában inkubáljuk. Erre a második ellenanyagra, mely specifikusan felismeri az első ellenanyag konstans régióját, még a felhasználás előtt kovalensen egy enzimet, leggyakrabban peroxidázt kötnek. Ezután a membránt az enzim mesterséges szubsztrátját tartalmazó oldatban inkubálják. Az enzimreakció terméke színes csapadék, mely végső soron ott jelenik meg, ahol a kimutatandó fehérje van.

## **3. Enzimatisz aktivitáson alapuló módszerek**

Amennyiben az elektroforézis natív körülmények között zajlott, egy sor különböző enzim (pl. dehidrogenázok, ATP-ázok, proteázok stb.) esetében jól kidolgozott eljárások ismeretesek ezek szelektív kimutatására enzimaktivitásuk alapján. Ekkor a gélt egy olyan oldatban inkubálják, amelyben a kimutatandó enzim specifitásának megfelelő enzimreakció lejátszódik. Olyan szubsztrátot használnak, mely a reakció során színes terméké alakul, és ez a termék ráadásul csapadék. Ez azt jelenti, hogy a gélnék csak azon területei színeződnek el, ahol az adott enzim van.

### **Az agaróz gélelektroforézis**

Amint azt már a bevezetőben írtuk, a gél pórusmérete dönti el, hogy milyen méretű molekulákat lehet elválasztani egymástól benne. Kisebb méretű DNS molekulák esetén PAGE módszer is használható, de a kutatások során vizsgálandó DNS molekulák gyakran több ezer bázispárból állnak. Az ilyen óriásmolekulák nem választhatók el egymástól poliakrilamid gélben, mert még a leghígabb akrilamid gél pórusmérete is túl kicsi ezeknek a molekuláknak a méretéhez képest. A megoldás természetesen az, hogy másfajta gélt kell alkalmazni, olyat, amelynek pórusmérete kellően nagy az ilyen hatalmas molekulák elválasztásához.

Erre a célra az agaróz gél terjedt el. Az agaróz a vörösalgák sejtfalából kivont agar egyik fő komponense, galaktóz és anhidro-galaktóz egységekből felépülő lineáris poliszacharid. Az agaróz gélben a poliszacharid egységek között létrejövő másodlagos kötések alakítják ki a térhálós gélt. Mivel a gélt itt nem kovalens kötések alakítják ki, ez a gél magas hőmérsékleten fázisátalakuláson megy keresztül, folyadékszerű (szol) állapotba kerül.

A gélt úgy hozzuk létre, hogy agaróz port keverünk össze a futtató pufferrel, létrehozunk magas hőmérsékleten a sol állapotot, majd megfelelő formába töltve a hőmérséklet csökkenésével kialakul a gél.

A pórusméret az agaróz-koncentrációtól függ. Az agaróz géltre is igaz, számos, már az akrilamid gélnél is említett előnyös tulajdonság. Ez a gél is hidrofíl, kémiailag inert, stabil, és

nem köt meg számos olyan festéket, amelyeket a benne elválasztandó molekulák festésére használunk.

A nukleinsavak agaróz gélben történő kimutatására rendszerint olyan festékeket használunk, amelyek nukleinsavakkal alkotott komplexe fluoreszkál. A festékek zöme olyan, hogy a komplex ultraibolya fényben gerjeszhető, és látható tartományban bocsát ki fényt.

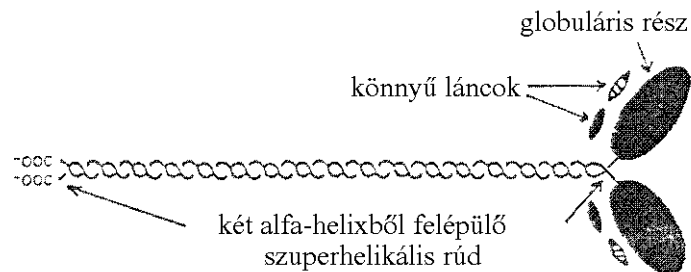
A kétszálú DNS kimutatására leggyakrabban használt festék az etidium-bromid. Az etidium-bromid gyűrűs vegyület, amelynek molekulája képes a DNS kettősspirálban a bázisok közé beékelődni. Az ilyen tulajdonságú vegyületek mutagének lehetnek, hiszen a replikáció során megzavarhatják a DNS polimeráz működését. Az agaróz gélelektroforézissel az 5. gyakorlaton találkozunk. Etidium-bromid helyett ott egy nem mutagén festéket használnak majd.

## 4. GYAKORLAT

### Miofibrilláris fehérjék molekulatömegének meghatározása SDS poliakrilamid gél elektroforézissel

#### Bevezetés

A miofibrillumok a harántcsíkolt izomszövet izomroston belüli összhúzóköny elemei. A miofibrillum nem sejtorganellum, hanem önszerveződésre képes szupramolekuláris képződmény, mint pl. a riboszómák. A harántcsíkolt miofibrillumban, melynek alapegysége a szarkomer, kétféle - egy vastag és egy vékony - filamentum rendszer található. A vastag filamentum fő fehérjéje a miozin, ami hat alegységből, négy könnyűláncból és két egyforma nehézláncból áll, mint azt az alábbi sematikus ábra mutatja.

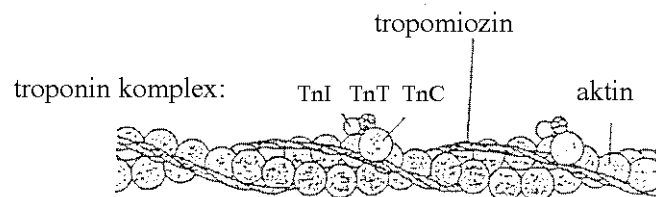


A miozin sematikus képe



A vastag filamentum, kihajló miozinféjekkel

A vékony filamentum vázát a globuláris aktinból felépülő aktin filamentum adja, amihez gerincesek esetében szabályzó fehérjék kapcsolódnak: a tropomiozin és a három alegységes troponin. Ezt az alábbi ábra szemlélteti.



A vékony filamentum sematikus képe

## **A miofibrillum preparálása:**

A frissen levágott nyúlból fehér vázizmot preparálunk, az izmot ledaráljuk, és tízszeres térfogatú jéghideg 0,05M KCl, 0,01 Trisz-HCl pH 7,6 pufferrel késes homogenizátorban kb. egy percig homogenizáljuk. Így dezorganizáljuk az izomrostokat, ezáltal a miofibrillumok szabaddá válnak. A szuszpenziót 2000g-vel centrifugáljuk. A csapadékot a fenti pufferben újra szuszpendáljuk, és az egész folyamatot (homogenizálás, centrifugálás) még 3-4-szer megismételjük. A már említett kis ionerejű oldatban a sejtek anyagának zöme oldódik, a miofibrillum, mint egységes szupramolekuláris komplex viszont nem. Tárolás céljából a preparátumot SDS-ben feloldva liofilizáljuk. A gyakorlaton előre elkészített miofibrillum-preparátummal dolgozunk.

## **A gyakorlat kivitelezése**

### Eszközök

egyenfeszültségű tápegység, elektroforézis készülék, pipetták, Hamilton fecskendő

### Anyagok

SDS kezelt miofibrillum  
30 %-os akrilamid oldat (29% akrilamid, 1% metilén-bisz-akrilamid)  
1,5 M Trisz-HCl pH 8,8  
0,5 M Trisz-HCl pH 6,5  
10%-os SDS oldat  
10%-os tetrametil-etilén-diamin (TEMED) oldat  
10%-os ammónium-peroxi-diszulfát oldat

Mintafelvívő puffer:

0,125 M Trisz-HCl pH 7,4,  
10% g4licerin,  
2% SDS,  
5% béta-merkaptóetanol,  
0,01% brómfenolkék

Futtató puffer:

3 g Trisz-bázis,  
14,2 g glicin  
1 g SDS  
Feloldva egy liter desztillált vízben

Festékkoldat:

0,24% Coomassie Brilliant Blue R 250, 50% metanolban oldva  
festéktelenítő: 7% metanol, 9% ecetsav

<b>kalibráló fehérje</b>	<b>molekulatömeg</b>	<b>jelölés</b>
ribonukleáz	15.000	Rn-áz
mioglobin Ms:	16.800	Miogl.
szója tripszin inhibitor	20.000	STI
kimotripszinogén	26.000	KTG
szénsav anhidráz	29.000	Széns. anh.
ovalbumin	45.000	Ovalb.
szérum albumin	66.800	BSA

A gyakorlatvezető instrukciói alapján összeállítjuk az elektroforézis készüléket. Ezután az alábbi táblázat szerint összemérjük a megadott akrilamid koncentrációjú szeparáló géldatot.

*Vigyázat! Az akrilamid oldat mérgező!*

5.0 ml 15 %-os gélhez bemérendő:

<b>Anyag</b>	<b>Térfogat</b>
desztillált víz	1,1 ml
30%-os akrilamid oldat	2,5 ml
1,5 M Trisz-HCl (pH 8,8)	1,3 ml
10 % -os SDS	50 $\mu$ l
10 %-os TEMED	50 $\mu$ l
10%-os ammónium-perszulfát	20 $\mu$ l

*Utoljára az ammónium-perszulfátot adagoljuk, hiszen ez indítja el a polimerizációt!*

Az üveglapok közé annyi szeparáló gélt töltünk, hogy elérje a öntő készüléken bejelölt szintet. Ezután a géldatot főlé óvatosan desztillált vizet rétegezzünk kb. 5 mm-es vastagságban. A rárétegzett víznek kétféle szerepe van. Az oxigén gyökfogó tulajdonsága miatt akadályozná a polimerizációt, a vízréteg akadályozza az oxigén oldatba jutását. A vízréteg azt is elősegíti, hogy a kialakuló gél felszíne egyenes, vízszintes legyen. A polimerizáció befejeződését a gél-víz határretegben megjelenő, erősen fénytörő felszín jelzi. Ekkor a "fésűt" ideiglenesen kihúzza a gél tetejéről a vizet leöntjük, és az üveglapokat szűrőpapír csíkokkal szárazra töröljük ügyelve arra, hogy eközben a gélfelszín meg ne sérüljön. Ezután összemérjük a koncentráció géldatát.

2 ml 5%-os koncentráció gélhez bemérendő:

<b>Anyag</b>	<b>Térfogat</b>
desztillált víz	1,4 ml
30%-os akrilamid oldat	330 $\mu$ l
0,5 M Trisz-HCl (pH 6,5)	250 $\mu$ l
10%-os SDS	20 $\mu$ l
10%-os TEMED	20 $\mu$ l
10%-os ammónium-perszulfát	20 $\mu$ l

A géloidatot óvatosan a szeparáló gél tetejére töltjük, és ismét a helyére tesszük a "fésű" mellyel a mintafelvívő zsebeket alakítjuk ki. Ügyeljünk arra, hogy a "fésű" fogai alá ne kerüljenek buborékok. Gyorsan kell dolgozni, mert a koncentráló géloidat az itt alkalmazott magasabb ammónium-perszulfát koncentráció miatt percek alatt polimerizál.

Amíg a minta gél polimerizál, a már kezeltén kapott miofibrillumot (jele: Miof.) a kalibráló fehérjéket tartalmazó Eppendorf csövekkel együtt vízfürdőben 1 percig forraljuk. Ne felejtsék el a művelet után a Bunsen égőt, majd a gázcsapot elzárni!

A gél polimerizálódása után a futtató puffert betöltjük, a fésűt eltávolítjuk, és a mintákat Hamilton fecskendővel felvisszük. A miofibrillum preparátumból 2,5; 5 és 10, a kalibráló fehérjékből (kb. 0,5 mg/ml-esek) 5 $\mu$ l-eket vigyünk fel. Az elektroforézist 100V feszültséggel (kb. 10 V/cm elektromos térerő) végezzük, míg a jelzőfesték el nem éri a szeparáló gél határát, majd 200V-ra (kb. 20 V/cm elektromos térerő) növeljük, és a festéket a gél aljáig futtatjuk.

Az áramforrást kikapcsoljuk, a futtató puffert a lombikjába visszatöltjük, a készüléket szétszereljük, minden alkatrészét gondosan elmosogatjuk, a géllemezt a festékoldatba tesszük. A festést az 5. gyakorlatnál leírtak szerint végezzük el.

### **Feladatok:**

**Határozzuk meg a kalibráló fehérjék és a miofibrillum főbb fehérjéinek relatív mobilitását a bevezetőben leírtak szerint!**

**A megadott molekulatömegek alapján ábrázoljuk a kalibráló egyenest a log(Mt)-relatív mobilitás koordinátarendszerben. Határozzuk meg a főbb miofibrilláris fehérjék molekulatömegét!**



## 5. GYAKORLAT

### Plazmid DNS izolálása és agaróz gélelektroforézise

#### Bevezetés

A plazmidok számos baktériumfajban megtalálható, extrakromozómális, kétszálú, cirkuláris DNS molekulák. Eredeti formájukban méretük 1 kb és 200 kb között van. A plazmidok gyakran tartalmaznak olyan géneket, melyek a gazdasejt számára valamilyen előnyt biztosító enzimeket kódolnak. Ilyen előny lehet egyes antibiotikumok elleni rezisztencia, más esetekben éppen speciális antibiotikumok, esetleg különböző toxinok szintézise. Vannak olyan restriktív, modifikációs rendszerek, melyek enzimeit szintén plazmidon kódolták.

A rekombináns DNS technikákban leggyakrabban az *Escherichia coli*-t használják gazdasejtként, ezért a továbbiakban csak az *E. coli*-ban előforduló, illetve abban fenntartható plazmidokkal foglalkozunk.

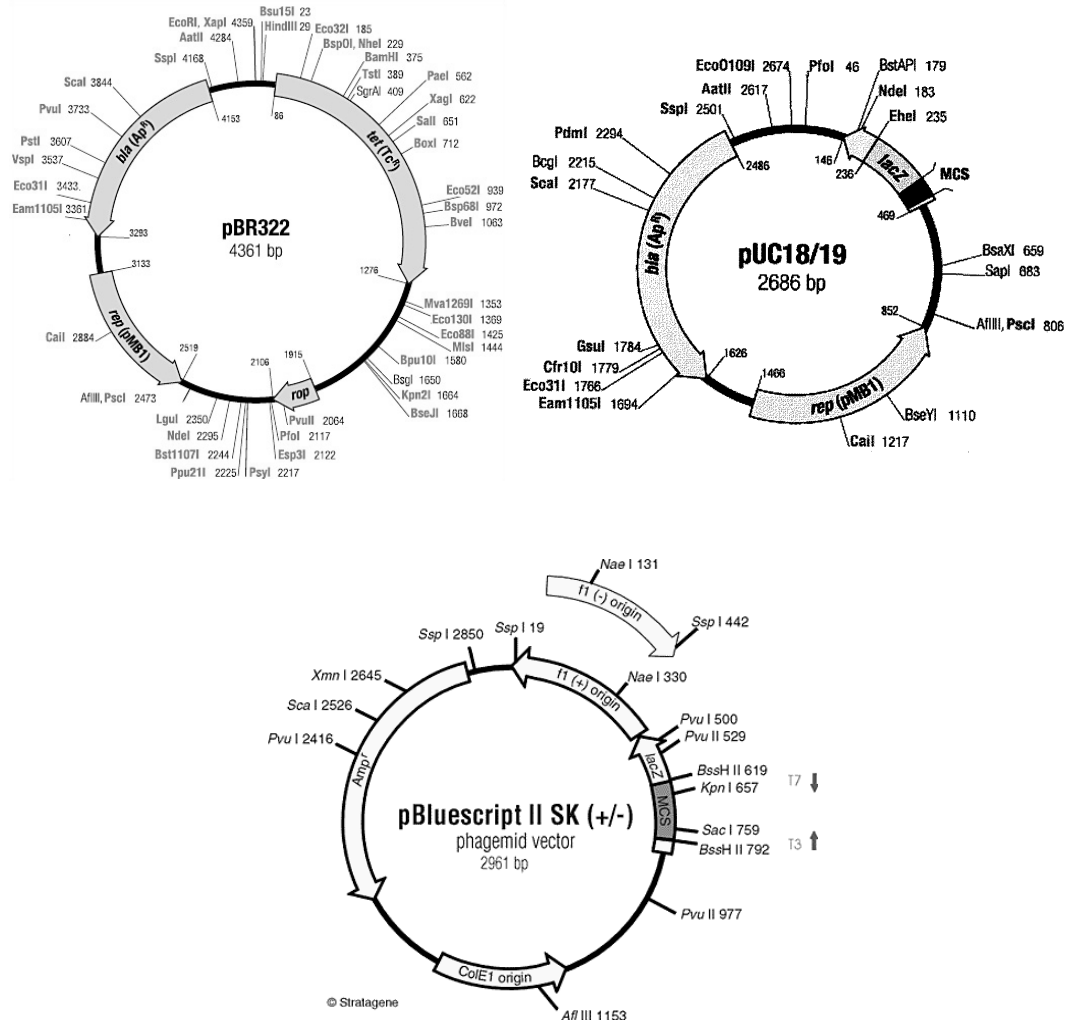
A plazmidok replikációját a baktérium kromozómájának replikációjakor is felhasznált enzimek egy része végzi (DNS polimeráz I, DNS polimeráz III, stb.). A replikáció kezdőpontját a replikációs origó jelöli ki. A replikációs origó környékén található szekvenciák szabályozzák a kópiaszámot. A ma használatos plazmid vektorok replikációja független a sejtosztódástól, ún. relaxált kontroll alatt áll. Minthogy a plazmidok replikációja nem függ fehérjék expressziójától (a szükséges enzimek hosszú életidejűek a sejtben), a gazdasejt fehérjeszintézisének kloramfenikollal való gátlásával el lehet érni, hogy a sejt nem lesz képes a kromozómális DNS-ét replikálni, de a plazmid szintézise tovább folyik. Ezzel az eljárással, melyet amplifikálásnak nevezünk, tovább növelhető egy plazmid kópiaszáma.

Laboratóriumi körülmények között az izolált plazmidokat a transzformációnak nevezett folyamat során juttatjuk be a baktériumsejtekbe. A transzformáció hatásfokának növelése céljából a sejteket kétértékű kationok oldatával történő mosás útján "kompetenssé" tesszük. Még így is, a baktérium-populációnak csak egy elhanyagolhatóan csekély hányada vesz fel stabilan plazmidot. A transzformált, azaz plazmidot tartalmazó sejtek azonosítását a plazmidon található szelektív marker gének teszik lehetővé. A leggyakrabban használt szelektív markerek antibiotikum-rezisztenciát biztosítanak.

A legelterjedtebben használt antibiotikumok a következők: Ampicillin: (egy penicillin származék) a sejtfal bioszintézisét végző egyik enzimet gátolja. Tetraciklin: a 30S riboszómális alegység egyik fehérjéjéhez kötődik és megakadályozza a riboszóma transzlokációját. Kloramfenikol: az 50S riboszómális alegységhez kötődik és így gátolja a fehérjeszintézist.

A felhasználás szempontjai szerint a plazmidokat két csoportra oszthatjuk. Beszélünk klónozó vektorokról és expressziós vektorokról. A klónozó vektorok az idegen DNS szakasz vizsgálatát és manipulációját teszik lehetővé. Az expressziós vektorok olyan DNS szekvenciákat is tartalmaznak (promóter és riboszóma kötőhely), melyek lehetővé teszik az idegen DNS szakasz transzkripcióját és translációját.

A felhasználható restrikciós hasítási helyek számának növelésével ún. poliklónozó helyet hoztak létre. Ez egy rövid DNS szekvencia szakasz, amelybe koncentráltan húsznál több, különböző restrikciós enzim felismerési helyét vitték be. A legújabb típusú plazmidok (pl. Bluescript és pGEM) ilyen poliklónozó helyeket tartalmaznak.



5.1. ábra. Néhány gyakran használt plazmid restrikciós térképe

# A gyakorlat kivitelezése

## 1. Plazmid DNS izolálása

A különböző plazmid DNS izolálási technikák három alapvető munkafázisra oszthatók:

- a baktériumtenyészet növesztése
- a baktériumsejtek összegyűjtése és lízise
- a plazmid DNS tisztítása

A gyakorlaton felhasznált gazdasejt, melyet XL1-Blue-nak neveznek (Bullock és mtsi, 1987) az *E. coli* K12 törzsből kifejlesztett, plazmidokkal rendkívül jól transzformálható sejt.

### 1. A baktériumtenyészet növesztése

Steril fogpiszkáló segítségével oltunk át egy plazmiddal transzformált baktériumtelepet 15 ml-es steril műanyag kémcsőben lévő 3 ml LB/amp tápoldatba. (Az oldatok összetétele a gyakorlati leírás végén található.) Egyértelműen és jól olvashatóan jelöljük meg a csöveket. Rázassuk a kultúrákat 37°C-on egy éjszakán át, de legalább 5 óra hosszat. A gyakorlat kezdetére hallgatónként két-két preparátum elő lesz készítve.

### 2. A sejtek összegyűjtése

Az előkészített preparátumnak megfelelően jelöljük meg két Eppendorf mikrocentrifuga csövet marker tollal. Óvatosan öntsük a baktérium-szuszpenzió felét (kb 1.5 ml) a megjelölt Eppendorf csőbe. A kultúra maradékát tegyük jégre. A mikrocentrifuga csöveket helyezük a centrifugába (szobahőmérsékleten). Ügyeljünk a csövek szimmetrikus elhelyezésére. Ne feledkezzünk meg a rotor fedelének visszatételéről! Zárjuk le a centrifuga fedelét és 1 percre állítsuk a centrifuga óráját. Ekkor a centrifuga elindul, és 1 percig működik. Maximális fordulatszáma 13000 fordulat/perc. Ennél a lépésnél a baktérium sejtek kiülepednek, a számos szennyezést tartalmazó tápoldat, mint felülúszó, eltávolítható.

3. Gyors és heves mozdulattal öntsük le a felülúszót. (A sejtek olyan jól tapadnak az Eppendorf cső aljára, hogy nem kell tartanunk elvesztésüktől.)

4. Öntsük a kultúra maradékát a megfelelő centrifugacsőbe, és ismételtén centrifugáljuk a csöveket. Ügyeljünk arra, hogy a felülúszót maradék nélkül távolítsuk el.

Ezután a lépés után kétféle módon folytathatjuk az izolálást: hagyományos módon, aminek a végén a plazmidoldatból a fehérjéket fenol-kloroform eleggyel távolítjuk el, és az oldatból a plazmidot alkohollal csapjuk ki, illetve plazmid izoláló kittel, ahol a plazmid tisztítása miniatúr kromatográfiás oszlopon történik. Először a klasszikus módszert ismertetjük, majd rátérünk a kittel történő izolálás bemutatására.

## A) Plazmidizolálás klasszikus módszerrel

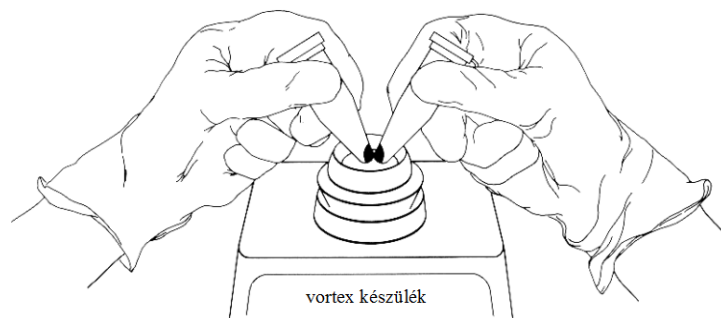
### A sejtek alkalikus lízise

Az alábbiakban ismertetett eljárás Birnboim és Doty (1979) valamint Ish-Horowitz és Burke (1981) módszerének módosított változata.

5. Adjunk minden csőhöz 100  $\mu$ l jéghideg I. oldatot.

A pipettahegyek költségesek, takarékoskodjunk velük. Amikor egy adott oldatból több csőbe mérünk be alikvotokat, nem szükséges minden esetben cserélni a pipettahegyeket, ha vigyázunk arra, hogy a pipettahegy a cső tartalmával ne érintkezzen.

A baktérium üledéket szuszpendáljuk az I. oldatban a vortex készülék segítségével. Egyszerre két csövet kevertessünk, a 2. ábrán látható módon. A további felhasználásig tartsuk a csöveket jégen. Rendkívül fontos az üledék tökéletes szuszpendálása. Az I. oldat izotóniás, ebben a sejtek még nem lizálnak, és így ellenállnak az erőteljes mechanikai behatásoknak. Az oldatban található EDTA a  $Mg^{2+}$ -ionok komplexbe vitelével a sejt nukleáz enzimeinek aktivitását gátolja. Néhány régebbi recept ennél a lépésnél lizozimet is használt a sejtfal lebontása céljából, tapasztalataink azt mutatják, hogy ez nem szükséges.



5.2. ábra

6. Adjunk minden csőhöz 200  $\mu$ l szobahőmérsékletű II. oldatot (frissen készül). Zárjuk le a csöveket és néhány óvatos fordítással keverjük össze teljesen a cső tartalmát. Óvakodjunk az erőteljes rázástól, vortexeléstől, pipettázástól, ezek a hatások a genomiális DNS fragmentálását és ezáltal a plazmid DNS preparátum szennyeződését eredményezik. A csöveket tartsuk öt percig jégen. A II. oldat, lúgos Na-dodecilszulfát, a membránok lipidszerkezetének dezintegrálásával idézi elő a sejtek lízisét.

7. Adjunk minden csőhöz 150  $\mu$ l jéghideg III. oldatot. Először óvatosan keverjük össze, majd néhányszor röviden (2 mp) vortexeljük. Tartsuk a csöveket tíz percig jégen. A III. oldat savanyú K-acetát. Hatására a II. oldatban szolubilizált fehérjék, membrántörmelékek, a hozzájuk kapcsolódó genomiális DNS-sel együtt kicsapódnak. A dodecilszulfát káliumsója is oldhatatlan, így az is a csapadékba kerül.

8. Centrifugáljuk a mintákat tíz percig. A tiszta felülúszót, ami a plazmid DNS-t tartalmazza, öntsük át óvatosan megjelölt tiszta csőbe.

9. Ez a lépés esetleg elhagyható, a gyakorlatvezető utasítása szerint járjunk el. Adjunk 450 µl fenol-kloroform keveréket minden csőhöz. Vortexeljük alaposan. Hagyjuk állni szobahőmérsékleten 10 percig, majd vortexeljük újra. Centrifugáljuk szobahőmérsékleten 5 percig. A felső, vizes fázis tartalmazza a plazmid DNS-t (és az RNS-eket), a denaturált fehérjék többsége a szerves fázisba, vagy a két fázis közötti erősen zavaros rétegbe kerül. A felső fázist óvatosan pipettázzuk át tiszta csőbe.

10. Adjunk 1 ml abszolút alkoholt minden csőhöz és jól keverjük össze. 10 perc állás után 5 percig centrifugáljuk. A felülúszót a 3. lépésnél leírt módon távolítsuk el.

11. Adjunk 1 ml 70%-os etanolt minden csőhöz és ismételjük meg a centrifugálást. Az alkohol eltávolítása után a csöveket 1 percig centrifugáljuk, hogy a csövek falához tapadt maradék folyadéktól is megszabaduljunk. Az üres csöveket nyitva lefektetjük, és kb. 10 percig száradni hagyjuk.

12. A csapadékot oldjuk fel 50 µl TE-oldatban (pH 8,0). A TE-oldat DNáz-mentes RNáz-t is tartalmaz a ribonukleinsavak lebontása céljából. A csövekre marker tollal írjuk fel a minta jelét, dátumot és monogramunkat. A feliratot celluxszal ragasszuk le.

## **B) Plazmid DNS izolálása Mini-M™ (Viogene) kittel**

*(Amennyiben eltérő típusú kitet kapnának, úgy az egyes lépések elvégzéséhez kövessék a kithoz kapott protokollt. A különböző kitek működési elve szinte azonos, ezért az egyes lépésekhez tartozó elméleti leírás más kitekre is érvényes.)*

5. Adjunk 250 µl MX1 oldatot a pellethez, és vortex-szel (lásd 5.2. ábra), vagy ha ez nem lenne elegendő akkor fel-le pipettázva, alaposan szuszpendáljuk fel a sejteket. Ügyeljünk rá, hogy ne maradjanak sejtsomók a szuszpenzióban, mert ezek nem táródhatnak majd fel a következő lépés során! Az MX1 oldat izotóniás, ebben a sejtek még nem táródhatnak fel, és így ellenállnak az erőteljes mechanikai behatásoknak. Az oldatban található EDTA a Mg<sup>2+</sup>-ionok komplexbe vitelével a sejt nukleáz enzimeinek aktivitását gátolja. Az MX1 oldat ezenfelül DNáz-mentes RNáz-t is tartalmaz a ribonukleinsavak lebontása céljából. Ennek a lépésnek a végén a sejtek még épek, és nagy koncentrációjuk miatt a szuszpenzió átlátszatlan.

6. Adjunk 250 µl MX2 oldatot a szuszpenzióhoz és a cső ide-oda fordításával óvatosan keverjük össze, míg áttetszővé nem válik. Óvakodjunk az erőteljes rázástól, vortexeléstől, pipettázástól, ezek a fizikai hatások a genomális DNS-t összetöredelnek és ezáltal a plazmid DNS preparátum kisméretű DNS-ekkel szennyeződik! Az MX2 oldat lúgos kémhatású Na-dodecilsulfát, ami tönkretesz a membránok lipidszerkezetét, ezáltal feltárja a sejteket. Emellett ez a kezelés a fehérjéket és a DNS-t is denaturálja, és denaturált formában oldatban tartja. A DNS esetében a denaturálás a két szál elválását

jelenti. A minta azért válik átlátszóvá, mert a sejtek szétesnek, és így egy homogén oldatot kapunk.

7. Adjunk 350 µl MX3 oldatot a mintához, és azonnal, de óvatosan keverjük össze, hogy egyenletes legyen a kicsapódás. Nagy mennyiségű fehér csapadék keletkezik. Az MX3 oldat savas kémhatású K-acetát. Hatására a minta hirtelen semleges kémhatásúvá válik, és ezen a pH-n a denaturált fehérjék és a denaturált DNS nem oldható. Ennél a lépésnél csapódik ki a genomiális DNS részben azért, mert nagy mérete miatt renaturációja nem tud pillanatszerűen bekövetkezni, részben pedig azért, mert kapcsolódik a szintén kicsapódó fehérjék egy részéhez. A kisméretű plazmidok ezzel szemben pillanatszerűen renaturálódnak és oldatban maradnak. A dodecilszulfát káliumsója is oldhatatlan, így ez a detergens is a csapadékba kerül. Centrifugáljuk a mintát 10 percig 14000 fordulat/perc sebességgel, hogy így a szennyező anyagokat tartalmazó fehér csapadékot kiüleptsük. A felülúszó főleg plazmid DNS-t, és gyorsan renaturálódó fehérjéket tartalmaz.

8. A plazmid DNS-t, és szennyező fehérjéket tartalmazó felülúszót óvatosan pipettázunk át a szilikátalapú membránt tartalmazó oszlopra. Ez magas ionerő mellett megköti a 100 bázispár-10 kilobázis méretű DNS-t. Vigyázzunk, hogy a csapadékból semmi ne kerüljön az oszlopra, mert eltömheti a membrán pórusait! Centrifugáljuk a mintát 1 percig 14000 fordulat/perc sebességgel, majd öntsük ki az átfolyót.

9. Mossuk a membránt 0,5 ml WF pufferrel, amely denaturál, és eltávolít minden fehérjeszennyezést. Centrifugáljuk a mintát 1 percig 14000 fordulat/perc sebességgel, majd öntsük ki az átfolyót.

10. Mossuk a membránt 0,7 ml 80% etanol is tartalmazó WS pufferrel, amely eltávolítja a WF puffer maradékát. A plazmid DNS későbbi felhasználásakor gyakran enzimeket használnak, és ezeket denaturálhatná a WF puffer szennyezés. Centrifugáljuk a mintát 1 percig 14000 fordulat/perc sebességgel, majd öntsük ki az átfolyót.

11. A maradék etanol eltávolítása céljából a mintát további 3 percig centrifugáljuk 14000 fordulat/perc sebességgel. Az etanolszennyezés szintén zavarhatná a plazmid preparátumon végzett enzimátikus reakciókat (pl. restrikciós hasítást).

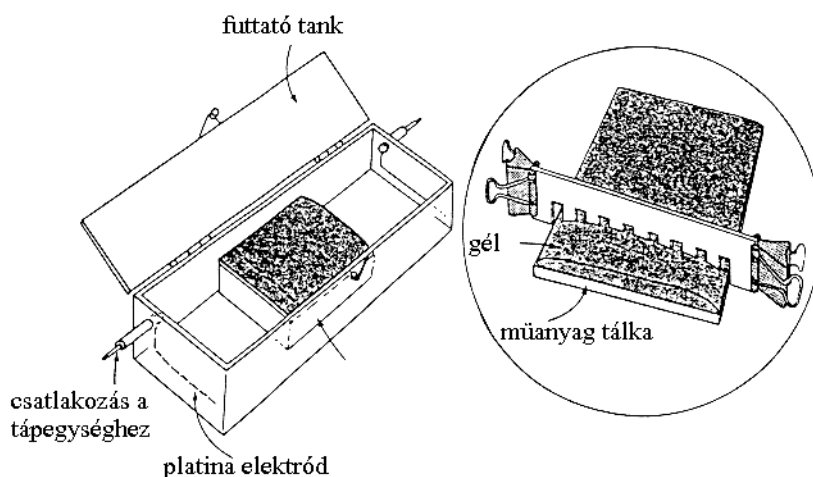
12. Helyezzük az oszlopot egy tiszta Eppendorf-csőbe, és a membrán közepére pipettázunk 50 µl elúciós puffert (EB) vagy desztillált vizet, majd hagyjuk 2 percig állni a folyadékot az oszlopon. Alacsony ionerőn a DNS nem kötődik a szilikát -membránhoz, így arról lemosható. A plazmidot tartalmazó mintát centrifugáljuk le (2 perc 14000 fordulat/perc). A plazmid DNS-t a továbbiakban tároljuk jégen, illetve hosszútávon -20°C-on.

## A plazmid preparátum vizsgálata agaróz gélelektroforézissel

### A futtatógél elkészítése

Mikrohullámú sütőben forrásig melegítsünk fel 25 ml 1%-os agaróz gél. Ügyeljünk arra, hogy ne hevüljön túl, mert ilyenkor könnyen kihabzik! Miután a gél annyira lehűlt, hogy kézzel meg tudjuk fogni az edényt, adjunk hozzá 2,5  $\mu$ l SYBR Safe DNS festéket. (A hagyományosan használt DNS festék, az etidium-bromid mutagén hatású. Az etidium-bromid a bázispárok síkja közé interkalálódik, így replikáció során inzerciót, vagy deléciót okozhat, tehát leolvasási keret eltolódást eredményezhet. A SYBR Safe ezzel szemben nem toxikus.) A SYBR Safe (akárcsak az etidium bromid) komplexet alkot a DNS-sel, ami UV fényel megvilágítva narancsszínű fényt kibocsátva fluoreszkál, láthatóvá téve ezáltal, hogy a gélben hol vannak DNS molekulák. (Megjegyzendő, hogy mindkét festék kapcsolódik többé-kevésbé az RNS és fehérje molekulákkal is, ezért ha a DNS preparátum szennyezett, akkor ezek is fluoreszkálni fognak rontva a DNS detektálás minőségét.)

Az elektroforézis készülék géltartó tálkáját helyezzük vízszintes felületre. A tálka hosszabbik oldalával párhuzamosan állítsuk be a minta felvitelére szolgáló zsebeket kialakító fésűt úgy, hogy annak fogai kb. 1 mm-rel legyenek a tálka szintje felett. Óvatosan öntsük az agarózt a tálkába ügyelve arra, hogy ne folyjon ki. Miután megdermedt, óvatosan húzzuk ki a gélből a fésűt. A gél helyez-



5.3. ábra

zük az elektroforézis tankba, és töltjük fel a tankot  $1\times$  TAE pufferrel úgy, hogy a gél ellelje.

A plazmid mintákat kezeljük mintafelvívő pufferrel: helyezünk annyiszor 1-2  $\mu$ l mintafelvívő puffert cseppet egy PARAFILM (parfin) fólia darabra ahány mintát szeretnénk futtatni. Ezután adjunk 3-4  $\mu$ l DNS preparátumot egy csepphez és néhányszori fel-le pipettázással keverjük azzal össze, majd az így kezelt mintát óvatosan rétegezzük a zsebekbe a folyadék felszíne alá. Az eljárást ismételve töltjük be a gél zsebeibe a többi mintát is. Az első zsebbe DNS molekulásúly markert vigyünk, mely

ismert méretű lineáris DNS molekulákat tartalmaz. Az egyes minták felviteléhez tiszta pipettahegyet kell használni.

Helyezzük fel az elektroforézis tank fedelét, és csatlakoztassuk a tápegységhez a tankot. Vegyük figyelembe, hogy a DNS negatív töltésű, tehát az anód (pozitív pólus) felé vándorol! A tápegységet kapcsoljuk be, és állítsuk be a futtatási feszültséget 150 V-ra. A tankban lévő elektródok távolsága kb. 20 cm, tehát ez a feszültség kb. 7-8 V/cm elektromos térerőt eredményez.

Amikor a brómfenolkék jelzőfesték a gél végétől kb. 1 cm-re van, fejezzük be a futtatást. A gélt a tálcával együtt vigyük a fotoszobába, és UV transzilluminátorra helyezve fényképezzük le.

*VIGYÁZAT! Az UV fény ártalmas, különösen a szemekre.  
Viseljünk védő szemüveget!*

**Feladat:** Értékelje ki a kapott elektroforetogrammot a gyakorlatvezetőtől kapott információk, valamint a cirkuláris DNS-ek topológiájáról tanultak alapján.

#### **Az egyes oldatok összetétele:**

##### **A baktérium tenyésztéséhez szükséges oldat**

##### **LB médium (Luria/Bertani médium)**

Egy literre:

950 ml ionmentes vízhez adjunk:

bacto-trypton	10 g
bacto-yeast extract	5 g
NaCl	10 g

Oldódásig keverjük, majd 5N NaOH adagolásával 7,5-re állítjuk az oldat pH-ját. Ionmentes vízzel egy literre egészítjük ki a térfogatot. Az oldatot 120°C -on húsz percig autoklávban sterilizáljuk.

##### **A klasszikus plazmidizolálási módszer oldatai**

**I. oldat:** 50 mM glükóz  
25 mM Trisz-HCl (pH 8,0)  
10 mM EDTA (pH 8,0)

**II. oldat:** 0,2 N NaOH



1% SDS

**III. oldat:** 5M K-acetát 60 ml  
jégecet 11,5 ml  
H<sub>2</sub>O 28,5 ml

Az így elkészített oldat koncentrációja kálium-ionra nézve 3 M, acetát-ionra 5 M.

**TE pH 8.0** 10 mM Trisz-HCl (pH 8,0)  
1 mM EDTA

### **RN-áz (DN-áz mentes)**

Oldjunk fel hasnyálmirigy RN-áz 10 mM Trisz-HCl pH 7,5 pufferben. Az enzim koncentrációja legyen 10 mg/ml. A mintát tartsuk 100°C-on 15 percig, hagyjuk lehűlni, osszuk szét kisebb csövekbe és tároljuk -20°C-on.

### **Fenol/kloroform oldat**

A fehérjék nukleinsav preparátumból történő eltávolításához gyakran használnak egy olyan oldatot, mely 1:1 arányban tartalmaz fenolt és kloroformot, ehhez képest 24:1 arányban tartalmaz izoamilalkoholt, és telítve van pH 8,0 TE-oldattal (lásd fent). A fenol denaturálja a fehérjéket, a kloroform pedig kítűnően oldja a vízben kismértékben oldódó fenolt. Ha a nukleinsav preparátumot a fenti oldattal alaposan összerázzuk, majd centrifugáljuk, a denaturált fehérjék a felső vizes, és az alsó (nagyobb sűrűségű) fenol/kloroform fázis határán gyűlnek össze, ill. részben oldódnak az alsó szerves fázisban. Az izoamilalkohol csökkenti a szeparálást kísérő habzást.

### **A mintafelvitelhez és az elektroforézishez szükséges oldatok**

**STOP oldat:** 0,25% brómfenolkék  
5 mM EDTA (pH 8,0)  
20% Ficoll Type 400 (Pharmacia) vízben oldva

### **TAE (Trisz-acetát) puffer**

Összetétel a felhasználáskor (1x)  
0,04 M Trisz-acetát  
0,001 M EDTA

Koncentrált törzsoldat (50x)  
242 g Trisz bázis  
57,1 ml jégecet  
100 ml 0.5 M EDTA (pH 8,0)  
végtérfogat egy liter

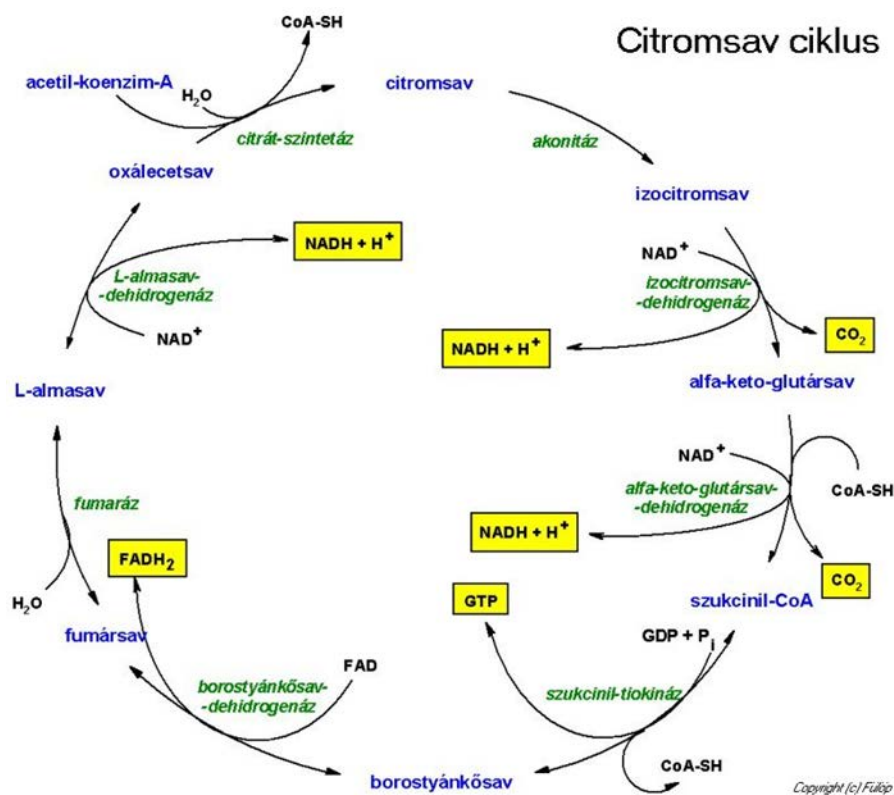
## 6. GYAKORLAT

### Oxido-redukciós folyamatok vizsgálata

#### Bevezetés

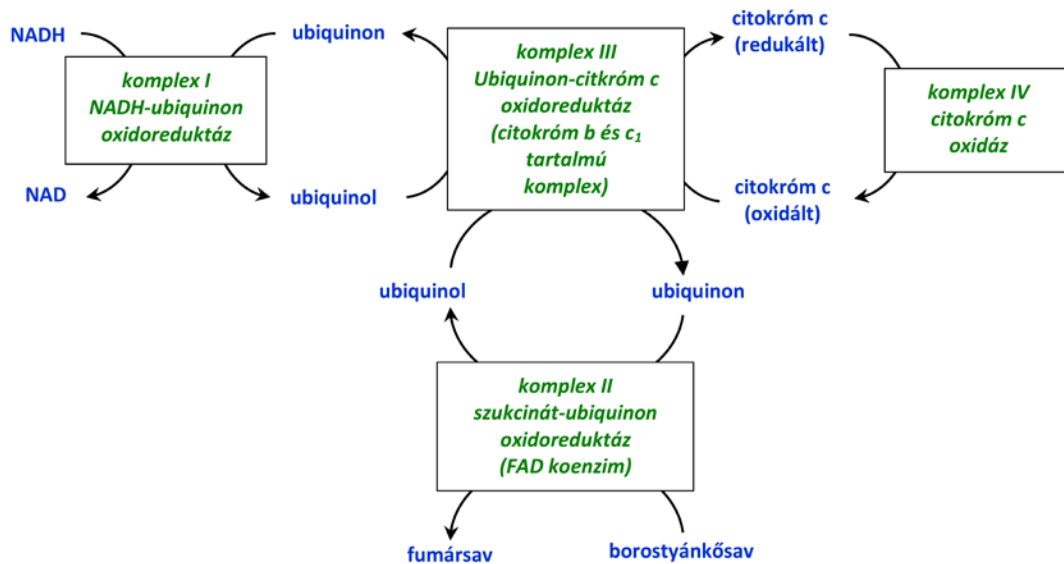
#### Dehidrogenázok kimutatása néhány citromsav-ciklus intermedier felhasználásával

A citromsav-ciklus közös útvonala a tápanyagok respiratív (aerob) lebontásának. A legtöbb tápanyag acetyl-CoA formájában lép be a citrát körbe. A ciklusban az acetyl csoport oxidációjakor az izocitrát dehidrogenáz, az  $\alpha$ -ketoglutarát dehidrogenáz és az almasav dehidrogenáz aktivitása során három NADH, a borostyánkősav dehidrogenáz aktivitása során pedig egy  $\text{FADH}_2$  keletkezik.



6.1. ábra: A citromsav-ciklus folyamata

A redukált koenzimek visszaoxidálása, a mitokondriális elektrontranszport lánc működése során történik, amelyhez a borostyánkősav oxidációja is kapcsolódik.



6.2. ábra: A mitokondriális légzési elektrontranszport lánc tagjai és működése egyszerűsítve

A gyakorlat során a dehidrogenázok aktivitásának kimutatását feltárt élesztő sejtek szuszpenziójának segítségével végezzük, ami természetesen együttesen tartalmazza a citrát ciklus valamennyi enzimét és az elektrontranszport lánc komponenseit is. Amennyiben a vizsgált mintákban gátoljuk az  $O_2$  bejutását az egész mitokondriális elektrontranszport lánc elredukálódik. Ha ilyenkor a kísérleti rendszerbe egy redukálható festéket (pl. metilénkék) adunk, akkor citrátköri oxidálható szubsztrát jelenlétében a dehidrogenázok által termelt redukált koenzimek visszaoxidálása során az  $O_2$  helyett a redox festék lesz az elektron akceptor. Így a NADH és a  $FADH_2$  visszaoxidációja csak akkor zajlik, amikor jelen van a redukálható festék, és csak addig, amíg az el nem fogy. Redukciója során a festék elszíntelenedik. Kimutatták, hogy a gyakorlat során is használt metilénkék a citokróm-b és a citokróm-c között működik elektron akceptorként. A gyakorlat során borostyánkősav szubsztrát esetén a borostyánkősav dehidrogenáz malonáttal történő gátlását is megfigyelhetjük.

A gyakorlathoz kapcsolódó további elméleti témakörök a sejten belüli oxidatív anyagcsere folyamatok: Citromsav-ciklus, és terminális oxidáció

## A gyakorlat kivitelezése

### Anyagok és eszközök

pékélesztő  
0,06 M Na-foszfát puffer (pH=6,00)  
0,04 M citrát  
0,04 M malát  
0,1 M malonát  
0,04 M szukcinát  
0,01 % metilénkék festék  
kvarchomok  
dörzsmozsár, vegyszerkanál, centrifuga, centrifuga csövek, kémcsövek, jég

### Eljárás

- 10 g élesztőt 30 ml 0,06 M Na-foszfát (pH=6,00) oldatban szuszpendálunk, majd rövid keverés után 3000 rpm-el (fordulatszám per perccel) centrifugáljuk centrifuga csövekben, ügyelve az egymással szembeni minták tömegének egyenlővé tételére.
- Az előző műveletet megismételjük.
- A második centrifugálás után a sejteket átkaparjuk egy porcelán dörzsmozsárba és hidegen (jégen) egy kis kanál kvarchomokkal eldörzsöljük, majd 10 ml 0,06 M-os Na-foszfát pufferrel (pH=6,00) elkeverjük és a homokról a feltárt sejtszuspenziót dekantáljuk. (A dekantálás során a szuszpenzió oldatát óvatosan elkülönítjük a homok tartalmú üledéktől). Ezt a preparátumot használjuk a szukcinát dehidrogenáz aktivitás kimutatására.
- Ezt követően az alábbi táblázat szerint összemérjük a vizsgálandó reakció elegyeket.

Cső	Élesztő szuszpenzió	0,01% metilénkék	Deszt. víz	0,04M szukcinát	0,1M malonát	0,04M malát	0,04M citrát
1.	0,2 ml	1 ml	1 ml	-	-	-	-
2.	0,2 ml	1 ml	1 ml	0,5 ml	-	-	-
3.	0,2 ml	1 ml	1 ml	0,5 ml	0,5 ml	-	-
4.	0,2 ml	1 ml	1 ml	-	-	0,5 ml	-
5.	0,2 ml	1 ml	1 ml	-	-	-	0,5 ml

- A kémcsöveket összerázzuk, majd mindegyik csövet parafilmmel gondosan lezárjuk, ezzel akadályozzuk meg az oxigén diffúzióját a reakcióelegybe. Végül a csöveket szobahőmérsékleten hagyjuk elszíntelenedni. **Az elszíntelenedés idejét feljegyezzük!**

**Feladat:** Magyarázzuk meg a citromsav-ciklusra, és a terminális oxidációra vonatkozó ismereteink segítségével az elszíntelenedések idejében tapasztalt különbségeket!

## **Bevezetés a kromatográfiás technikákhoz (7. és 8. gyakorlat)**

Kromatográfia néven foglalhatjuk össze mindazokat az elválasztás-technikai módszereket, amelyekben valamilyen elegy két fázis közötti megoszlás eredményeként válik szét komponenseire. A két fázis közötti anyagátadás alapulhat adszorpción, ionos kölcsönhatáson, diffúzió, oldékonyságon, affinitás-kromatográfia esetén pedig különleges kölcsönhatásokon. Kivételt képez a gélszűrés (méret szerinti kizárásos kromatográfia) ahol az elválasztás alapja nem megoszlás, hanem a molekulák méretének és alakjának különbözősége.

A kromatográfiás módszereknek nagy jelentőségük van a biológiai eredetű molekulák analitikai és preparatív elválasztása során. Makromolekulák tisztításakor, kihasználva azok eltérő méretét és alakját, gyakran alkalmazuk a gélszűrési kromatográfiát. Eltérő töltésük (ami a közeg pH-jának változtatásával szabályozható) alapján jól alkalmazható az ioncserélő kromatográfia is. Affinitáskromatográfia segítségével pedig valamilyen biológiai specifitás pl. enzim-szubsztrát, enzim-inhibitor, receptor-ligandum, antigén-antitest stb. használható fel úgy, hogy a specifikusan kölcsönható pár egyik komponensét szilárd fázishoz rögzítjük, ami képes kikötni egy elegyből a kölcsönható partnert. Az elegy egyéb komponensei ezután mosással eltávolíthatók, majd a mozgó fázis paramétereinek változtatásával a specifikus kölcsönhatást megszüntetve az elválasztandó anyag tisztán lemosható az oszlopról.

Az analitikai felhasználások végtelen sorából fontosságuknál fogva az aminosavanalízist, vagy a fehérje szekvenálás során az Edman lebontáskor keletkező aminosavszármazékok analízisét említjük meg. Mindkettő kromatográfiás módszerekkel történik.

## 7. GYAKORLAT

### Fehérjeminta sómentesítése gélszűréssel

#### Gélszűrési kromatográfia

Gélszűrés során a kromatográfias oszlop töltete egy finom szemcsés, 10-300  $\mu\text{m}$  átmérőjű szemcsékből álló porózus, hidrofil gél. Ennek segítségével a kromatográfias oszlopban két folyadéktér alakul ki. Az egyik a gélszemcséken kívüli tér, a másik a gélszemcsék belsejében levő tér.

Ha egy oldat halad keresztül egy ilyen kromatográfias oszlopon annak részecskéi – kicsiny méretük okán – szabadon áramlanak mind a gélszemcséken kívüli, mind az azokon belüli térben. Ezzel szemben az oldott molekulák méretüktől függően kevésbé, vagy egyáltalán nem férnek be a gélszemcsék pórusaiba, így számukra a gélszemcsék belsejében lévő tér csak korlátozottan, vagy egyáltalán nem hozzáférhető. Ha az egyszerűség kedvéért két olyan részecske vándorlását hasonlítjuk össze, amelyeknek egyike olyan kicsi, hogy szabadon át tudja járni a gélszemcsék belsejében levő teret, míg a másik olyan nagy, hogy onnan teljesen kizáródik és csak a gélszemcsék közötti térben tud mozogni, akkor a kettő között igen nagy vándorlási sebességkülönbség fog fellépni. Ennek oka az, hogy míg a kis részecske a kromatográfias oszlop teljes, folyadék által kitöltött keresztmetszetében tud áramlani (a gélszemcséken belül és kívül), addig a nagy részecske csak abban a jóval kisebb keresztmetszetű folyadéktérben áramolhat, ami a gélszemcsék közötti térben van. A hidrodinamika törvénye szerint pedig az áramlás sebessége fordítottan arányos annak keresztmetszetével, ami jelen esetben a részecskék eltérő áramlási sebességét jelenti, a nagyobb részecske gyorsabban mozog.

A gélszűrés eredményét rendszerint elúciós diagram formájában ábrázoljuk. Ezen az eluálódott anyag koncentrációját ábrázoljuk az eluens térfogatának függvényében. Azt a térfogatot, ahol egy adott molekula az elúció során megjelenik, elúciós térfogatnak ( $V_e$ ) nevezzük. Más kromatográfias módszerekkel analóg módon egy adott komponens elúciója legjobban a megoszlási koefficienssel ( $K_D$ , distribution coefficient) jellemezhető.

$$K_D = (V_e - V_o) / V_s$$

Az egyenletben  $V_o$  egyenlő a kizárási térfogattal, ami egyenlő egy olyan molekula elúciós térfogatával, ami a gél legnagyobb pórusméreténél is nagyobb, tehát csak a gélszemcséken kívüli téren halad keresztül, vagyis a gélből teljesen kizáródik. A  $V_s$  egyenlő a gélszemcséken belüli folyadék térfogatával, ami teljes egészében csak olyan kis molekulaméretű komponensek számára hozzáférhető melyek szabadon, akadály nélkül közlekednek ki és be a gél legkisebb pórusain is. Maga a  $V_s$  értéke nem könnyen meghatározható, ezért a gyakorlatban  $V_r - V_o$  értékkel helyettesítik, amiben benne van a gél anyagának nem elhanyagolható térfogata is. Ezért a megoszlási konstans  $K_D$  helyett, ami csak a valódi folyadékterekre lenne igaz, egy látszólagos térfogatra (apparent volume) vonatkozó konstans:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_r - V_o)$$

értéket használunk, ahol  $K_{av}$  a géltérfogat azon hányadát jelenti, ami hozzáférhető egy adott méretű molekula számára. Teljesen kizáródó makromolekula esetén  $K_{av}=0$ , a gél teljes térfogatában is szabadon diffundáló kis molekula esetén pedig  $K_{av}=1$ .

## A kísérlet tervezése

### a) A gél típusának kiválasztása

Az elválasztandó anyag tulajdonságainak megfelelően számos különböző gélfiltráló anyag áll rendelkezésre. Ezek a gélmátrix kémiai tulajdonságaiban, a pórusok méretében, a gél szemcsék méretében, kémiai és fizikai stabilitásukban térnek el egymástól. Az elsőként kifejlesztett és ma is széles körben használt gél anyaga térhálósított dextrán. Az ebből készült, és a keresztkötések számával szabályozott különböző pórusméretű gyöngypolimerek Sephadex márkanéven ismeretesek. Legismertebbek a teljesen hidrofil, vizes oldatokban használatos G típusú Sephadex gélek.

A G típusjelzés melletti számok a pórusméretre utalnak pl a G-25 jelzésű Sephadex kisebb, 1000 - 5000 Da molekulatömegű anyagok szeparálására vagy nagyobb fehérjék sómentesítésére használható. A nagyobb méretű makromolekulák frakcionálására mintegy 200-300 kDa molekulatömegig a G-150 vagy G-200 Sephadex gélek használhatók.

### b) A gél szemcseméretének kiválasztása

Finom szemcsékkel töltött kromatográfiás oszlopban a gél jobban kitölti a rendelkezésre álló térfogatot, ezért csökken a gél szemcséken kívüli folyadéktér térfogata, kisebb lesz a hígulás, a sávok szélesedése, ezért jobb az oszlop felbontóképessége. Romlik viszont a tömörebb géloszlopon a folyadék áramlási sebessége. Igen finom (Super Fine) szemcsék esetén nagyobb nyomást, 10  $\mu\text{m}$  szemcseméret alatt speciális pumpákat kell alkalmazni, és természetesen rigid, nem összenyomható géltípust lehet csak használni.

### c) Az oszlop méretének kiválasztása

Két szeparálódó zóna közötti távolság a gélszűrés során az oszlop hosszának négyzetgyökével arányosan növekszik. Hosszú oszlopokat (100 cm felett) használunk, ha nagy felbontóképességre van szükség, sómentesítésre vagy más nagy különbséggel elválható minták esetén rövidebb, 50 cm alatti oszlopokat használhatunk.

### d) A mintatérfogat kiválasztása

Analitikai célra illetve nehezen szétválasztható komponensek esetén, ahol maximális felbontóképesség szükséges, az oszlop hosszához képest keskeny indulási zóna kívánatos. Ezért a minta térfogatát úgy kell kiválasztani, hogy az a oszloptöltet térfogatának 1-5%-a legyen. Ennél kisebb mintatérfogat már nem javít a felbontáson, viszont a hígulás mértéke nagyobb lesz. Jól szeparálódó komponensek esetén, különösen preparatív munka során a minta térfogatát akár az oszloptérfogat 15-20%-ára is emelhetjük.

### e) Az eluens kiválasztása.

Az eluens összetétele közvetlenül nem befolyásolja a gélszűrés felbontóképességét, de minden olyan komponens, ami a szeparálódó molekulákra hat, befolyásolhatja az elválasztást. Az oldószer pH-ja, ionerőssége, esetleg detergens jelenléte

befolyásolhatja az oldott molekulák állapotát, pl. alakváltozás vagy több alegységes fehérjék vagy enzim-inhibitor komplexek disszociációja következhet be, ami természetesen megváltoztatja az anyag kromatográfiás viselkedését. Általában híg, néhány század mólós neutrális puffereket használnak, melyek a szeparálandó anyag szerkezetét nem befolyásolják, visszaszorítják ellenben a szeparálandó molekulák és a gélmátrix közötti nem kívánatos adszorpciós kölcsönhatásokat.

Ha a szeparált molekula frakciókat később töményíteni kívánjuk, vagy a gélszűrésnél alkalmazott sót el kívánjuk távolítani, célszerű illékony sót, pl. ammónium-hidrogénkarbonátot alkalmazni, ami liofilizálás vagy filmbepárlás során könnyen eltávozik.

#### **f) Az eluens folyási sebességének kiválasztása.**

Gélszűrés során a növekvő áramlási sebesség rontja a felbontóképességet. Optimális áramlási sebességnek  $5-10 \text{ ml/cm}^2 \times \text{óra}$  ajánlott, de a legtöbb esetben ennek néhányszorosa még nem rontja jelentősen a szeparálást. Preparatív munkánál, vagy ahol a műveletet valamilyen okból gyorsan kell végrehajtani, a nagy folyási sebesség előnye ellensúlyozhatja a szeparálás romlását.

Nagy folyási sebesség eléréséhez természetesen nagyobb nyomás szükséges, ezért ilyenkor figyelembe kell venni a gélmátrix mechanikai stabilitását. Nem rigid gélek a megengedettnél nagyobb nyomáson összenyomhatók, ami a kromatográfiás oszlop teljes dugulásához vezethet.

## **A gyakorlat kivitelezése**

Minta: 0,5 M NaCl-ban oldott marha szérum albumin

Oszlop: BioRad 1 cm x 50 cm oszlop beépített szűrőlappal

Gél típus: Sephadex G-25 Medium

Eluens vagy gélfiltráló (GF) puffer: 0,1%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

#### **A gél duzzasztása**

Ha a gélmátrix száraz porként áll rendelkezésre, azt először GF pufferben fel kell szuszpendálni, majd teljes duzzadásig állni hagyni mielőtt az oszlopba töltenék. A duzzasztás során dekantálással el kell távolítani a töredezett, nehezen ülepedő, túl finom részecskéket, mert ezek rontják a géloszlopban a puffer áramlási sebességét. A gél duzzadási térfogata és a duzzadás ideje függ a gél típusától. A Sephadex G-25 egy grammja körülbelül 5 ml-re duzzad, nagyobb pórusméretű gélek egy grammja 20-30ml-re is duzzad és a duzzadás hosszabb időt igényel.

A száraz gél fokozatosan adjuk állandó keverés közben a GF puffer nagy feleslegéhez. Keveréshez üvegbotot vagy műanyag lapátot használjunk, ne használjunk mágneses keverőt, mert az összetöri a gélszemcséket. A duzzasztás melegítéssel gyorsítható,  $80^\circ\text{C}$ -on általában 4-5 óra. A teljes duzzadás után a gél szuszpenziót szűrőpalackban légtelenítjük, hogy a szemcsék belsejében maradt apró légbuborékok eltűnjenek. Bizonyos gélfajtákat duzzasztott állapotban árusítanak, ilyenkor csak a szállításhoz használt, rendszerint konzerváló szert tartalmazó puffert kell lecserélni friss GF pufferre, továbbá a légtelenítést ajánlott elvégezni a használat előtt. Ugyanez vonatkozik a hosszabb ideig használaton kívül tárolt, korábban duzzasztott gélekre is.



A gyakorlaton használatos Sephadex G-25 gél duzzasztva, használatra kész állapotban van.

### **Az oszlop megtöltése**

1. Rögzítsük függőlegesen a kromatográfiás oszlopot.
2. Töltsünk az oszlopba kb. 10 cm magasságban GF puffert, ellenőrizzük, hogy a szűrőlap alatt illetve a kifolyó rendszerben ne legyen levegőbuborék. Ha a levegőbuborékot az oszlop kinyitásával nem tudjuk eltávolítani, célszerű az oszlopba fecskendő segítségével a puffert alulról bejuttatni. Ezután zárjuk el az oszlop kifolyó nyílását.
3. Csatlakoztassunk tölcserít az oszlop tetejéhez és öntsünk lehetőleg egyszerre annyi egyenletesen felkevert, tejföl sűrűségű gélsuszpenziót az oszlopba - kihasználva a tölcser térfogatóát is-, ami leülepedés után biztosítja a szükséges gélmagasságot. Ez jelen esetben 35-40 cm. Amikor az oszlop alján a gélszemcsék már néhány cm magasságban leülepedtek, nyissuk ki a kifolyó csapját, és hagyjuk a teljes gél mennyiséget leülepedni. Vigyázzunk, hogy a leülepedett géloszlop felett mindig legyen GF puffer, nehogy a gél, ill. annak felszíne kiszáradjon (ezt a gélágban megjelenő, hosszanti irányú repedések jelzik).
4. Amikor az oszlopban a gél a kívánt magasságban leülepedett, távolítsuk el a tölcserít, és kössük össze az oszlopot a pufferpalackkal a műanyag befolyócső és az oszlopféj segítségével. A puffer palack magasságát és a kifolyócső helyzetét úgy állítsuk be, hogy a nyomáskülönbség kb. 25-30 ml/óra folyadék áramlási sebességet eredményezzen.

### **A mintafelvétel és a szeparálás kivitelezése**

1. Zárjuk el a puffer palackot és az oszlop kifolyócsapját, nyissuk ki felül az oszlopot az oszlopféj kiemelésével.
2. Nyissuk ki a kifolyócsapot, és hagyjuk a gélfelszín felett levő GF puffert a gél felszínéig tökéletesen lefolyni, de vigyázzunk arra, hogy a gél felszíne ne száradjon ki. Célszerű a folyadék teljes beszivárgásakor a kifolyócsapot időlegesen elzárni.
3. Pasteur, vagy automata pipettával rétegezzük óvatosan az üvegfal mellett a sótartalmú fehérjemintát a gél felszínére, vigyázva arra, hogy a gélfelszínt ne zavarjuk fel. Ezután nyissuk ki az oszlopot, és hagyjuk a mintát egészen beszivárogni a gélbe, majd a minta felviteléhez hasonlóan 1 ml GF puffert rétegezve a gélfelszínre a mintát mossuk be a gélbe, a bemosást 2-3-szor megismételve.
4. A minta bemosása után a gélfelszín felkeverése nélkül kb. 2-3 cm magasságban GF puffert rétegzünk a gél felszínére, majd az oszlopot ismét összekötjük a puffer palackkal a befolyócső és az oszlopféj segítségével. Vigyázzunk, hogy a befolyócsőben ne legyen az egyenletes folyást akadályozó levegőbuborék.
5. Kapcsoljuk össze a kifolyócsövet az automata frakciószedővel, és nyissuk ki mind a puffer palackot, mind az oszlop kifolyócsapját.
6. A frakciószedő megfelelő beállításával gyűjtsünk 3 ml térfogatú frakciókat.

7. Mintegy 20 frakció szedése után mérjük meg minden frakció fényelnyelését 280 nm-nél, majd minden frakció vezetőképességét.
8. Zárjuk el a puffér palackot, és szedjük szét a kromatográfias rendszert. Mossuk át a gélt az oszlopból egy főzőpohárba, és tegyük félre az újrafelhasználásig. Tisztítsuk ki a rendszer minden komponensét.

**Feladat: Határozzuk meg mind a fehérje, mind a só elúciós térfogatát, közös grafikonon ábrázolva a fényelnyelést illetve a vezetőképességet az oszlopon átfolyt GF puffér térfogatának függvényében.**

## 8. GYAKORLAT

### Tojássárga lipidek vékonyréteg kromatográfiás elválasztása

#### Bevezetés

A kromatográfiás molekula elválasztási technikák típusait és általános jellemzőit lásd a 7. gyakorlat előtti bevezetőben.

#### A vékonyréteg kromatográfia

A vékonyréteg-kromatográfia (TLC-Thin Layer Chromatography) egyszerű, gyors és olcsó módszer szerves komponensek elválasztására, kvalitatív vagy fél-kvantitatív analízisére.

A vékonyréteg-kromatográfia esetében az elválasztás egy vékony állófázison keresztül valósul meg. Az állófázis anyaga leggyakrabban szilikagél, de alkalmaznak alumínium-oxidot vagy cellulózt is. A mozgó fázis olyan oldószer-keverék, amelyben a szeparálni kívánt minta komponensei jól, de kissé különböző mértékig oldódnak.

A gyakorlaton szilikagél vékonyréteg lapokat használunk. A szilikagélt kovasav dehidratálásával állítják elő. A dehidratálást hevítéssel végzik, melynek során Si-O-Si kötések alakulnak ki, a szilikagél felületén pedig szilanol (Si-OH) csoportok maradnak. A nagy fajlagos felületű gélhez az elválasztani kívánt komponensek adszorpcióval kötődnek. A szilikagélre felvitt minta komponensei eltérő erősséggel kötődnek a gélhez, továbbá az eluensben (oldószerben - mozgó fázis) való oldhatóságuk is különbözik. Így a gélen való adszorpciós képességük és a leoldás (elúció) során történő deszorpciójuk is eltérő. Ez a fő alapja a komponensek egymástól való elkülönítésének. Ahogy az oldószer halad a vékonyréteglapon, a kölcsönhatások eredője meghatározza, hogy a minta adott komponense meddig vándorol.

A vándorlást a vékonyréteg-kromatográfia során az  $R_f$  (retardációs faktor) értékkel jellemezzük.

$R_f =$	Az anyag vándorlási távolsága a starttól
	Az oldószerfront vándorlási távolsága a starttól

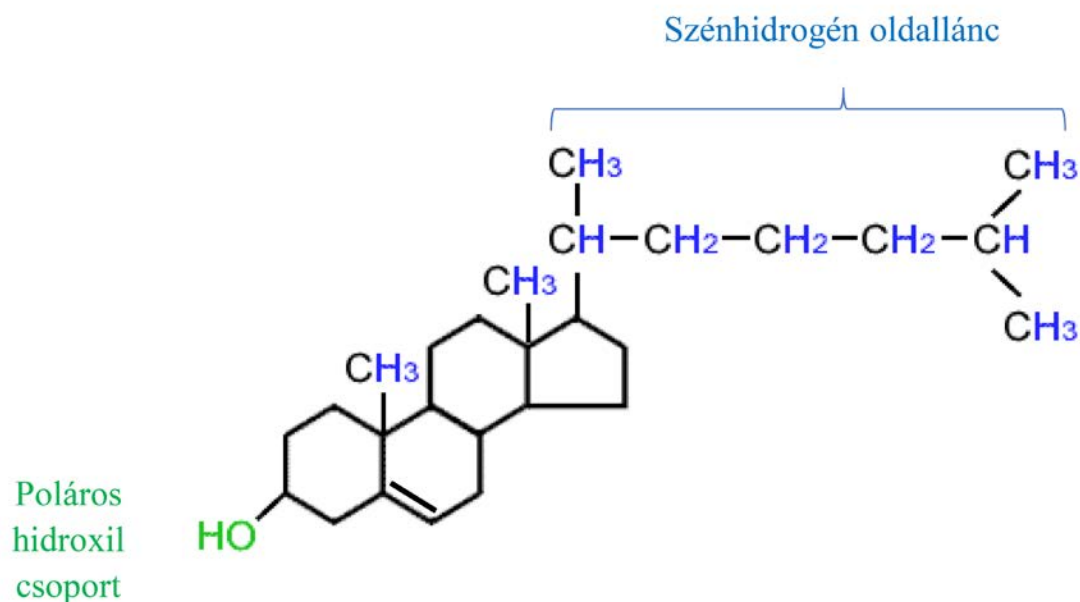
#### Az izolálendő lipidek: a koleszterin és a foszfatidilkolin

A lipidek vízoldhatatlan biomolekulák, amelyek apoláros szerves oldószerekben jól oldódnak. Szerkezetüket tekintve egymástól igen eltérő vegyületszerepek, amelyeket az élő szervezetben betöltött szerepük alapján csoportosítjuk: *Egyszerű lipidek*: Steroidok, karotinoidok, viaszok; *Összetett lipidek*: Neutrális zsírok, Foszfopilidek, Szfingolipidek, Glikolipidek és egyéb összetett lipidek. Szerepük a biológiai folyamatokban nagyon sokrétű: tartalék tápanyagok, fotoszintetikus pigment molekulák, hormonok, energiát raktároznak, a jelátviteli folyamatokban és a membránok alkotóiként egyaránt megtaláljuk őket.

### A koleszterin

A koleszterin a gerincesek minden szövetében – mintegy 0,05-5%-nyi mennyiségben – megtalálható, ciklopentanoperhidrofenantrén-vázat tartalmazó, 27 szénatomból álló vegyület.

A koleszterin vízben rosszul, hidrofób oldószerekben jól oldódik. A szervezetben megtalálható koleszterin 70%-a nem szabad formában, hanem valamilyen zsírsav (olajsav, linolsav) észtereként található meg.



7.1.ábra: A koleszterin szerkezete

A szervezet egyik legellentmondásosabb molekulája, hiszen egyrésztől nélkülözhetetlen az életfontosságú funkciók ellátásához (membránok fluiditásának szabályozása, szteroidhormonok szintézise, epesavak szintézise), másrészt viszont ha a normálnál nagyobb mennyiségben van jelen, akkor a szívinfarktus és az agyvérzés kialakulásához járulhat hozzá.

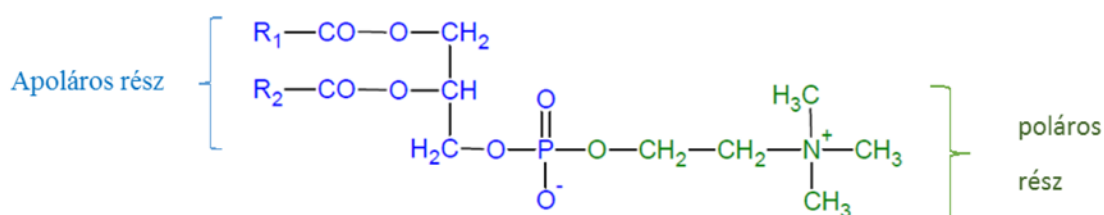
A koleszterin 5%-a a táplálékkal jut a szervezetbe, 95%-a *de novo* szintézis útján keletkezik minden sejtben. A májban, a mellékvesében, a petefészekben és a herékben, a koleszterinből más szteránvázis anyagok, pl. a szteránvázis hormonok is szintetizálódnak.

### A foszfatidilkolin (lecitin)

A lecitin a foszfolipidekhez tartozó vegyület. A foszfolipidek (vagy foszfatidok) nagy része glicerinszármazék (foszfogliceridek), ahol az 1-es C atom hidroxilcsoportját általában telített zsírsav, a 2-es helyzetű hidroxilcsoportot pedig egy egyszeresen vagy többszörösen telítetlen zsírsav (pl. olajsav) észteresíti. A 3-as szénatomhoz egy másik vegyülettel már észterkötésben levő foszforsav kapcsolódik, ugyancsak észterkötéssel. A lecitin esetében a 3-as szénatomhoz kapcsolódó foszforsavat kolin észteresíti. (Innen való a foszfatidilkolin név.)

Ahogy a foszfolipidek általában, a lecitin is struktúr lipid, vagyis a membránok felépítésében vesz részt. Legfontosabb tulajdonságuk, hogy a molekulán belül apoláros és poláros részeket különíthetünk el (amfipatikus sajátság).

A foszfatidilkolin a membránok egyik legfontosabb és legnagyobb mennyiségben jelen levő alkotója.



7.2. ábra: A foszfatidilkolin szerkezete (R<sub>1</sub> és R<sub>2</sub> :zsírsav oldalláncok)

## A gyakorlat kivitelezése

### Anyagok, eszközök

- 4-szeresére hígított tojássárgája oldat
- 1%-os NaCl oldat
- metanol
- kloroform
- ecetsav
- Merck Silica Gel 60 vékonyréteg lap
- 20% ammónium-szulfát
- pipetták, centrifugacsövek, centrifuga, főzőpohár, celofán, grafitceruza, 50 ml-es mérőhenger

### 1. A lipidek izolálása

A tojássárgájában nagy mennyiségben található koleszterin és lecitin, amelyek szerves oldószerekkel könnyen izolálhatók.

1. 160 µl hígított tojássárgája oldathoz adjunk 600 µl 2:1 arányú metanol-kloroform elegyet.
2. Az oldatot összerázzuk az Eppendorf csőben, majd 2500 rpm-el (fordulatszám per perccel) 4 percig centrifugáljuk az asztali mini centrifugával. A centrifugálás után a felülúszót egy új csőbe pipetázzuk át, figyelve, hogy az üledékből ne kerüljön az új Eppendorf csőbe.
3. A felülúszóhoz hozzáadunk 200 µl 1%-os NaCl-ot és 200 µl kloroformot. Összerázzuk, majd megint centrifugáljuk 2500 rpm-mel 4 percig.

4. A felülúszót leöntjük és az alsó, kloroform tartalmú fázist kipipettázzuk, és ebből kromatografálunk.
5. A kromatográfiához kontrollként 2%-os szójalecitin és 1%-os koleszterin oldatot (mindkettőt diklór-metánban oldva) használunk.

## 2. Az izolált lipidek elválasztása

### *A vékonyréteg lapok előkészítése, mintafelvitel*

1. A vékonyréteg lapokat felhasználás előtt gyakran aktiválni kell. Ez azt jelenti, hogy egy éjszakán át 110-130°C –os kemencében szárítjuk őket. Ily módon az esetlegesen megkötött víz távozik, a víztartalom csökkenésével pedig a szilikagél aktivitása megnő. A gyakorlaton már előkészített, légszáraz lapokkal dolgozunk. (Készen kapják.)
2. A vékonyréteg lapokat méretre kell vágni. A megfelelő méret kiválasztását több tényező függvénye. A kizárólag a kapilláris erő segítségével való futtatáshoz a **10 cm hosszúságú** lap a legmegfelelőbb. A lap szélessége a futtatni kívánt minták számától függ, jelen esetben **5 cm széles** lapokat használunk. Ügyeljünk arra, hogy a rétegek felületét ne érintsük meg, mert az ujjlenyomat előhívódhat!
3. A méretre vágott lapokon tompa grafitceruzával bejelöljük a startot, valamint a minták helyét és számát. Figyeljünk oda, hogy a szilikagélt ne sértsük meg a ceruzával! A startvonalat a lap aljától 1 cm-re rajzoljuk meg, a minták a lap oldalától és egymástól is 1-1 cm-re legyenek!
4. A szilikagéltre a mintákat cseppentéssel visszük fel. Az izolátumból és az ismert oldatokból is **5-5µl-t** vigyünk fel. A felvitelhez automata pipettát használjunk.

### *A kromatogram kifejlesztése (futtatás)*

A futtató oldat (eluens) kiválasztása: az alkalmazott oldatot az elválasztandó anyagok függvényében választjuk ki, a polárosabb anyagokhoz polárosabb futtató oldatot kell választani.

5. A gyakorlaton kloroform:metanolecetsav 65:25:10 v/v% -os elegyét alkalmazzuk. A futtató elegyből 50 ml-t kell készíteni üveg mérőhenger segítségével.
6. Futtató kádként légmentesen zárható üveget használunk (telített kád), amelyet a kromatogramm kifejlesztése alatt zárva tartunk. Ilyen módon az üveg a futtató oldat gőzeivel telített légtere egyensúlyban van a futtató oldattal. (Lehet használni ún. telítetlen kádakat is, ebben az esetben azonban nehezebb a mérést reprodukálni.)
7. A mintákat tartalmazó, száraz vékonyréteg lapot behelyezzük a telített kádba. (Ügyeljünk rá, hogy ekkor az eluens ne lepje el a startvonalat.) Ezután zárjuk be a kádat, és megfigyeljük, hogy a kapilláris erő hatására az oldószer elindul a lap teteje irányába.
8. A futtatást addig végezzük, amíg az oldószer frontja a lap tetejétől 1 cm távolságra nem ér. Ekkor kivesszük vékonyréteg lapot, és hagyjuk megszáradni.

## ***Előhívás, detektálás***

Az előhívás módjai:

### UV-lámpa

A legegyszerűbb detektálási mód. Bizonyos vegyületek fluoreszkálnak, azaz energiát képesek elnyelni, majd azt egy alacsonyabb hullámhossztartományban (ez általában a látható tartományba esik) kisugározzák. A fluoreszkáló anyag helyzete a lapon meghatározható.

A ma kereskedelmi forgalomban kapható lapok többségének anyagába fluoreszcens indikátort kevernek. Amennyiben az elválasztott minta komponensei elnyelik az UV fényt, az UV-lámpa alatt ezek sötét foltokként jelennek meg a fényes háttér előtt.

### Jódgőz

Az egyik legáltalánosabban használt előhívó reagens. A szerves vegyületek nagy részével különböző összetételű komplexeket képez, és így a vékonyréteg lapon színes foltokat ad.

### Kénsavas vagy ammónium-szulfátos előhívás

Gyakran alkalmazott, egyszerű detektálási mód, az érzékenysége azonban kicsi. A szerves vegyületek roncsolásán alapszik a módszer, melynek hatására sötétbarna foltokként jelennek meg a vegyületek.

Mivel a gyakorlaton nagyobb anyagmennyiségekkel dolgozunk, az **ammónium-szulfátos** detektálást alkalmazunk. A megszáritott lapot 20%-os ammónium-szulfát oldatba mártjuk egy pillanatra, épp csak annyi ideig, hogy a lap benedvesedjen. Utána 130°C-os szárítószekrénybe tesszük, és addig hevítjük, amíg a foltok meg nem jelennek.

## **Feladatok:**

1. **Készítsen rajzot a kromatogrammról, jelölje rajta a különböző anyagokat!**
2. **Az elválasztott komponensek milyen  $R_f$  értékkel rendelkeznek?**
3. **A kromatográfiás viselkedés alapján milyen következtetést lehet levonni a lecitin és a koleszterin kémiai tulajdonságairól, polaritásáról?**

## 9. GYAKORLAT

### Bioinformatika és *in silico* biokémia

#### Bevezetés

Az elmúlt két évtizedben nagyobb mennyiségű biológiai ismeret halmozódott fel, mint az elmúlt két és fél ezer év alatt összesen. Ez az újkeletű információ nagyjából nukleinsav- és fehérje-szekvenciákat jelent, köszönhetően annak a ténynek, hogy a géntechnológia segítségével viszonylag gyorsan és könnyen lehet rekombináns DNS klónokat előállítani és nukleotidsorrendjüket a Sanger-féle láncterminációs módszerrel, automata DNS szekvenátorban meghatározni. A hatalmas mennyiségű szekvencia tárolására és feldolgozására született meg a 1980-as évek közepén az informatika és a molekuláris biológia határmezsgyéjén egy új tudományág, a bioinformatika (*in silico* molekuláris biológia). A „klasszikus” **bioinformatika** tárgyköre a nukleinsav- és az általuk kódolt aminosav-szekvenciák analízisét jelenti, azonban sokkal szélesebb értelemben is használják. Eszerint a bioinformatika mindazon matematikai algoritmusok és módszerek *in silico* alkalmazása, amivel kísérleti adatok analíziséből biológia problémákra próbálunk választ kapni.

Egy biológus számára a leggyakoribb bioinformatikai alkalmazás az interneten szabadon hozzáférhető adatbázisokban való kutakodás. A DNS-szekvenciák legfontosabb adatbázisa, a **GenBank** jelenleg ~190 Gbp szekvenciát tartalmaz (2015 tavasz), úgynevezett annotált fájlok formájában. Az annotáció a „nyers” szekvencia adatokhoz hozzárendelt információt jelenti (gének illetve nyitott leolvasási keretek („Open Reading Frame”; ORF), szekvencia-motívumok, domének, publikációk, adatbázis kereszthivatkozások, stb.). A DNS-szekvencia-adatbázisok méretét manapság elsősorban a genom szekvenálások növelik. Jelenleg közel négyezer (jórészt prokarióta) élőlény teljes genomját ismerjük, köztük a saját fajunkét is – 2004-ben befejeződött a Humán Genom Program, azaz a 3,2 Gbp méretű emberi genom szekvenálása (pontosabban csak a genom ~80%-át kitevő, génekben gazdag eukromatint szekvenálták).

A legismertebb fehérjeadatbázis az **UniProt**, amely jelenleg ~550.000 annotált fájlban közel 200 millió aminosav szekvenciáját tartalmazza. Az elsődleges szerkezeti szintből, mint tudjuk, elvileg jósolható (volna) a fehérjék térszerkezete. Bár ezt a feladatot teljes egészében ma még nem tudjuk megoldani, a **szerkezeti bioinformatika** segítségével mégis fontos információkhoz juthatunk a különböző szerkezeti szintekről, a fehérjeevolúcióról, de akár az adott fehérje funkciójáról is. A legegyszerűbb szerkezeti bioinformatikai feladat a fehérjék térszerkezetének ábrázolása. Ha az általunk ábrázolni kívánt fehérje térszerkezetét valamilyen kísérleti módszerrel (röntgenkristallográfia, NMR spektroszkópia, homológia modellezés) már meghatározták, akkor a vizualizáláshoz mindössze az adott fehérje térszerkezeti koordinátáit standardizált formában tartalmazó fájlra és egy molekuláris grafikai programra van szükségünk. A térszerkezeti adatok kizárólagos adatbázisa a **Protein Data Bank (PDB)**, amelyben jelenleg >90.000 röntgenkristallográfiai és >10.000 NMR szerkezetet tárolnak.

A legfontosabb bioinformatikai adatbázisok illetve szerverek neve, Web elérési címe és tartalma:



- **GenBank** [www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)  
Annotált DNS-szekvencia-adatbázis, amelyet az NIH-hez (National Institutes of Health) tartozó National Center of Biotechnology Information tart fenn. Az **Entrez** szerver része, ami egy olyan integrált, adatbázisokat összefogó keresőfelület, ahol a molekuláris biológiával kapcsolatos szinte összes adat valamilyen formában elérhető. Ide tartozik a **PubMed** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>] publikációs adatbázis is, a biomedicina tárgykörébe tartozó (többek között a biokémia, molekuláris biológia összes folyóiratát lefedő), több mint 20 millió tudományos publikáció összefoglalója (és sok esetben a teljes közlemény is) ingyenesen hozzáférhető. A **Bookshelf** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>] online könyvtárban számos fontos tankönyv teljes terjedelmében olvasható (pl. Stryer: Biochemistry!!!).
- **UniProt** (korábban SwissProt) [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)  
Annotált aminosavszekvencia-adatbázis. Az ExPASy (**Expert Protein Analysis System**) szerverhez kapcsolódik, amelyen számos proteomikai adatbázist és online programot (DNS→fehérje transzláció, molekulatömeg és izoelektromos pont számolás, motívum és poszttranszlációs módosítások keresése, szerkezeti predikciók stb.) lehet elérni.
- **Protein Data Bank (PDB)** [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb) vagy  
Kísérletesen meghatározott fehérje (és más makromolekula) térszerkezeti adatbank. Az annotált fájlok térszerkezet koordináta adatokon kívül az adott fehérje funkciójára vonatkozó információt is tartalmaznak. A szerkezeti modelleket online grafikai programokkal lehet vizualizálni (lásd a 10. gyakorlatot). A fenti internetcímen érhető el a „Hónap molekulája” weboldal, amely egy-egy fontos fehérje szerkezetét és működését mutatja be röviden és érthetően.

A komputerek használata nem csak bioinformatikai felhasználást jelenthet egy biokémikus számára. Gyakorlatilag az összes biokémiai módszer szimulálható, virtuális módon is kivitelezhető. Egy ilyen „száraz laboratórium” gyakorlat során nincs anyagköltség és hosszadalmas kísérletsorozatok is gyorsan végrehajthatók. A fentiekén kívül a számítógépek a különféle multimédiás alkalmazások és 3-dimenziós grafikai programok révén az elméleti anyag elsajátításához is jelentős segítséget tudnak nyújtani. A biokémia tankönyvek legújabb kiadásaihoz kapcsolódó honlapokon illetve a hozzájuk járó CD-ken témérdek hasznos oktatási segédanyag található.

Az *in silico* gyakorlatok során több bioinformatikai alkalmazásba fogunk „belekóstolni” (lásd a 10. gyakorlatot is), valamint találkozni fogunk a fentebb említett multimédiás oktatási segédanyagokkal is (ebben az esetben azt a célt szeretnénk elérni, hogy az otthoni tanulás során később is visszatérjenek ezekhez az weboldalakhoz illetve CD-khez).

## A gyakorlat kivitelezése

### **Feladat:** Ismeretlen nukleinsav- és aminosavszekvenciák azonosítása és analízise

A BIOINFO nevű fájlban, amely a gyakorlaton használt számítógépen az „asztalon” érhető el (valamint a jegyzet Függelékben), nukleinsav- és fehérje-szekvenciákat talál. Feladata, hogy a **BLAST** hasonlóságkereső program segítségével azonosítsa a szekvenciákat és röviden jellemezze a gént illetve a génterméket (az interneten elérhető adatbázisok segítségével)! Válaszoljon a feltett kérdésekre is! A feladatok végrehajtásához szükséges információ bármely adatbázisból, de a PubMed-en elérhető eredeti tudományos publikációkból is származhat.

Két nukleotid-, vagy aminosavszekvencia hasonlóságát számos programmal lehet vizsgálni. Az interneten is hozzáférhető programok közül a **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) nevű programot fogják használni. Ez egy ún. heurisztikus algoritmust használ, ami lehetővé teszi, hogy egy általunk megadott ún. kereső („*query*” vagy „*target*” szekvenciát a hatalmas méretű adatbázisokkal nagyon gyorsan össze lehessen hasonlítani. Az algoritmus gyorsasága abban rejlik, hogy a keresőszekvenciát rövidebb szakaszokra („szavakra”) bontja, és a teljes szekvencia illesztése helyett ezeket a szavakat keresi meg az adatbázisból, majd egy pontozási táblázat segítségével a legrelevánsabb találatok illesztését terjeszti ki mindkét irányban. Amennyiben nukleotidszekvenciával keresünk, akkor a **BLASTN** alprogramot kell használnunk. Ha polipeptid szekvenciánk van, akkor a **BLASTP** alprogrammal fehérjeadatbázisokban kereshetünk. A **BLASTX** alprogram a kereső nukleinsav-szekvenciát mind a hat leolvasási keretben lefordítja és ezzel keres a fehérjeadatbázisban. A **TBLAST** alprogramok segítségével lefordított nukleinsav-adatbázisokban kereshetünk fehérje-(TBLASTN) vagy lefordított nukleinsav-szekvenciákkal (TBLASTX).

A BLAST futás eredményeként olyan találatokat kapunk, amelyek az adatbázisban tárolt szekvenciák közül szignifikáns hasonlóságot mutatnak a célszekvenciával. A program sorba állítja ezeket a szekvenciapárokat, kezdve a legnagyobb hasonlóságot mutatóval. A szignifikanciát egy E-vel jelölt, a véletlen hasonlóság mértékéhez viszonyított várható érték (expectation) jelzi, valamint egy „score” érték, ami az azonos, hasonló és „rés” (gap) pozíciókat számolja egy nukleotid vagy aminosav hasonlósági mátrix alapján (pl. ilyenek az elméleti órán tanult BLOSUM mátrixok). Ha  $E < 0,01$ , akkor a két szekvencia minden bizonnyal homológ (de legalábbis hasonlósága valószínű). A nagy hasonlóságot mutató szekvenciák azonosító kódjuk (accession number) alapján megkereshetők az annotált adatbázisokban. A BLAST eredmény oldaláról közvetlen linkekkel is eljuthatunk a GenBank adatbázisba, ahol az adott fájl annotációjából már sokat megtudhatunk a keresett génről, cDNS-ről és az általa kódolt fehérjéről. További információkhoz jutunk, ha az eddig fellelt információ alapján megkeressük a fehérjénket az UniProt adatbázisban, ahonnan linkeken keresztül még számos más adatbázishoz is eljuthatunk.

A **BLAST** program elérési címe: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

## 10. GYAKORLAT

### Fehérjék térszerkezetének molekuláris grafikai ábrázolása

#### Bevezetés

Bár a makromolekulák térszerkezetének kísérletes meghatározása atomi felbontásban nehéz feladat, ennek ellenére egyre növekszik az ismert fehérje, fehérje-fehérje és fehérje-nukleinsav komplex szerkezetek száma. A legfontosabb szerkezeti adatbázis a PDB. Az itt elhelyezett szerkezeteket általában kísérletes úton, röntgenkristallográfiával (X-ray diffraction), vagy magi mágneses rezonancia-spektroszkópiával (NMR) határozták meg. Az adatbázisból letölthető fájl \*.pdb kiterjesztéssel rendelkeznek: ez tartalmazza az atomok elemi koordinátáit. Ezen felül számos egyéb fontos adatot szoktak mellékelni (annotáció): ilyenek például a szerkezet „jóságát” jelző statisztikai adatok, a szerkezeti szimmetriák, és a méréshez felhasznált fehérje fragmentumok pontos szekvenciája. Az atomi koordinátákat erre a célra alkotott molekuláris rajzoló programokkal jeleníthetjük meg „élvezhető” formában. Rengeteg ilyen megjelenítő program létezik: SwissPDBviewer, Chimera, RasMol, Jmol, stb. A legtöbbjük ingyenesen letölthető és használható.

A legegyszerűbb módon csak az atomokat összekötő kémiai kötések ábrázoljuk, színes vonalak formájában („*lines*”). A színeket a vonalak egyes atomok alapján kapják, de mód van az átszínezésre az egyedi láncok alapján is: a komplex szerkezetek így átláthatóbbak lesznek. A számunkra kevésbé érdekes láncokat, aminosavakat vagy atomokat a kijelölésük után egy kattintással átlátszóvá téve akár el is tüntethetjük.

A vonalas modelleknél persze vannak sokkal szebbek is: ilyen például az "iskolai kémiai építőkészlet" golyó és pálcika („*ball & stick*”) modellje: ez főleg kis molekulák esetén nagyon látványos. A vonalas vagy pálcikamodellek nem igényelnek nagy számítási kapacitást, de az oldalláncok már a néhány tucat monomerből álló makromolekulák esetén is áttekinthetetlen "dzsungelt" eredményeznek. Nagy molekulák esetén ezért gyakrabban használjuk csak a fő láncot szalaggal ábrázoló („*ribbon*”) vagy a rajzos („*cartoon*”) módot. A molekula megjelenítések szemléletességének növelésére ezeket (és az alább sorolt) lehetőségeket egy molekula szerkezet különböző részeiben kombinációban is alkalmazunk. (Például egy aminosav oldalláncot golyó-pálcika ábrázolásban jeleníthetünk meg, mintegy kiemelve hogy pontos helyzetét bemutassuk egy amúgy csak szalag formában, leegyszerűsítve megjelenített hélixben.)

Rajzos modellben a nukleinsavak cukor-foszfát gerince vastag csőnek, míg a nukleinsav bázisok lapocskáknak fognak látszani. A fehérjék béta-redős régióit lapos nyilakkal, az alfa-héliceket „hajcsavarokkal”, míg a többi fehérjeszakaszt vékony csővel jelölik a programok. A publikációkban is leggyakrabban ezzel a megjelenítési móddal találkozhatunk. Fontos megjegyezni, hogy az eddig említett modellek egyike sem veszi figyelembe az atomok valódi térkitöltését. De ennek ábrázolására is van mód: akár hálóval („*mesh*”), akár teljes felszínnel („*surface*”). Fehérjék és kisebb molekulák kölcsönhatása különösen látványossá tehető, ha a kis molekulát pálcikákkal, a fehérjét pedig a felszín mutató módban ábrázoljuk. A felszín ábrázolásakor színezhethetünk is: nem csak az egyes atomok típusai, hanem a felszín karaktere szerint is: például ábrázolhatjuk a hidrofobicitást vagy a töltéssűrűséget. Ha pedig két rokon molekulát szeretnénk összehasonlítani, arra is

van mód: a legtöbb ilyen megjelenítő program (pl. PyMol, Chimera) tartalmaz „térbeli illesztést” lehetővé tevő algoritmusokat.

## RasMol

A RasMol egy ingyenes „stand alone” molekuláris grafikai program. Segítségével egy atomi koordinátákat tartalmazó térszerkezeti fájl tartalma szemléltethető formában megjeleníthető („*rendering*”). Két ablakból áll. Az egyikben a modellezett fehérjeszerkezet jelenik meg, a másik az ún. parancsablak. Beolavasható fájlokat a PDB adatbázisból tölthetünk le \*.pdb formátumban. Az először megjelenő ábrázolás a makromolekula szerkezetét „drót” („*wireframe*”) modellként mutatja. Áttekinthetőbb a szerkezet, ha a „*Display*” menüből a „*backbone*” ábrázolást választjuk. Választható még a térkitöltő („*spacefill*”), pálcika („*stick*”), golyó-pálcika („*ball & stick*”) vagy a szalagmodell („*ribbon*”, „*cartoon*”) is. A modellt színezhajjuk a standard CPK atomszínekkel, az egyes láncokat külön színnel („*chain*”), az aminosavak tulajdonságuk alapján („*shapely*”), a kristályon belüli mozgékonyaságuk alapján („*temperature*”) stb. A molekulát különböző síkokban el lehet vágni („*slab*” mód), sztereóban ábrázolni, a kristályban egyébként nem látható H-atomokat megjeleníteni.

Az egér bal gombbal a molekula az 'x' és 'y' tengely mentén forgatható, a jobb gombbal balra-jobbra tologatható. A bal-shift gombbal nagyítható, kicsinyíthető. a jobb-shifttel a 'z' tengely mentén forgatható.

A lánc bármely részletére rákattintva az egérrel, a parancsablakban megjelenik a kérdéses aminosav sorszáma az adott láncon belül, illetve az aminosavmaradék atomtípusa és atom sorszáma.

Molekularészek kijelölése a parancsablakból lehetséges. Az aminosavakat vagy sorszámukkal (pl. „*select 25A*”, a 25. aminosav az „A” láncon) vagy az aminosavnévvel együtt lehetséges. Láncrészletet kötőjellel jelölünk ki (pl. „*select 1-33*”, a polipeptidlánc első 33 aminosavát jelöli ki). Amennyiben a fehérje a polipeptidláncon kívül ligandumot is tartalmaz (prosztetikus csoport, szubsztrát, fémion), az „hetero” néven vagy a rövidített nevével szelektálható (pl. „*ca*” =  $\text{Ca}^{2+}$ ). A nevet a ligandumra kattintva meg tudhatjuk.

A parancsok mindig az utoljára szelektált molekularészre vonatkoznak. A parancskészlet megtalálható a menüben, de a párbeszédablakban is kiadható. Színeznai a „*color*” paranccsal és az utána írt színnel (pl. „*red*”, „*green*”, „*magenta*” stb.) lehet. A háttérrel a „*background color*” paranccsal lehet átszíneznai.

Molekularészletek eltüntethetők a „*restrict*” parancs kiadásával: „*restrict 1-56*” az 56-os aminosavtól eltünteti mindent.

A megváltoztatott modellt a „*write script*” paranccsal és egy fájlnev megadásával egy ún. script-fájlban el lehet menteni. A korábban elmentett fájlokat a parancsablakba beírt „*script*” és fájlnev paranccsal olvastathatjuk be.

A „*Help*” menüből további részletek tudhatók meg az ábrázolásokról, módosításokról és a lehetséges szerkezeti analízisekről. A RasMol egy sokat tudó program! Minden tulajdonságát kihasználni csak hosszabb tanulással lehet. Megjegyzendő, hogy szerkezeti modellezésre (homológia modellek készítése, mutáció szerkezeti hatásainak vizsgálata, energiainimalizálás, molekuláris dinamikai számítások) NEM alkalmas, arra más (általában nem ingyenes) programok ill. programcsomagok szolgálnak. További segítséget a Rasmol használatához itt talál:

<http://www.openrasmol.org/doc/>

[http://www.umass.edu/microbio/rasmol/faq\\_ras.htm](http://www.umass.edu/microbio/rasmol/faq_ras.htm)

## PyMOL

A PyMOL [<http://www.pymol.org/>] szintén nyílt forráskódú molekuláris grafikai program, amelyet jelenleg a leggyakrabban használnak tudományos publikációkban makromolekula térszerkezetek ábrázolására. Egyetemi hallgatók regisztráció után ingyenesen letölthetik és használhatják (a molekuláris modellező funkciókat kivéve). A RasMol-hoz hasonlóan egy fehérjeszerkezetet bemutató (PyMol Viewer) és egy parancsablakból áll. A PyMol egyik nagy előnye, hogy alkalmas a bevezetésben említett rokon molekulák térszerkezeteinek összehasonlítására. A program „align” és „super” parancsa az elsőként megadott molekulát addig tolja és forgatja a térben, amíg az a másiktól minimális távolságra és orientációba nem kerül (az atomi koordináták „euklideszi” különbségeit tekintve). A RasMol-hoz képest másik nagy előnye, hogy az elkészített szerkezeti ábrákat közvetlenül el lehet menteni nyomdai minőségű grafikai fájlokba.

A PyMol használatával kapcsolatban nagyon sok hasznos információ elérhető a Wiki [[http://www.pymolwiki.org/index.php/Main\\_Page](http://www.pymolwiki.org/index.php/Main_Page)] oldalán.

## Jmol

A Jmol [<http://jmol.sourceforge.net/>] is egy szabadon fejleszhető, Java programozási nyelven íródott molekuláris grafikai, böngésző program ún. kisalkalmazás (applet), amely azonban letölthető programként („ standalone” alkalmazásban) is használható. Bemeneti adatként a PDB fájl formátumon kívül számos más, a szerkezeti biológiában és a szerves kémiában használatos, atomi koordinátákat tartalmazó formátumot elfogad. A térszerkezetek molekuláris megjelenítéséhez szükséges parancsok a RasMol programhoz hasonlóak, ugyanazt a „ logikát” követik. Egyszerűbb molekulamodellezési feladatokat is el lehet végezni vele (atomok hozzáadása, törlése stb.) A parancsablakot a jobb egér gombbal lehet megnyitni. A program magyar nyelvű verziója is elérhető. A Pymol-hoz hasonlóan a Jmol-nak is van saját Wiki oldala [[http://wiki.jmol.org/index.php/Main\\_Page](http://wiki.jmol.org/index.php/Main_Page)], melyről a használatra vonatkozó információk elérhetők.

Jmol alkalmazást használ az egyik legnépszerűbb - oktatási célokra is kiválóan alkalmas Wiki oldal - a Proteopedia (Life in 3D). Az oldal a PDB-ben található szerkezetek interaktív ábrázolása mellett az egyes biológiai makromolekulák funkciójára vonatkozó leírásokat is tartalmazza.

## A gyakorlat kivitelezése

### **1. Feladat : fehérjeszerkezet ábrázolása és analízise PDB fájlból**

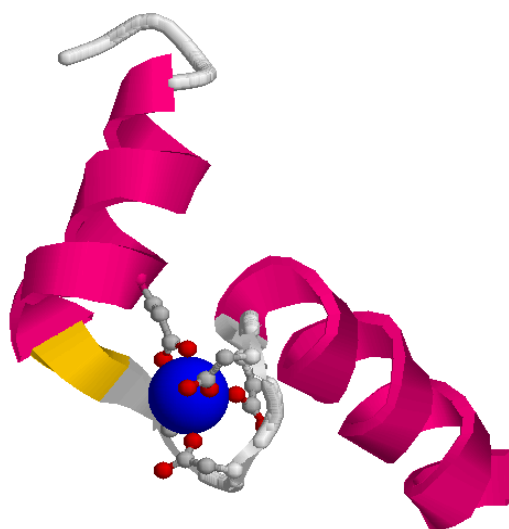
Keresse meg a PDB adatbázisban (<http://rcsb.org>) az 1CLL azonosítójú fehérjét! Az ott talált információk alapján válaszoljon a kérdésekre!

1. Mi a fehérje neve?
2. Milyen fajból származik?
3. Milyen funkcióval bír?
4. Milyen heterocsoportot/csoportokat tartalmaz a molekula?

Töltse le a számítógépre a térszerkezeti fájlt! Indítsa el a RasMol nevű programot, és nyissa meg vele a letöltött fájlt! A gyakorlat során megismerkedünk a fehérjék  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő képességének szerkezeti alapjával, amit a program segítségével teszünk láthatóvá. Keresse meg a fehérje Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) oldalán az első „EF-hand” motívumot! Ezt a régiót ábrázolja szalag („*cartoon*”) reprezentációval, míg a molekula többi része ne legyen látható! Színezzé az „EF-hand” motívumot a benne lévő másodlagos szerkezetnek megfelelően! A  $\text{Ca}^{2+}$ -iont térkitöltő („*spacefill*”) modellel jelenítse meg! A kétszeresen pozitív  $\text{Ca}^{2+}$ -iont negatív töltésű oldalláncok koordinálják, és egy Thr peptidgerinc karbonil oxigénje! (Erre vonatkozó információt ugyancsak a szerkezeti fájlban talál, illetve meg is keresheti, hiszen a koordinációban résztvevő atomok a  $\text{Ca}^{2+}$  ion 2,5 Å sugarú környezetén belül találhatóak.)

5. Melyek ezek az aminosavak (név-sorszám)?

A „*select*” parancs megfelelő használatával csak a koordinációban résztvevő aminosavak savas oldalláncát + alfa szénatomokat, valamint a koordinációban résztvevő peptid karbonil-csoportot ábrázolja golyó-pálcika („*ball&stick*”) modellel! Az oxigénatomokat színezzük pirosra! Mentsük el a képet!



## **2. Feladat: fehérjeszerkezetek térbeli illesztése és összehasonlítása**

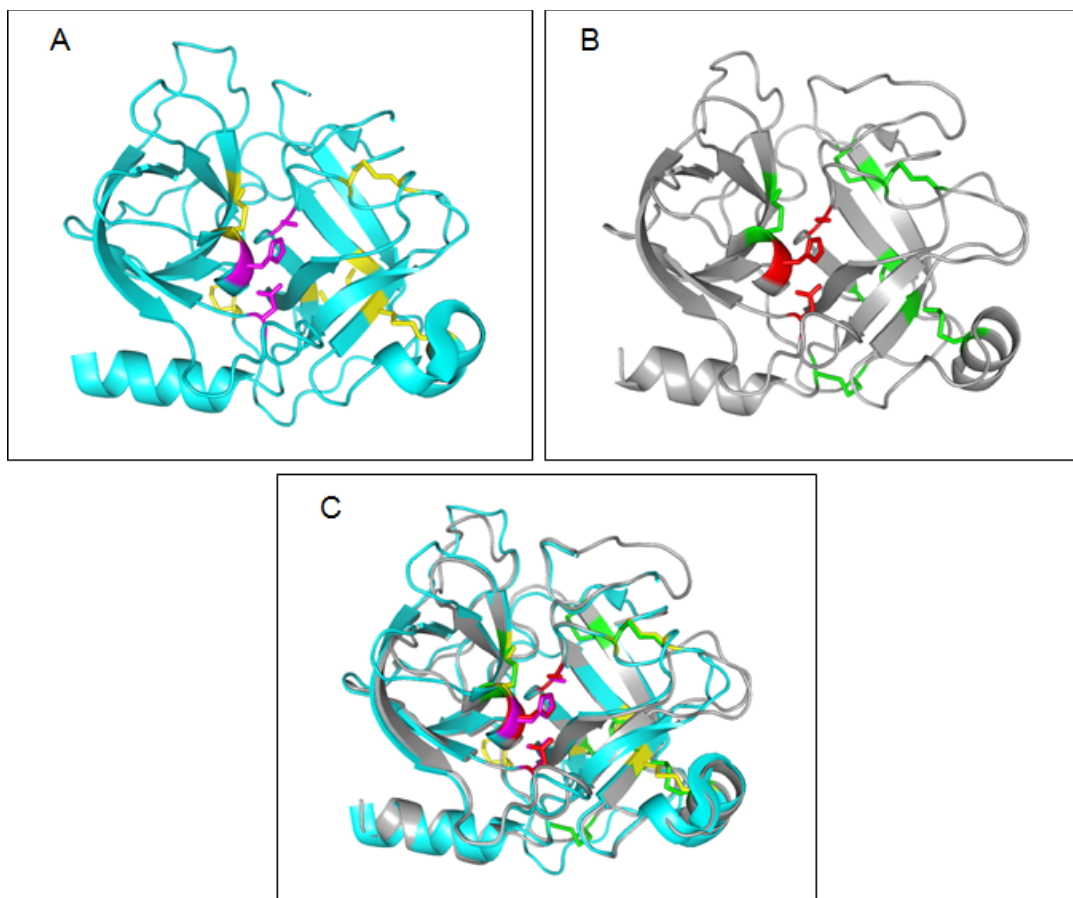
Keresse meg a PDB adatbázisban az 1Y3V és a 1GGD azonosítójú fehérjéket, majd töltsse le a számítógépre a hozzájuk kapcsolódó térszerkezeti fájlokat! Ebben a feladatban a kimotripszin családba tartozó szerin proteázok szerkezeti hasonlóságát fogjuk szemléltetni.

A letöltött fájlokat nyissa meg a PyMol programmal! Mindkét szerkezetet ábrázolja szalag („*cartoon*”) reprezentációval, majd színezza őket különböző színekkel (pl. „*cyan*” és „*gray*”)!

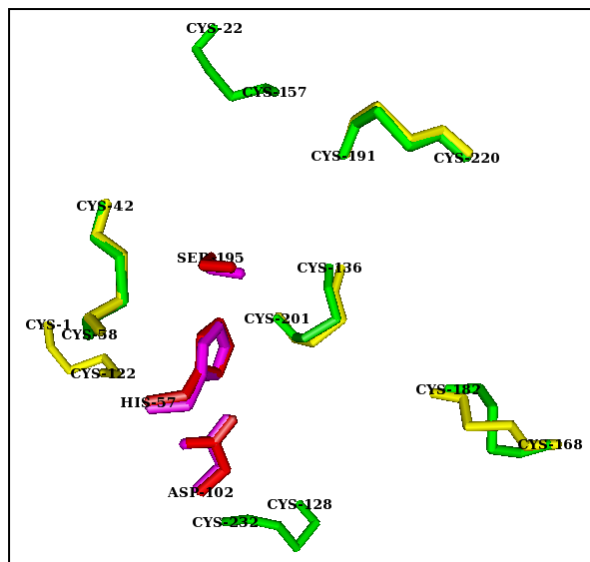
A PDB fájlok alapján keresse meg és ábrázolja pálcika („*sticks*”) modellel a katalitikus triádát alkotó aminosavakat! A fehérjék aminosavsorrendjét láthatóvá tehetjük a „*Display*” menü „*sequence*” parancsával, ezt követően bármelyik aminosavat vagy peptidszekvenciát egyszerűen kijelölhetjük.

Ábrázoljuk szintén pálcika modellel a fehérjékben található diszulfidhidakat („*show disulfides sticks*”). Az őket kialakító cisztein oldalláncokat két szerkezetben egy újabb színű pár („*yellow*” és „*green*”) segítségével különböztessük meg!

Az „*align*” parancs megfelelő használatával végezzük el a két fehérje szerkezetének térbeli illesztését. Mentünk el képként a fehérjék egyedi (A és B), illetve szuperpozicionált (C) szerkezeteit! A „*ray*” parancs alkalmazásával nagy felbontású, publikációs minőségű képeket állíthatunk elő.



A pálcika modellel ábrázolt aminosavakat (katalitikus triád + diszulfidhidak) jelöljük meg az aminosavak azonosítójával („label residues”)! A molekulák többi része ne legyen látható! Mentsük el a képet!



6. Jellemezzük a szarvasmarha tripszin és kimotripszin molekulák szerkezeti azonosságait és eltéréseit: mely elemekre és régiókra jellemzőbb a hasonlóság illetve az eltérés?
7. Hasonlítsuk össze a szarvasmarha tripszin és kimotripszin diszulfidhíd szerkezetét!

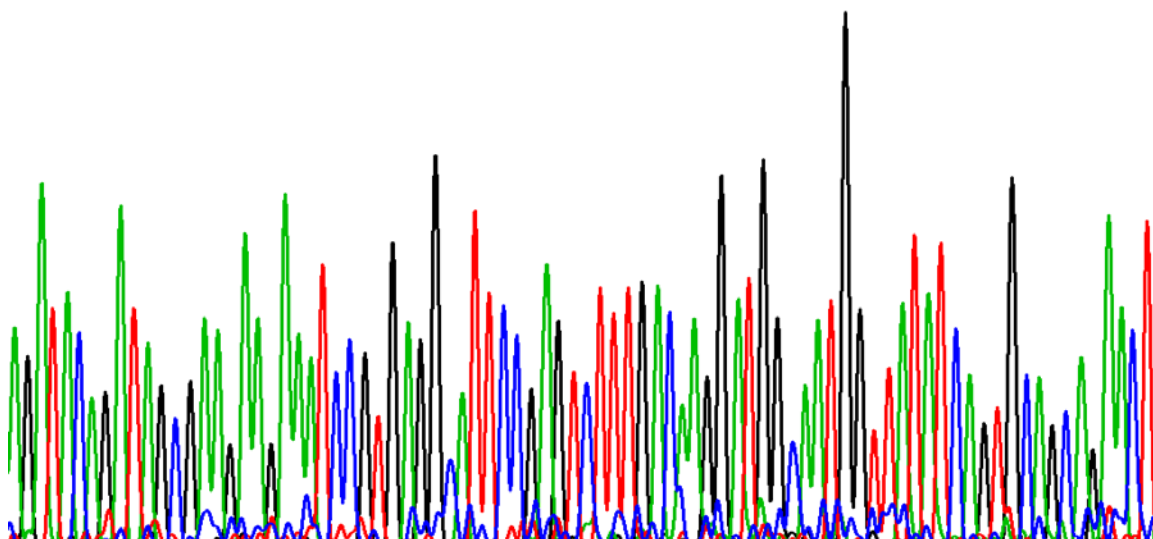


## FÜGGELÉK

### BIOINFO: bioinformatikai feladatok

1. Olvasson le a DNS szekvenálási kromatogramról kb. 40 bázisnyi szekvenciát, és azt használja a gén azonosítására a BLAST keresőprogrammal! Keresse meg a génterméket a UniProt (SwissProt) és a PDB adatbázisban is! Jellemezze röviden a szerkezetet!

130                      140                      150                      160                      170                      180                      190                      200                      210  
AGATACAGCATAGCCGAAAGAGGAATCCGGTGAAGCCATTCCCGAGTCTTTGACAGGATGGCAATGGTTATATTCAGTGCAGCAGAACT



2. Azonosítsa az alábbi cDNS szekvenciából kapott ORF (nyitott leolvasási keret) részlet alapján a gént! Melyik közismert gyógyszer célfehérjéje a géntermék?

CAATTGTCATACGACTTGCAGTGAGCGTCAGGAGCACGTCCAGGAACTCCTCAGC  
AGCGCTGTTACTATCCATGCCAGCACCAGGGCATCTGTGTCCGCTTTCGGCCTTGA  
CCGCTACCAG

3. A következő szekvenciát egy egyiptomi múmiából származó minta PCR amplifikálásával kapták. Honnan származik a DNS? Milyen következtetést tud levonni az adatbázis találatból?

GTCTCAAACGCGGCATCGAAAAGGCCGTGGAGAAGGTCACCGAGACCC  
TGCTCAAGGGCGCCAAGGAGGTTCGAGACCAAGGAGCAGATTGCGGCCA  
CCGCAGCGATTTTCGGCGGGTGACCAGTCCATCGGTGAC

4. A két fehérjeszekvencia-részlet alapján azonosítsa a gént és a génterméket! Milyen doménekből áll a fehérje?

a. LSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAFL

b. EALREAHPIVEKILQYRE

5. Az alábbi fehérje-fragmentumhoz kötve egy ATP-analógot azonosítottak. Azonosítsa a gént és a kódolt fehérjét a BLASTN és BLASTP programokkal! A fehérje milyen régiójából származhat a szekvencia? Milyen a doménszerkezete?

AIVRSLPSVETLGCTSVICSDKTGTLTTNQ

6. Azonosítsa a következő nukleotid szekvenciát a BLAST program segítségével!  
Fordítsa le a szekvenciát a Translate program (<http://web.expasy.org/translate/>) segítségével, majd azonosítsa a fehérjeszekvenciát is a BLAST programmal!

Keresse meg a fehérjét a UniProt adatbázisban!

A ProtParam program (<http://web.expasy.org/protparam/>) segítségével határozza meg a fehérje elméleti izoelektromos pontját és moláris extinkciós koefficiensét!

ATTTACGCAATGCGTATCATTCTGCTGGGCGCTCCGGGCGCAGGTAAAGGTACTC  
AGGCTCAATTCATCATGGAGAAATACGGCATTCCGCAAATCTCTACTGGTGACAT  
GTTGCGCGCCGCTGTAAAAGCAGGTTCTGAGTTAGGTCTGAAAGCAAAGAAATT  
ATGGATGCGGGCAAGTTGGTGACTGATGAGTTAGTTATCGCATTAGTCAAAGAAC  
GTATCACACAGGAAGATTGCCGCGATGGTTTTCTGTTAGACGGGTTCCCGCGTAC  
CATTCCTCAGGCAGATGCCATGAAAGAAGCCGGTATCAAAGTTGATTATGTGCTG  
GAGTTTGATGTTCCAGACGAGCTGATTGTTGAGCGCATTGTCGGCCGTCGGGTAC  
ATGCTGCTTCAGGCCGTGTTTATCACGTTAAATCAACCCACCTAAAGTTGAAGA  
TAAAGATGATGTTACCGGTGAAGAGCTGACTATCCGTAAAGATGATCAGGAAGCG  
ACTGTCCGTAAGCGTCTTATCGAATATCATCAACAACTGCACCATTGGTTTCTT  
ACTATCATAAAGAAGCGGATGCAGGTAATACGCAATATTTTAAACTGGACGGAAC  
CCGTAATGTAGCAGAAGTCAGTGCTGAACTGGCGACTATACTCGGTTAATTCTGG