

# **BIOKÉMIA GYAKORLATI JEGYZET**

**ELTE Biokémiai Tanszék**

**összeállította: Tanszéki munkaközösség**

**többszörösen javított kiadás: 2010**

## 1. gyakorlat

### SPEKTROFOTOMETRIA FEHÉRJEKONCENTRÁCIÓ MÉRÉSE

#### A gyakorlat kivitelezése

*A fotométer használati útmutatója a készüléknél található*

#### 1. Fehérjék mennyiségi meghatározása különböző érzékenyséű módszerekkel

##### 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. Az utolsó két csövet használjuk referenciaoldatként, ezek fényelnyelését vonjuk ki a mért értékekből. Ábrázoljuk az abszorbancia értékeket a fehérjemennyiség függvényében, majd ennek alapján határozzuk meg az ismeretlen oldat fehérjekoncentrációját.

##### 1.b: Lowry (Folin)-módszer

Anyagok:

- Réz tartarát és karbonát tartalmú (CTC) törzsoldat
- 20 % (vol/vol) Folin-Ciocalteu-reagens
- **0.5 mg/ml BSA referenciaoldat**
- ismeretlen fehérjeoldat

**Eljárás:**

1. Számozzunk meg 8 pár kémcsövet, majd mérjük az első öt pár csőbe rendre 100, 200, 400, 600 és 800  $\mu\text{l}$  0.5 mg/ml-es BSA-oldatot. Mérjük 300 és 600  $\mu\text{l}$  ismeretlen koncentrációjú fehérjeoldatot a következő két-két csőbe, az utolsó két csövet pedig hagyjuk üresen referenciaoldat készítéséhez.
2. A térfogatot egészítsük ki minden egyes csőben 2 ml-re desztillált víz hozzáadásával.
3. Készítsünk friss CTC munkaoldatot az alábbiak összekeverésével:
  - 10 ml 0.8 M NaOH
  - 10 ml 10 % SDS
  - 10 ml CTC törzsoldat
  - 10 ml desztillált víz
4. Adjunk 2 ml CTC munkaoldatot minden egyes csőbe, azonnal keverjük össze vortex keverővel, és inkubáljuk 10 percig szobahőmérsékleten.
5. Adjunk a csövekhez 1 ml 20 %-os Folin-Ciocalteu-reagenst azonnali keveréssel.
6. 30 perc színfejlődés után határozzuk meg az abszorbanciát 750 nm-en. Referenciaoldatként használjuk az utolsó két csövet. Készítsünk kalibrációs görbét, és határozzuk meg az ismeretlen fehérjeoldat koncentrációját.

**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: NAD<sup>+</sup> és NADH abszorpciós spektruma**

- 1.minta:      készen kapják  
                 50  $\mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup>  
                 0.1 M foszfát-puffer pH 7.5
- 2.minta:      frissen készítendő 1mg szilárd NADH-ból  
                 50  $\mu\text{M}$  NADH  
                 0.1 M foszfát puffer pH 7.5  
                 a NADH móltömege 709,43g  
                 (számítsuk ki, mennyi 0.1 M foszfát pufferben kell az előre  
                 bemért szilárd NADH-t feloldani)

Hullámhossz tartomány: 400-240 nm

**2.b: tirozin és triptofán elnyelési spektruma**

1. minta: készen kapják  
100  $\mu$ M tirozin  
0.1 M foszfát puffer pH 7.5
2. minta: készen kapják  
100  $\mu$ M triptofán  
0.1 M foszfát puffer pH 7.5
- Hullámhossz tartomány: 320-240 nm

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

- 3 ml minta: törzsoldatokból készítendő (a törzsoldatok koncentrációját ld. lejjebb)  
0.5 mg/ml szarvasmarha-szérumalbumin (BSA)  
0.1 M NaCl  
0.01 M foszfát-puffer pH 7.5
- Hullámhossz tartomány: 320-240 nm

**2.d: DNS elnyelési spektruma**

- 3 ml minta: az alább felsorolt törzsoldatokból készítendő  
25  $\mu$ g/ml DNS  
0.1 M NaCl  
0.01 M foszfát puffer pH 7.5
- Hullámhossz tartomány: 320- 240 nm

- Törzsoldatok: 3M NaCl  
0.1M foszfát puffer, pH 7.5  
5 mg/ml szarvasmarha-szérumalbumin (BSA)  
1 mg/ml DNS

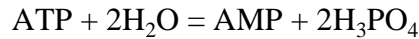
Feladat:

**Értékeljék ki az egyes spektrumokat, és az előadásokon tanultak alapján határozzák meg, hogy az egyes abszorpciós maximumok a molekula melyik részletének tulajdoníthatók.**

## 2. gyakorlat

### APIRÁZ ENZIM PREPARÁLÁSA

A gyakorlat során növényi ATP-áz enzimet (apiráz) preparálunk burgonyából. A preparátum kétféle enzimet tartalmaz: az egyik enzim az ATP-t ADP-re és foszfátra hidrolizálja, a másik enzim ADP-t hasít AMP-re és foszfátra. A reakció összegzett egyenlete a következő:



Az enzimek aktivitását a keletkezett foszfát mennyiségének mérésével határozzuk meg. Az enzim tisztítását kalciumfoszfát gélen történő adszorpció és ammóniumszulfátos kisózás segítségével végezzük el. A fehérjekoncentrációt Bradford módszere alapján határozzuk meg.

#### Anyagok:

- egy burgonya
- 10 %-os  $\text{CaCl}_2$ - oldat
- 1M NaOH-oldat
- finoman elporított  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0.5 mg/ml szarvasmarha szérumalbumin (bovine serum albumin, BSA)
- 0.15 M NaCl-oldat
- Bradford-reagens (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml 95 %-os alkoholban oldva + 100 ml 85 %-os foszforsav, desztillált vízzel 1 l-re kiegészítve. Whatman No. 1 szűrőpapíron szűrjük, 4 °C-on tároljuk)

#### Eszközök:

##### reszelő

- centrifuga
- táramérleg
- jeges vízfürdő
- pH-mérő

### A gyakorlat kivitelezése

#### Az apiráz enzim izolálása

1. A burgonyát mossuk meg, mérjük le a tömegét, és hámozatlanul reszeljük le. Minden 100 grammjához adjunk 35 ml desztillált vizet, majd a szuszpenziót 5 percig kevergessük, hogy az enzim kioldódjon.
2. Töltsük centrifugacsövekbe a szuszpenziót, majd a centrifuga perselyeibe helyezve mérlegel egyensúlyozzuk ki az egymással szembe kerülő (!) adagokat. Ezután centrifugáljuk (4000 RPM, 5 perc).
3. A felülúszót 1 réteg gézlapon keresztül mérőhengerbe öntjük, térfogatát megmérjük.

4. Annyi 10 vegyes %-os (10vegyes %: 100ml oldatban 10 g  $\text{CaCl}_2$ )  $\text{CaCl}_2$ -oldatot adunk hozzá, hogy végkoncentrációja  $\text{CaCl}_2$ -ra nézve 1,0 mg/ml legyen.
5. Az elegy pH-ját 1 M-os NaOH-oldattal 7,0-ra állítjuk. Ezen a pH-n a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok a burgonyában nagy mennyiségben jelenlevő anorganikus foszfáttal kalciumfoszfát **csapadékot** alkotnak, ami adszorbeálja az enzimet.
6. Pár perc állás után centrifugáljuk az elegyet (4000 RPM, 5 perc).
7. *A felülúszót leöntjük (!!!).* A centrifugacsőben maradó csapadékhoz a gézen átszűrt, első felülúszó térfogatához képest (3. pont) egy huszad térfogat 10 %-os  $\text{CaCl}_2$ -oldatot adunk, ami eluálja (leoldja) a fehérjét. Az oldatot kb. 5 perccig kevergetjük.
8. Ismételt centrifugálás után (4000 RPM, 5 perc), a felülúszóban lesz az enzim.
9. A felülúszó térfogatát megmérjük, kis pohárba töltjük és mágneses keverőn való kevertetés közben minden ml-éhez 390 mg szilárd ammóniumszulfátot adunk kis adagokban. Addig kevergetjük, amíg az ammónium-szulfát fel nem oldódik. Az ammóniumszulfát reverzibilis kicsapó szer (kisózás!), mely a fehérjét dehidratálja. Egy adott fehérje csak meghatározott ammóniumszulfát-koncentráció felett csapódik ki. A fenti körülmények között az apiráz még oldatban marad.
10. A kicsapódott idegen fehérjét centrifugálás (4000 RPM, 5 perc) után eldobjuk.
11. A felülúszó minden ml-éhez további 140 mg ammóniumszulfátot adunk a 8. pontban leírt módon. Az enzimet az ekkor kiváló csapadék tartalmazza.
12. Centrifugálás után (4000 RPM, 5 perc) a felülúszót elöntjük, és az összes csapadékot 1 ml desztillált vízben feloldjuk.
13. Az így nyert preparátumot 1db Eppendorf-csőbe tesszük, felcímkézzük (csoport, dátum), és miután fehérjekoncentrációját megmértük (lásd később), mélyhűtőben lefagyasztjuk. A következő alkalommal ezzel a preparátummal fogunk dolgozni.

### Az apiráz enzim koncentrációjának mérése Bradford szerint

*A Bradfordmódszernél csak vadonatúj pipettahegyeket használjunk, mert a mosott hegyeken maradhat némi detergens, ami meghamisítja a mérést!*

A Bradford-módszer lényege: a fehérjék kötik a Coomassie Brilliant Blue festéket. A kötés hatására a festék abszorpciós maximuma megváltozik, 595 nm-re tolódik el. A módszer igen érzékeny, és 1-20  $\mu\text{g}$  fehérje /1 ml teszt esetén az elnyelés nagyjából arányos a fehérjemennyiséggel. A fehérjemennyiség pontos meghatározásához kalibrációs görbét kell készítenünk, melyet ismert mennyiségű (2,5-10  $\mu\text{g}$ ) standard fehérje (általában szérumalbumin) beméréseihez (x-tengely) tartozó abszorbancia értékekből (y-tengely) készítünk. A vizsgált fehérje oldatának koncentrációját úgy határozzuk meg, hogy több különböző bemérési térfogat esetén megmérjük a vizsgált fehérjére kapott elnyelési értékeket, és a kalibrációs görbéről megállapítjuk, hogy az adott bemért térfogatban hány  $\mu\text{g}$  fehérje volt.

- 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 10, 20 és 40 $\mu\text{l}$  apiráz-preparátumot, és 0.15 M-os NaCl-

oldattal egészítsük ki a térfogatukat 100  $\mu$ l-re. Egy-egy Eppendorf-csőbe mérjük be 100  $\mu$ 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)! Erre az adatra a következő gyakorlaton szükségük lesz!

### 3. GYAKORLAT

#### Az apiráz enzim aktivitásának mérése

Az enzimreakció során nő a szervesen foszfát ( $P_i$ ) és az adenzin-monofoszfát (AMP) koncentrációja, illetve csökken a szubsztrát-, az ATP koncentrációja. Az apiráz hőmérsékleti optimuma  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , pH optimuma 6-7 körül van, és a reakciót  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok aktiválják. Az apiráz aktivitását legcélszerűbb a felszabadult anorganikus foszfát koncentrációjának mérésével követni. Az enzimreakciót mindig  $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on végezzük, ATP hozzáadásával indítjuk, és kénsavas molibdát hozzáadásával állítjuk le. Ebben a savas közegben az enzim nem működik, de a megmaradt ATP spontán hidrolízisének megakadályozása céljából a leállított mintákat a kénsavas molibdát hozzáadása és keverés után azonnal jégbe kell állítani.

#### Anyagok:

- 5 mM ATP (neutralizált)
- 0,2 M borát puffer (pH 7.0)
- 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -oldat
- apiráz preparátum
- anorganikus foszfát meghatározáshoz szükséges kénsavas molibdát
- eikonogén

#### Eszközök:

- $30\text{ }^\circ\text{C}$ -os vízfürdő, jeges vízfürdő
- kémcsövek
- pipetták
- fotométer
- stopper

#### A gyakorlat kivitelezése

Az apiráz preparátumot borát pufferrel úgy hígítjuk, hogy a koncentrációja  $0,02\text{ mg/ml}$  legyen. Ilyen, hígított oldatból összesen legalább  $5\text{ ml}$ -nyi kell, hogy rendelkezésünkre álljon az a) és b) pontokban ismertetett mérések elvégzéséhez.

#### a) Az apiráz enzimreakciójának időgörbéje

Ebben a kísérletben az enzimreakció időbeni lefutását vizsgáljuk, a különböző időtartamok alatt keletkezett termék mennyiségének meghatározásával az alábbiak szerint.

1. Megjelölünk 5 pár kémcsövet a különböző reakcióidőknek megfelelően (0, 3, 5, 10 és 15 perces mintapárok) és mindegyikbe bemérünk  $0,75\text{ ml}$  kénsavas molibdátot. A kémcsöveket jégbe állítjuk.



2. Két 50 ml-es műanyag csőbe összemérjük a következő reakcióelegyet a két párhuzamos méréshez:

Hígított enzimpreparátum	1,2 ml
0,2 M borát puffer pH 7,0	6,0 ml
0,01 M CaCl <sub>2</sub>	6,0 ml
desztillált víz	8,4 ml

3. A két edényt már az enzimreakció elindítása előtt 5 perccel 30 °C-os termosztátba állítjuk (temperálás). Elkészítjük a 0 perces mintát: mindkét edényből 3,6 ml-t az előkészített, kénsavas molibdátot tartalmazó kémcsövekbe mérünk. Kémcsőkeverővel összekeverjük, és majd a 15 perces minta leállítását követően utólag tesszük hozzá a csövenként 0,4 ml ATP-t. A 0-perces mintákat visszatesszük a jégbe, hogy az alacsony hőmérsékleten tartással visszaszorítsuk az ATP spontán savas hidrolízisét.
4. A két 50 ml-es műanyag csőben melyek végig a 30 °C-os termosztátban maradnak, ATP hozzáadásával fogjuk elindítani a reakciót, az időt stopperrel mérjük. A párhuzamos reakciókat 30 másodperc különbséggel indítsuk el csövenként 2 ml ATP oldat hozzáadásával.
5. Az indításhoz képest pontosan 3 perc múlva a megfelelő (3-perces) molibdátos kémcsőbe mérünk 4,0 ml reakcióelegyet. Kémcsőkeverővel összekeverjük, és a savas oldattal így leállított mintát visszatesszük a jégbe.
6. Az 5. pontban leírtakat értelemszerűen megismételjük az 5., 10. és 15. percben.
7. A 15-perces minták leállítását követően az összes mintához 0,25 ml eikonogént adunk, összekeverjük, és 10 percre 30 °C-os vízfürdőbe állítjuk, hogy a kék színű komplex kialakulhasson, majd hideg csapvizet vízfürdőben állítjuk a csöveket és lehűtjük.
8. A reakció során sárgás színű foszfo-molibdenát keletkezik, melyet az eikonogén redukál, és kék színű komplex képződik, melyet 775 nm-en fotometrálunk.

$$1 \text{ E} = 1,15 \text{ } \mu\text{mol foszfát/minta}$$

**Feladat: Ábrázoljuk a keletkezett foszfát mennyiségét ( $\mu\text{mol}$ ) a reakcióidő (min) függvényében!**

#### **b) Az enzimreakció függése az enzim koncentrációjától**

Ebben a kísérletben azt vizsgáljuk, hogy hogyan függ az enzimreakció sebessége az enzim koncentrációjától. Azonos szubsztrátkoncentráció mellett különböző enzimkoncentrációkkal dolgozunk. Meghatározott idő után leállítjuk a reakciót, és meghatározzuk a termék (Pi) mennyiségét. A reakció idejét az előző kísérlet alapján választjuk meg: kikeressük azt az időpontot, amelyik az időgörbe lineáris szakaszának kb. a közepén van. Az alábbi táblázat szerint mérjük be az öt pár kémcsőbe az oldatokat:

	Hígított enzim $\mu\text{l}$ (!)	0.2M borát puffer ml	0,01 M $\text{CaCl}_2$ ml	$\text{H}_2\text{O}$ ml
1-2	25	1.0	1.0	1.6
3-4	50	1.0	1.0	1.6
5-6	75	1.0	1.0	1.5
7-8	100	1.0	1.0	1.5
9-10!!	75	1.0	1.0	1.5

1. Az 1-8. sz. csöveket már 5 perccel a mérés előtt  $30\text{ }^\circ\text{C}$ -os vízfürdőbe állítjuk. 30 másodperces időközönként csövenként 0,4 ml ATP hozzáadásával elindítjuk az enzimreakciót. *Vortexel megkeverjük!* Az enzimreakció leállítása az első kísérlet alapján általunk meghatározott idő elteltével ugyanolyan sorrendben, ugyanolyan időközönként, ebben az esetben is 0,75 ml kénsavas molibdátal történik. Keverés után a leállított mintákat jégbe állítjuk.
2. A 9-10-es kémcsövek foszfáttartalma szolgál kontrollként, melybe az ATP hozzáadása előtt tesszük a kénsavas molibdátot.
3. A színreakció előhívása itt is 0,25 ml Eikonogén hozzáadásával történik, 10 perc  $30\text{ }^\circ\text{C}$ -os inkubálás, majd hideg vizes hűtés után a korábbi méréshez hasonlóan fotometráljuk.
4. Minthogy a referenciaoldat foszfáttartalma túlnyomórészt az ATP-oldattól származik, az enzimpreparátum elenyésző foszfáttartalma miatt nem szükséges minden egyes enzimkoncentrációhoz külön referencia oldatot készíteni.
5. A 0 perces kontrollal (9-10. kémcsövek) korrigált értékeket az enzimkoncentráció függvényében ábrázoljuk. Helyes eredmény esetén a keletkező foszfát mennyisége egyenesen arányos az enzimkoncentrációval.

**Feladat:** Az enzimkoncentráció és a térfogat ismeretében számítsuk ki az enzim mennyiségét, majd ezek után számítsuk ki az apiráz enzim specifikus aktivitását  $\mu\text{mol foszfát}/(\text{mg enzim} \times \text{perc})$  egységben!

## 4. GYAKORLAT

### Tripszin aktivitásának mérése mesterséges szubsztráttal

#### A gyakorlat kivitelezése

##### Anyagok

0.1 M benzoil arginin *para*-nitroanilid (BAPNA) dimetilszulfoxidban (DMSO) oldva

5 mg/ml tripszin 1 mM HCl-ban (Ms: 25000)

0.5 mM benzamidin (BA)

10 mM benzamidin (BA)

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,

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 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*-nitroanilinnek 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 inhibitorral és a tripszint, majd 20 perc inkubálás után a szubsztrát hozzáadásával indítjuk a reakciót.

#### A mérés kivitelezése

A mérés megkezdése előtt az eppendorf csövekben előkészített fagyasztott enzim, szubsztrát és gátlószer oldatokat a mérés megkezdése előtt teljesen fel kell olvasztani, és alaposan összekeverni. A tripszint a gyakorlat során végig jégben kell tartani.

A háromféle mérés során először mérjük 2ml megfelelő pH-jú puffert kisméretű kémcsőbe. Közvetlenül a mérés elindítása előtt mérjük ebbe bele a szubsztrátot illetve a gátlószert és keverjük össze vortex készülékkel. A reakciót az

enzim hozzáadásával indítjuk. Azonnali keverés után az oldatot haladéktalanul öntsük át küvettába, és haladéktalanul regisztráljuk az abszorbancia változását. A reakció elindítása utáni gyors mérés azért fontos, hogy a kiindulási koncentrációviszonyoknak megfelelő sebességet, vagyis a kezdeti sebességet mérjük. A görbe meredekségéből határozzuk meg a reakció kezdeti sebességét. A sebességet  $\mu\text{M}/\text{perc}$  mértékegységben kell megadni. A fotométer az eredményt abszorbancia-növekedés/perc dimenzióban adja meg. A kezdeti sebesség meghatározásához a termék moláris extinkciós koefficiensének ismeretében a Lambert-Beer törvény alapján ki kell számolni, hogy ez mekkora koncentrációváltozás/idő értéket jelent.

### 1. feladat: határozza meg a tripszin pH optimumát

Mérje a tripszinaktivitást pH 6-10 tartományban, határozza meg a kezdeti sebességeket. Ábrázolja a kezdeti sebességet a pH függvényében, határozzuk meg az optimális pH-t.

**A szerin-proteázok működésére vonatkozó tanulmányai alapján értelmezze a kapott pH-függést.**

A reakcióelegyek összetétele:

- 2 ml puffer
- 20  $\mu\text{l}$  0.1M-os BAPNA ( közvetlenül a mérés indítása előtt)
- 10  $\mu\text{l}$  tripszin

### 2. feladat: mérje meg a tripszin szubsztráttelítését

Mérje a tripszin aktivitását növekvő szubsztrát végkoncentrációk mellett. A meredekség alapján határozza meg a kezdeti sebességeket. Ábrázolja a kezdeti sebességet ( $V_0$ ) a szubsztrát koncentráció ( $[S]$ ,  $\mu\text{M}$ ) függvényében, és ennek reciprok függvényét ( $1/V_0-1/[S]$ ).

**Határozza meg a maximális sebesség ( $\mu\text{M}/\text{perc}$ ) és a Michaelis konstans ( $\mu\text{M}$ ) értékét.**

Értékelje ki mérését nem-lineáris regresszióval is. Hasonlítsa össze a kapott  $V_{\max}$ ,  $K_M$  és  $V_{\max}/K_M$  értéket! Számolja ki a  $k_{\text{cat}}$  értékét! (Használja a 10. egyenletet. Jelen mérési körülmények között  $k_2=k_{\text{cat}}$ .)

A reakcióelegyek összetétele:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
50 mM Trisz-HCl pH 8.0	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml
0.1M BAPNA	5 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$	12 $\mu\text{l}$	18 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
tripszin	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$

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

Mérje a tripszin aktivitását növekvő koncentrációjú szójabab tripszin inhibitor jelenlétében. **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.**

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 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l	50 $\mu$ l
tripszin	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
	20 perc inkubáció szobahőmérsékleten						
0.1 M BAPNA	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

#### 4. feladat: mérjen tripszin-gátlást szintetikus inhibitorral

Mérje a tripszin aktivitását növekvő koncentrációjú benzamidin inhibitor jelenlétében. Határozza meg a kezdeti sebességeket. Ábrázolja a kezdeti sebességet ( $V_0$ ) az inhibitor koncentráció ( $[I]$ ,  $\mu$ M) függvényében.

**Határozza meg az 50%-os gátláshoz ( $V_0=V_{\max}/2$ ) tartozó inhibitor koncentrációt (nM), és az ehhez tartozó  $[I]/[E]$  arányt.**

A reakció elegyek összetétele:

A tripszin-BA komplex gyorsan kialakul, ezért itt nincs szükség a mérés előtti inkubációra.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
50 mM Trisz-HCl pH 8.0	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
0.1 M BAPNA	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
0.5 mM benzamidin	-	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	-	-	-	-
10 mM benzamidin	-	-	-	-	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l
tripszin	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Hasonlítsa össze a kétféle gátlószer hatékonyságát, és molekul szerkezeti alapon értelmezze az eltérést.**

## 5. GYAKORLAT

### Tejsav-dehidrogenáz izoenzimek elválasztása natív poliakrilamid gélelektroforézissel

#### ANYAGOK

fagyasztott sertés szervdarabkák  
hűtött 0.05M Na-foszfát puffer pH 7.4  
hűtött desztillált víz

#### **A szeparáló gél anyagai ill. receptje:**

végtérfogat	10 ml
30% / 0.3% akrilamid ( <i>mérgező!</i> )	3,3 ml
1.5 M Trisz-HCl pH=8.8	1,25 ml
desztillált víz	5,3 ml
10%-os TEMED	30 µl
10%-os ammónium-peroxi-diszulfát	120 µl

#### **A tankpuffer receptje:**

2,4 g Trisz bázis  
11,6 g glicin  
Kiegészítve 1 literre desztillált vízzel.

(A gyakorlaton 10-szeres töménységű oldatból hígítandó, a szükséges mennyiség a hígított oldatból 1 l)

#### **A mintafelvívő puffer összetétele**

40% glicerin  
0,2 M Trisz-HCl, pH 8,5  
0,1% brómfenolkék

#### **Az enzimaktivitás előhívó oldata:**

0,2 M Trisz-HCl pH 8,0	21,0 ml
0,5 M tejsav (Na-laktát)	4,5 ml
0,01 M NAD	
1,0 mg/ml paranitrotetrazóliumkék	
1,6 mg/ml fenazinmetaszulfát	

A gyakorlaton az utolsó három anyagot szilárd formában, előre kimérve, egyetlen csőbe összemérve kapják meg, ezt kell feloldani a megadott mennyiségű Trisz-HCl pufferben és tejsavban, majd kiegészíteni desztillált vízzel 30 ml-re.

A reakciót leállító oldat: 7%-os ecetsav

#### **A fehérjefestés oldatai:**

Fixáló: 50% metanol, 9% ecetsav

Híg festék oldat: Coomassie-Brilliant G-250 festéktelenítőben oldva

Festéktelenítő: 7% metanol, 9% ecetsav

## ESZKÖZÖK.

kés, mérleg, szövet homogenizáló készülék, pipetták, mérőhenger, jeges vízfürdő, Eppendorf csövek, Eppendorf centrifuga, kémcsövek, az elektroforézis berendezései, Hamilton fecskendő, inkubáló edény a festési reakcióhoz.

### **A gyakorlat kivitelezése**

Az elektroforetikus készüléket a gyakorlatvezető útmutatása alapján szereljük össze. Ezen a gyakorlaton csak szeparáló gélt készítünk.

Az oldatot a készülék összeszerelése után készítjük el.

*Vigyázat! Az akrilamid oldat mérgező!*

Az ammónium-peroxi-diszulfátot csak közvetlenül a készülékbe töltés előtt szabad az oldatba bemérni, hiszen ez indítja el a polimerizációt!

Amíg a gél polimerizál, elkészítjük a szerv-homogenizátumokat. A minták tömegét a következőképpen mérjük meg. A minta számára előkészített edényt a digitális mérlegre helyezük, és a készüléket a tárázó (T) gomb megnyomásával nullázzuk. A szervdarabot az edénybe helyezve ezután a mérleg a szervdarab tömegét mutatja. Ezt az értéket feljegyezzük. A sertésből származó lefagyasztott szívizom, vázizom, máj, vese, tüdő mintákat csipesz és olló segítségével kis darabokra vágjuk. Foszfát pufferrel a vért kétszeri mosással eltávolítjuk. A mintákhoz grammonként 2.0 ml hűtött desztillált vizet mérünk, majd alaposan elhomogenizáljuk. Az egyes minták között, és az utolsó mintát követően a homogenizáló készüléket desztillált vízzel alaposan el kell öblíteni! A mintákból annyit töltünk 1-1 felcímkézett Eppendorf csőbe, hogy a cső tetejét kényelmesen be tudjuk zárni. A mintákat Eppendorf centrifugában 10 percig centrifugáljuk maximális fordulattal. Eközben mintánként egy-egy Eppendorf csőbe 50 µl mintafelvívő puffert mérünk. Az egyes minták felülúszójából átpipetázunk 50-50 µl-t a megfelelő, már mintafelvívő puffert tartalmazó csövekbe. Az így "megkezelt" mintákat jégen tároljuk.

A mintákból 10µl-eket vigyünk fel a géltre egymás mellé, a sorrendet gondosan feljegyezve. Két ilyen sorozatot kell készíteni.

A futtatást jeges hűtés mellett végezzük! Amíg a minta teljesen be nem vándorol a gélbe, a feszültséget 100V-ra (kb. 10 V/cm elektromos térerő), ezután pedig 200V-ra (kb. 20 V/cm elektromos térerő) állítsuk!

Amikor a jelzőfesték elérte a gél alját, a készüléket áramtalanítjuk, szétszedjük, minden alkatrészét gondosan elmosogatjuk, és a gélt a két mintasorozat mentén szétvágjuk. Az egyik feléből a homogenizátumok összes fehérjéjét mutatjuk ki hagyományos fehérjefestési eljárással Coomassie Brilliant Blueval, a másikat pedig az előre összekevert inkubáló oldatba helyezük (lásd "anyagok"), és fénytől védett helyen állni hagyjuk kb. 15 percig. Ezután időnként ellenőrizzük, és ha a csíkok már jól látszanak, a reakciót 7%-os ecetsavas inkubálással állítjuk le.

### **A fehérjék kimutatása Coomassie Brilliant Blue-val**

A futtatás után a gélt 10 percre a fixáló oldatba helyezzük, majd a híg festékoldatra cseréljük. A megfelelő festődéshez legalább fél óra inkubálás kell. Eközben az oldatot billegő-asztalon enyhén kevertjük. Ezt követően a festékoldatot az kiönjük, a gélt pedig a festéktelenítő oldatban inkubáljuk tovább, amíg a háttér kellően ki nem tisztul, illetve míg a háttér teljesen átlátszóvá nem válik. Az eredmény megőrzése érdekében a gél ekkor már fotózható, illetve két celofán hártya között kifeszítve ki is lehet szárítani, és így tárolható.

Feladat:

**Értékeljék ki a kapott elektroforetogramokat! Hasonlítsák össze az összfehérje-festéssel, és az enzimatis elóhívással kapott gélképeket. Jellemezzék az egyes szövetek LDH izoenzimeinek arányát.**



## 6. GYAKORLAT

### Miofibrilláris fehérjék molekulatömegének meghatározása SDS poliakrilamid gél elektroforézissel

#### 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 képes 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

Festékoldat:

0,24% Coomassie Brilliant Blue R 250, 50% metanolban oldva

festéktelenítő: 7% metanol, 9% ecetsav

Kalibráló fehérjék:

Jelölésük:

Rn-áz Ms: 15000	Rn-áz
mioglobin Ms: 16800	Miogl.
szója tripszin inhibitor Ms: 20000	STI
kimotripszinogén Ms: 26000	KTG
szénsav anhidráz Ms: 29000	Széns. anh.
ovalbumin Ms: 45000	Ovalb.
szérum albumin Ms: 66800	BSA

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

*Vigyázat! Az akrilamid oldat mérgező!*

5.0 ml 15 %-os gélhez bemérendő:

Anyag	Térfogat
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 géloldat fölé 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 kihúzva 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 géloldatát.

2 ml 5%-os koncentráció gélhez bemérendő:

Anyag	Térfogat
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 géloldatot óvatosan a szeparáló gél tetejére töltjük, és ismét a helyére tesszük a "fésűt" mellyel a mintafelvívő zsebeket alakítjuk ki. Ügyeljünk arra,

hogy a “fésű” fogai alá ne kerüljenek buborékok. Gyorsan kell dolgozni, mert a koncentráció miatt percek alatt polimerizál.

Amíg a minta gél polimerizál, a már kezelt mintát 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 5 és 10, és 20  $\mu$ l-eket ibráló fehérjékből (kb. 0.5 mg/ml-esek) 10  $\mu$ 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 gélelemez a festékoldatba tesszük. A festést az 5. gyakorlatnál leírtak szerint végezzük el.

#### Feladat:

**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  $\log(M_t)$ -relatív mobilitás koordinátarendszerben. Határozzuk meg a főbb miofibrilláris fehérjék molekulatömegét!**

## 7. GYAKORLAT

### Fehérjeminta sómentesítése gélszűréssel

#### A gyakorlat kivitelezése

Minta: 0,5 M NaCl-ban oldott marha szérum albumin  
Oszlop: BioRad 1cm 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 töltenénk. 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°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 szállításnál 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 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 tölcserűt szorosan az oszlop tetejéhez és öntsünk lehetőleg egyszerre annyi egyenletesen felkevert, tejföl sűrűségű gélsuszpenziót az oszlopba - kihasználva a tölcserű térfogatát 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 gélyában megjelenő, hosszanti irányú repedések jelzik).

4. Amikor az oszlopban a gél a kívánt magasságban leülepedett, távolítsuk el a tölcsezt, és kössük össze az oszlopot a pufferpalackkal a műanyag befolyócső és az oszlopfaj 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 oszlopfaj 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 pipettával rétegezzük óvatosan az üvegfal mellett a sómentes fehérjemintát a gél felszínére, vigyázva arra, hogy a gélfelszínre 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 még egyszer megismételve. A minta felvitelére és a kétszer kb. 1 ml-es bemosására adja az első frakciót.

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 oszlopfaj 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 gyűjtünk 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 puffer palackot, és szedjük szét a kromatográfiás 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 puffer térfogatának függvényében.**

## 8. GYAKORLAT

### Ioncserés kromatográfia

#### AMP, ADP és ATP elválasztása

##### A gyakorlat kivitelezése

A gyakorlat során AMP, ADP és ATP elválasztását végezzük Sephadex A-25 ioncserélőn gradiens elúcióval.

##### Eszközök:

Sephadex A-25-tel töltött oszlop (BioRad Econo column)  
perisztaltikus pumpa (ISCO Tris)  
gradiens keverő edény, keverő motor, U cső, 60 ml-es műanyag fecskendő  
Uvicord II monitor egység  
Radelkis rekorder  
Stopperóra  
mérőhengerek (25 ml, 250 ml)  
3 db Erlenmeyer lombik (250 ml)

##### Anyagok:

Az elúcióhoz használt pufferek: Az **A** puffer az induló puffer, míg a **B** puffer az ún. limit puffer, ez biztosítja az elúcióhoz szükséges sókoncentrációt.

A puffer: 10 mM Trisz-HCl, 1mM EDTA pH 8,0

B puffer: 10 mM Trisz-HCl, 1mM EDTA, 0,4 M NaCl, pH 8,0

1. Kapcsoljuk be az (Uvicord II) UV monitort és a (Radelkis) rekordert
2. Öntsünk induló puffert az induló puffert tartalmazó edénybe (induló puffertartály).
3. Töltsük meg a perisztaltikus pumpát az induló pufferrel, ügyeljünk arra, hogy ne maradjon levegő buborék a pumpában. Csatlakoztassuk az oszlop kimenetét (alját) az Uvicord fotométer átfolyó küvettájának alsó bemenetéhez.
4. Indítsuk el a rekordert: a **papírmozgatás sebessége (paper drive) 0.1 cm/perc**, az **érzékenység (range) 100 mV** legyen.
5. A pumpa nyomóoldalának kivezetését kapcsoljuk össze az oszlop tetejével. Nyissuk ki az oszlop alján lévő csapot, majd indítsuk el a pumpát és mossuk az oszlopot az induló pufferrel. Mérjük meg a folyadék áramlási sebességét (stopper, 10 ml-es mérőhenger). Optimális szétválasztást 2-2.5 ml/perc áramlási sebesség esetén kapunk. Ellenőrizzük az átfolyó puffer abszorpciójának stabilitását. A minta felvitelére akkor kerülhet sor, ha az effluens abszorpciója nem változik.
6. Amíg az oszlop mosása tart, készítsük elő a gradiens keverő edényt. Öntsünk a gradiens keverőedény **jobb oldali (kifolyó nyílással rendelkező) kamrájába 150**

**ml A oldatot, a bal oldali kamrába 150 ml B oldatot.** Csavarozzuk fel a grádiens keverő edény fedelét úgy, hogy a fedélen lévő nagyobb nyílás a jobb oldali kamra felett legyen. A kis nyílásokba helyezzük be az Y-csövet. Az Y-cső rövidebb szárához csatlakoztassuk a műanyag fecskendő. Szívjuk fel a folyadékot az Y-csőbe, majd a rövidebb szárán lévő csövet zárjuk el a csappal. (Vigyázzunk arra, hogy ne maradjon buborék a csőben.) Ettől kezdve a grádiens keverő edény két kamrája közlekedőedényként funkcionál. A grádiens keverő edény jobb oldali kamrájába merítsük bele a grádiens keverő motor propellerét a lehető legközelebb a kifolyó nyíláshoz, és indítsuk el a motort (220 V!)

7. A minta felvitele előtt állítsuk meg a pumpát és a rekordert. Zárjuk el az induló puffer tartály csapját és az oszlop alján lévő csapot, majd vegyük ki az oszlop sárga tetejét. Az Eppendorf csőben lévő minta teljes térfogatát (1 ml) öntsük rá az oszlopra. Zárjuk vissza az oszlopot.

8. Az induló puffer tartály csapjának aljáról a csövet szedjük le és szereljük át a grádiens edény kifolyónyílásának aljára. A grádiens elúciót a grádiens edény és az oszlop alján lévő csap kinyitása után a pumpa elindításával kezdjük el. A rekorder papírján jelöljük meg az indítás pillanatát. Mérjük az átfolyó oldat térfogatát úgy, hogy az Uvicord átfolyó küvettájából távozó folyadékot egy 250 ml-es mérőhengerben gyűjtjük. Figyeljünk arra, hogy a grádiens edény két oldala közti összeköttetés a kísérlet végéig ne szakadjon meg, és arra, hogy az oszlop tetején mindig legyen folyadék. Az elúciót addig folytatjuk, míg mind a három összetevőt jelző csúcsok a rekorderen megjelennek, majd még kb. 1 cm hosszan az alapvonal kialakul. Ekkor állítsuk meg a rekordert, olvassuk le a mérőhengeren az átfolyt minta térfogatát és mérjük meg vonalzóval az oszloptöltet magasságát.

9. A kísérlet végén mossuk át az egész rendszert A pufferrel, kapcsoljuk ki a perisztaltikus pumpát, a grádiens keverő motort, az UV monitort és a rekordert. A tollat vegyük ki és tegyük rá a kupakot. Mossuk el a grádiens keverő edényt desztillált vízzel.

#### **Feladat:**

**Számítsuk ki az oszlop teljes geometriai térfogatát. A  $V_0$  térfogat ennek 40%-a. Az oszlop átmérője 10 mm.**

**A rekorder által felvett kromatogramra szerkesszük meg a sókoncentráció változását mutató egyenest. Állapítsuk meg az egyes komponensek elúciójához szükséges sókoncentrációt és az egyes komponensek elúciós térfogatát.**

**A megadott képletek alapján számítsuk ki az egyes csúcsok retenciós faktorát, valamint a felbontást és a szelektivitást az AMP-ADP, az ADP-ATP és az AMP-ATP párokra.**

## 9. GYAKORLAT

### Plazmid DNS izolálása és agaróz gélelektroforézise

#### 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, az  $\alpha$ -komplementációs analízist lehetővé tevő, a filamentes fágok által fertőzhető sejt.

##### A baktériumtenyészet növesztése

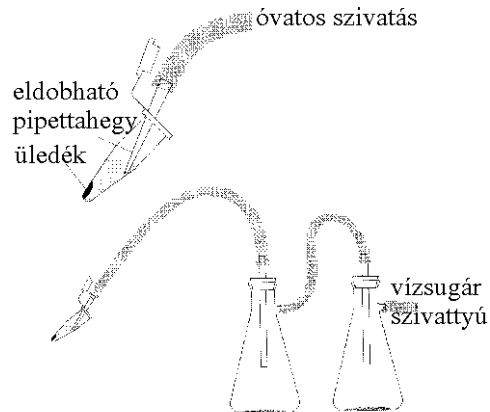
1. Steril fogpiszkáló segítségével oltunk át egy plazmiddal transzformált baktériumtelepet 15 ml-es steril műanyag kémcsőben lévő 3 ml LB/amp tápoldatba. (Az oldatok összetétele a gyakorlati leírás végén található.) Egyértelműen és jól olvashatóan jelöljük meg a csöveket. Rázassuk a kultúrákat 37°C-on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

##### A sejtek összegyűjtése

2. 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 helyezzük 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 szennyezőanyagot tartalmazó tápoldat, mint felülúszó, eltávolítható.

3. Vízszugárszivattyúhoz csatlakoztatott sárga pipettaheggyel lassan távolítsuk el a felülúszót (2. ábra). Ügyeljünk arra, hogy a pipetta hegy ne érjen a baktériumpellethez.





2. ábra

4. Öntsük a kultúra maradékát a megfelelő centrifugacsőbe, és ismételten 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 miniatűr kromatográfiás oszlopon történik. Először a klasszikus módszert ismertetjük, majd rátérünk a kittel történő izolálás bemutatására.

### A) Plazmidizolálás klasszikus módszerrel

#### A sejtek alkalikus lízise

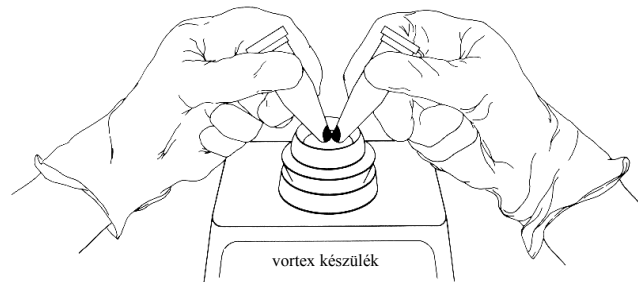
Az alábbiakban ismertetett eljárás Birnboim és Doty (1979) valamint Ish-Horowitz és Burke (1981) módszerének módosított változata.

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 3. 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 sejtfall lebontása céljából, tapasztalataink azt mutatják, hogy ez nem szükséges.



3. 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 jégben. 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 járunk el. Adjunk 450  $\mu$ l 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 turbid 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  $\mu$ l TE-oldatban (pH 8.0). A TE-oldat DNázismentes RNázis 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 3. ábra), vagy ha ez nem lenne elegendő akkor fel-le pipettázva, alaposan szuszpendáljuk fel a sejteket. Ügyeljünk rá, hogy ne maradjanak sejtcsoportok 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  $Mg^{2+}$ -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 genomiális DNS-t összetöredelk és ezáltal a plazmid DNS preparátum kisméretű DNS-ekkel szennyeződik! Az MX2 oldat lúgos kémhatású Na-dodecilszulfát, ami tönkreteszi 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 pipettázzuk 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% etanolt 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 fent említett enzimatis reakciókat.

12. Helyezzük az oszlopot egy tiszta Eppendorf-csőbe, és a membrán közepére pipetázunk 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.

### **Plazmid izolálás BIO BASIC kittel**

1. A sejtszuszpenzióknak kb. a felét feliratozott Eppendorf csőbe töltjük. 14000 fordulat/perc sebességgel 1 percig centrifugáljuk. A felülúszót eltávolítjuk, majd a szuszpenzió második felét is ráöntjük, és azt is ugyanúgy lefugáljuk.
2. A sejteket tartalmazó csapadékhoz 100 mikroliter Solution I oldatot teszünk és pipettaheggyel felszuszpendáljuk a sejteket.
3. 200 mikroliter Solution II oldatot mérünk hozzá és kézzel rázogatójuk, míg fel nem tisztul. Szobahőn állni hagyjuk 1 percig.
4. 350 mikroliter Solution III oldatot mérünk hozzá, majd kézzel kopogtatva összekeverjük. Nagy fehér csapadék keletkezik 1 percig szobahőn állni hagyjuk. Centrifugálás :5perc, 12000 ford./perc.
5. A felülúszót az oszlopba pipetázzuk. Centrifugálás 2 perc, 10000 ford/perc.
6. 750 mikroliter Wash Solution oldatot pipetázunk az oszlopra. Centrifugálás 2 perc, 10000 ford/perc. A 6. lépést megismételjük.
7. Az oszlopot üresen centrifugáljuk 1 perc, 10000 ford/perc.
8. Az oszlopot tiszta Eppendorf csőbe állítjuk, 50 mikroliter ElutionBuffer (elúciós puffer) oldatot pipetázunk rá. Centrifugálás 3 perc, 14000 ford/perc.
9. 1%-os agaróz gélen megfuttatjuk. minta kezelés: 3 mikroliter DNS+ 2 mikroliter STOP. A pozitív pólus felé fut.

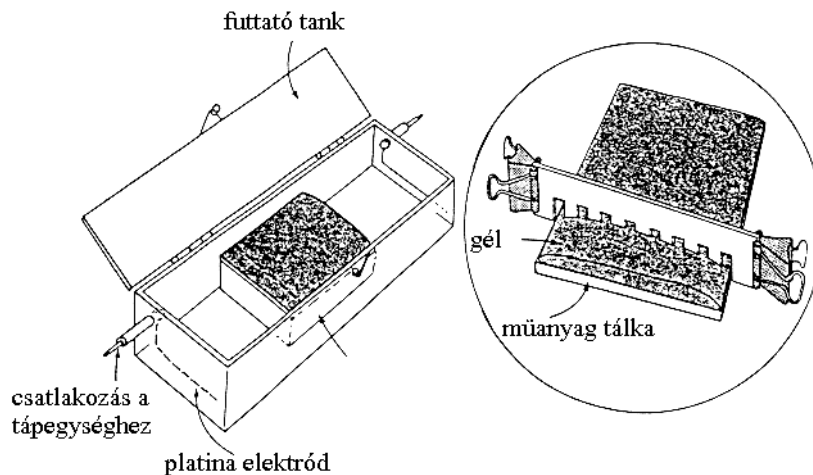
### **A plazmid preparátum vizsgálata agaróz gélelektroforézissel**

#### **A futtatógél elkészítése**

Mikrohullámú sütőben forrásig melegítsünk fel 25 ml 1%-os agaróz gélt. Ügyeljünk arra, hogy ne hevüljön túl, mert ilyenkor könnyen kihabzik! Miután a

gél annyira lehült, 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. Mindkét festékre igaz, hogy DNS-sel alkotott komplexük UV fényvel megvilágítva narancsszínű fényt kibocsájtva fluoreszkál, ez a DNS gélben való kimutatásának az alapja.

Az elektroforézis készülék géltartó tálkáját helyezük 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 gélt helyezük az elektroforézis tankba, és töltjük fel a tankot  $1\times$  TAE pufferrel úgy, hogy a gélt ellepje.

A plazmid mintákat kezeljük mintafelvívő pufferrel: mérjük mintánként 1  $\mu$ l mintafelvívő puffert egy-egy Eppendorf csőbe, és ezt néhány fel-le pipetázással keverjük össze 3  $\mu$ l plazmid preparátummal. Az így kezelt mintákat óvatosan rétegezzük a zsebekbe a folyadék felszíne alá. 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 vigyünk a fotószobába, és UV transzilluminátorra helyezve fényképezzük le.

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

**Feladat: Értékelje ki a kapott elektroforetogramot 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-ázt 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 kitűnően 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

## 10. GYAKORLAT

### Bioinformatika és *in silico* biokémia

#### 1. feladat: *In silico* fehérjetisztítás

Indítsa el a Prot\_Pur könyvtárban fellelhető **Proteins** nevű programot. Válasszon a 20-féle mintából (szimulált sejt- ill. szövetkivonatok). A cél, hogy a rendelkezésre álló módszerekkel homogén enzimpreparátumot állítson elő, a lehető leggazdaságosabban (munkaóra/unit enzim). Néhány előzetes információt fog kapni az enzimről (hőstabilitás, pH stabilitás). A következő tisztítási módszerek közül választhat:

1. kisózás ammónium-szulfáttal
2. gélszűrés kromatográfia
3. ioncsere-kromatográfia (kationcserélő vagy anioncserélő)
4. kromatofókuszálás (az izoelektromos fókuszálással analóg kromatográfiás módszer)
5. hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia

Minden szeparálás után a frakciók fehérjekoncentrációját és enzimaktivitását a program analizálja, míg a frakciók fehérjeösszetételét gélelektroforézissel ellenőrizheti. Jegyezze fel az alkalmazott tisztítási lépéseket, s mindegyik után a következő, a program által számolt paramétereket:

- teljes fehérjemennyiség
- teljes enzimmennyiség
- a tisztulás mértéke
- kitermelés
- költség (munkaóra/unit enzim)

Akkor sikeres a tisztítás, ha gélelektroforézissel homogén preparátumot kap. Csináljon végig több tisztítási sémát is, több kiindulási mintával, s a legjobbnak tartott eredményeket írja le a jegyzőkönyvébe. A jegyzőkönyvben szerepeljen az összes módszer, az alkalmazott paraméterekkel és a módszerrel elért tisztulás.

#### 2. feladat: Ismeretlen nukleinsavszekvencia azonosítása és analízise

A BIOINFO nevű fájlban, amely a gyakorlaton használt számítógépen az „asztalon” érhető el (valamit a jegyzet Függelékben), nukleinsav- és fehérjeszekvenciákat talál. Feladata, hogy a **BLAST** hasonlóságkereső program segítségével azonosítsa a kettő szekvenciát és röviden jellemezze a gént illetve a génterméket (az interneten elérhető adatbázisok segítségével). Válaszoljon a feltett kérdésekre is.

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 proteinszekvenciánk van, akkor a **BLASTP** alprogrammal fehérjeadatbázisokban kereshetünk. A **BLASTX** alprogram a kereső nukleinsavszekvenciát mind a hat leolvasási keretben lefordítja és ezzel keres a fehérjeadatbázisban. A **TBLAST** alprogramok segítségével lefordított nukleinsavadatbázisokban kereshetünk fehérje- (TBLASTN) vagy lefordított nukleinsavszekvenciákkal (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. 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/>

Feladata, hogy BLAST-tal azonosítsa az ismeretlen szekvenciá(ka)t a **GenBank** adatbázisban. Írja fel a szekvenciafájl azonosítóját és a gén nevét. Milyen fajból származik és mekkora a kódolt fehérje? A **UniProt** adatbázisban is keresse meg a fehérjét, adja meg ezt az azonosító kódot is, végül készítsen egy rövid „személyleírást” róla. Az utóbbihoz szükséges információ bármely adatbázisból, de a PubMed-en elérhető eredeti tudományos publikációkból is származhat. A feladat „adatgyűjtő” részét nem feltétlenül a gyakorlaton kell elvégezni, otthoni munka is lehet!

### 3. feladat: Fehérjeék térszerkezetének molekuláris grafikai ábrázolása

#### A RasMol program használatáról röviden.

A RasMol egy ingyenes „stand alone” molekuláris grafikai program. Segítségével egy atomi koordinátákat tartalmazó térszerkezeti fájl tartalma vizualizálható („rendering”). Két ablakból áll. Az egyikben a modellezett fehérjeszerkezet jelenik meg, a másik az ún. parancsablak. A beolvasandó fájlnak

megfelelő, pl. pdb formátumban kell lennie, amit a PDB adatbázisból tölthetünk le. Az először megjelenő ábrázolás a makromolekula szerkezetét „drót” modellként mutatja. Áttekinthetőbb a szerkezet, ha a „display” menüből a „backbone” ábrázolást választjuk. Választható még a térkitöltő („spacefill”), pálcika („stick”), golyópálcika („ball & stick”) vagy a szalagmodell („ribbon”, „cartoon”) is. A modellt színezhetsz a standard CPK atomszínekkel, az egyes láncokat külön színnel („chain”), az aminosavak tulajdonságuk alapján („shapely”), a kristályon belüli mozgékonyosságuk alapján („temperature”) stb. A molekulát különböző síkokban el lehet vágni („slab” mód), sztereóban ábrázolni, a kristályban egyébként nem látható H-atomokat ábrázolni.

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 megtudhatjuk.

A menüben található és a párbeszédablakban kiadható parancsok mindig az utoljára szelektált molekularészre vonatkoznak. Színezni a „color” paranccsal és az utána írt színnel (pl. „red”, „green”, „magenta” stb.) lehet. A háttérrel a „background color” paranccsal lehet átszínezni.

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

A megváltoztatott modellt a „write script” paranccsal és egy fájlnev megadásával egy ún. script-fájlban el lehet menteni. Ez utóbbi a parancsablakba beírt „script” és fájlnev paranccsal olvastatható 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, energiaminimalizálás, 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)

### Feladat:

Keresse meg a Uniprot adatbázisban a P62158-as kódú fehérjét

1. Mi a fehérje neve?
2. Milyen fajból származik?
3. Milyen funkcióval bír?

Keresse meg a térszerkezeti adatbázisra (PDB) mutató kereszthivatkozásokat. Válasszon ki egy térszerkezeti modellt, amit röntgen krisztallográfiás módszerrel határoztak meg, és felbontása jobb, mint 1,7 Å, és más fehérjét/peptidet nem tartalmaz! Keresse meg a <http://rcsb.org> oldalon. Az ott talált információk alapján válaszoljon a kérdésekre!

4. Mi a szerkezeti modell azonosítója?
5. Milyen heterocsoportot/csoportokat tartalmaz a molekula?

A fehérjék mozgékony részei, többnyire a terminális közeli aminosavak, gyakran hiányoznak a 3D-s szerkezetből, mert nem keletkezik róluk megfelelő szóráskép. Nézze át a pdb file-t! (notepad programmal megnyitható)

6. Hiányoznak-e oldalláncok, atomok a szerkezetből? (missing residues, missing atoms)
7. Melyek ezek?
8. Hány darab vízmolekula található a szerkezetben?

Töltse le a számítógépre a térszerkezeti file-t. 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 oldalán az első „EF-hand” motívumot. Ezt a régiót ábrázolja szalag („cartoon”) reprezentációval, míg a molekula többi része ne legyen látható. Színezza a másodlagos szerkezetnek megfelelően. Az első „EF-hand” által kötött  $\text{Ca}^{2+}$ -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)

9. 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.

