

# **BIOKÉMIA GYAKORLATI JEGYZET**

**ELTE Biokémiai Tanszék**

**összeállította: Tanszéki munkaközösség**

**többszörösen javított kiadás: 2010**

## 1. gyakorlat

### SPEKTROFOTOMETRIA FEHÉRJEKONCENTRÁCIÓ MÉRÉSE

#### 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 színekép valamelyik pontján abszorpciós maximuma legyen. Ha az abszorpciós maximum a spektrum látható 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 tartományú analízisek is széles körben elterjedtek, mivel sok színtelen anyagnak van ezen a területen (190-320 nm) 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  $\epsilon$  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 transzmisszó (transzmittancia) értékét mérték:

$$T = I/I_0 \text{ vagy } T \% = I/I_0 \times 100$$

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 kivetttában 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 kivetttát 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 kivetttán mérnek egyszerre. Az egyikben a mintát tartalmazó oldat van, a másikban (referencia) pedig olyan oldat van, amely a mintát 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, tehát látszólag elnyelődik.
- 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 küvetta legyen karcolásmentes és tiszta. A küvetta 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. A legfontosabb szempontok 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 nitrogénje és 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.

### **Lowry (Folin)-módszer**

Érzékeny eljárás. A színes termék kialakulása hasonlóan történik, mint a biuret reakciónál, de egy második reagenst (Folin-Ciocalteu) is alkalmaznak a szín erősítése érdekében. A keletkező erős kék színt itt két reakció okozza: (1) a peptid kötés nitrogénjének koordinációja rézionnal, és (2) a (fenollal reagáló) Folin-Ciocalteu-reagens (foszfomolibdát-foszfowolframát) tirozin általi redukciója. A mérés 750 nm-en történik.

A biuret-módszernél leírtakhoz hasonlóan itt is kalibrációs görbét készítünk például BSA-val, és az ismeretlen fehérje koncentrációját a görbéről olvassuk le.

Előnye: ez a módszer nagyon érzékeny, akár 1 µg fehérjét is képes kimutatni. Hátránya: kivitelezéséhez meglehetősen hosszú időre van szükség, számos anyag (pl. ammóniumszulfát, glicin, és merkaptánok) zavarja, és az inkubálási idő is kritikus. Mivel a különböző fehérjéknek más a tirozintartalma, a színeképződés a különböző fehérjéknél eltérő. Ennek megfelelően a módszer azonos fehérjét tartalmazó oldatok koncentrációjának összevetésére inkább alkalmas, mint abszolút meghatározásra.

### **Bradford-módszer**

Vizonylag új, mégis 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. Vizonylag kevés olyan anyag van, ami zavarja a mérést (urea és guanidin-hidroklorid jelenlétében is lehet mérni vele), de sajnos a detergensnek ilyenek. Nyomnyi mennyiségű mosogatószer is meghamisíthatja a kapott eredményt. Hátránya: a módszer meglehetősen aminosavösszetétel-függő és megfesti a küvetákat is. A 2. gyakorlaton ezzel a módszerrel történik az apiráz enzim mennyiségének meghatározása.

### **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. peptidok 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, és 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:  $c_{\text{prot}}(\text{mg/ml}) = 1,55 \times E_{280\text{nm}} - 0,76 \times E_{260\text{nm}}$ . Megjegyzendő, hogy a fehérjék ill. a peptidok 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. 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  $\mu$ l 0.5 mg/ml-es BSA-oldatot. Mérjük 300 és 600  $\mu$ 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  $\mu$ M NAD<sup>+</sup>  
0.1 M foszfát-puffer pH 7.5
- 2.minta: frissen készítendő 1mg szilárd NADH-ból  
50  $\mu$ 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: 240-400nm

### 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: 240-320nm

### 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: 240-320nm

### 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: 240-320nm

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.



## Bevezetés a 2. és 3. gyakorlathoz

### Fehérje/enzim szeparálási módszerek és az enzimaktivitás mérése

A gyakorlaton az apiráz enzim preparálásán keresztül ismerkedünk meg néhány fehérjeizolálási eljárással. Az alábbiakban rövid áttekintés formájában olyan általános tudnivalókat foglaltunk össze, melyek hasznosak lehetnek a legkülönbözőbb preparálási folyamatok megértéséhez. Az alább ismertetésre kerülő módszerek egyenként vagy kombinálva minden fehérjetisztítási művelet során előfordulnak. A bevezetőben szó esik a leggyakrabban felmerülő problémákról is.

#### Az izolálni kívánt fehérje mennyiségének specifikus meghatározása

Minden fehérjeizolálás során alapvető fontosságú, hogy rendelkezünk egy olyan módszerrel, mely alkalmas az izolálni kívánt fehérje valamely tulajdonságának kvantitatív meghatározására. E tulajdonság lehet:

1. Specifikus biológiai aktivitás, enzimek esetén enzimaktivitás, receptorfehérjék esetén megfelelő molekula megkötése stb.
2. Gélelektroforetikus mobilitás. Amennyiben ez ismert, jól használható az egyes izolálási lépések során a fehérje tisztításának ellenőrzésére.
3. Spektrum azoknál a fehérjéknél, amelyekben specifikus kromofór kapcsolódik a fehérjéhez. (A különböző fehérjék ultraibolya-spektruma általában nagyon hasonló, ezért ez önmagában nem ad elegendő felvilágosítást a tisztítási folyamat során.)

#### Az összfehérje-mennyiség meghatározása

Egy izolálási lépés annál hatékonyabb, minél nagyobb mértékben emelkedik hatására a specifikus fehérjemennyiség és az összfehérje-mennyiség hányadosa. Az összfehérje-mennyiség meghatározására az 1. Gyakorlatban leírt kvantitatív színreakciók alkalmasak.

#### Az enzimek stabilitása

A legtöbb enzim könnyen denaturálódik a tisztítási folyamat során, ezért minden esetben a maximális elővigyázatossággal kell az enzim preparálását végezni. Bizonyos enzimek viszonylag stabilak kevésbé tisztított állapotban, de labilitásuk a tisztulás mértékével együtt fokozódik.

1. A hőmérséklet hatása  
Mivel a legtöbb enzim sokkal stabilabb alacsony hőmérsékleten, mint szobahőmérsékleten, az enzimpreparálásokat általában 0 és +4 °C között végzik. Ismeretesek azonban hidegérzékeny fehérjék is, melyeket aktív állapotban csak szobahőmérsékleten lehet izolálni. Ezek több aleggységből felépülő, többnyire allosztérikus enzimek.
2. A pH hatása  
Minden enzim jellemezhető egy optimális pH-tartománnyal, ahol a stabilitásuk is a legnagyobb. A pH állandóan tartását pufferek hozzáadásával biztosítjuk. A

biokémiában használt pufferek általában nem károsítják az enzimeket. A puffer kiválasztásánál azonban egyéb szempontokat is figyelembe kell venni pl.: a Trisz puffer zavarja a Biuret-módszerrel történő fehérjekoncentráció meghatározását, foszfát-pufferben nem végezhető el az ATP-áz aktivitás meghatározása az anorganikus foszfát mérésével.

3. A szulfhidril-csoportok oxidációja  
Sok enzim tartalmaz szabad szulfhidril-csoportokat (cisztein-oldallánc), melyek szükségesek lehetnek a biológiai aktivitáshoz. A sejt redukáló környezetéből kikerülve az izolálás során a szulfhidril-csoportok a levegő oxigénjének hatására diszulfiddá oxidálódhatnak. E folyamatok megelőzése érdekében ilyen esetekben az izolálást redukáló szerek (2-merkaptóetanol, ditiotreitól) jelenlétében végzik.
4. Nehézfémek által okozott denaturáció  
Néhány enzim rendkívül érzékeny nyomnyi mennyiségű nehézfém (Pb, Hg) jelenlétére is. Általában jó minőségű vegyszerek és ionmentesített desztillált víz használatával ezek mennyisége a minimumra csökkenthető, de nagyon érzékeny enzimek esetében kelátorok (EDTA) használata lehet szükséges.

### **Durva fehérjefrakcionálási módszerek**

A fehérjeizolálási folyamatok első lépése a sejtek feltárása. Amennyiben az izolálni kívánt fehérje oldható, megfelelő pH-jú és ionerejű "kivonó" oldattal extrahálható a sejtekből. Az oldhatatlan maradék eltávolítása után kapott nyers extraktumot az alább ismertetett módszerek valamelyikével tisztítjuk tovább. Sokkal nagyobb probléma a membránhoz kötött enzimek és fehérjék izolálása. Ezek gyakran elvesztik biológiai aktivitásukat a membrán szolubilizálására alkalmazott módszerek hatására. Ilyen esetekben gyakran meg kell elégednünk csak részlegesen tisztított ún. membránfrakciók előállításával.

Az alábbiakban összefoglalt durva frakcionálási módszerek egyszerűen alkalmazhatók nagy térfogatú nyers extraktum feldolgozására is. Ezek során a szennyező fehérjék nagy része eltávolítható, de csupán ezek alkalmazásával általában nem kapunk homogén fehérjeparátumot.

1. Kisózás  
A legrégebbi, de még ma is általánosan használt fehérjefrakcionálási módszer a kisózás. A módszer alapja a következő. Az oldott fehérjemolekulákat jelentős hidrátburok veszi körül. Az azonos felületi töltés következtében a hidratált molekulák taszítják egymást. Ez a taszító erő megakadályozza a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulását, az aggregációt és kicsapódást. Amikor a fehérjeoldathoz sót adunk, a vízmolekulák egy része az ionok hidrát burkának (pl.  $\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_5^+$ ) kialakításában vesz részt, ezért a fehérjék hidrátburka elvékonyodik. Ugyanakkor a bevitt ionok egy része semlegesíti a fehérjék felületi töltéseit. E két hatás együttesen azt eredményezi, hogy csökken a fehérjemolekulák közötti taszítóerő, ami egy adott sókoncentráció-tartományban a fehérje kicsapódásához vezet. Így, minthogy a különböző fehérjék különböző sókoncentrációnál csapódnak ki, bizonyos fokú szeparálás érhető el.

Fehérje frakcionálásra leggyakrabban használt só az ammónium-szulfát. E célra jó oldékonysága teszi alkalmassá. Minthogy azonban az ammónium-szulfát

vizes oldatban savasan hidrolizál, azokban az esetekben, amikor szilárd formában adjuk az oldathoz, megfelelő kapacitású puffer alkalmazásával kell biztosítanunk a pH állandóságát. Amennyiben telített oldat formájában használjuk az ammónium-szulfátot, az oldatot felhasználás előtt ammóniumhidroxiddal lehet semlegesíteni.

2. Frakcionálás szerves oldószerek segítségével  
A fehérjék szelektív kicsapása elvégezhető vízzel elegyedő szerves oldószerek (aceton, etilalkohol) segítségével is. Ezekben az esetekben a víz fagyáspontja alatti hőmérsékleten ( $-20^{\circ}\text{C}$ -ig) is végezhető a frakcionálás, ami a fehérjék stabilitását kedvezően befolyásolja.
3. Adszorpciós technikák  
Számos fehérje és enzim szelektíven kötődik bizonyos adszorbensekhez (pl. szilikagél, bentonit, alumíniumhidroxid, hidroxipatit) és ezáltal ezek a fehérjék jó hatásokkal tisztíthatók. Egyes esetekben az adszorbenst *in situ* állíthatjuk elő a preparálási folyamat során, mint például az apiráz enzim preparálásánál (2. gyakorlat). A pH vagy az ionerő megváltoztatásával az adszorbeált enzimek leoldhatók az adszorbensről.
4. A szelektív denaturáció módszere  
Néhány rendkívül stabil fehérje izolálásakor úgy járnak el, hogy a nyers extraktumot olyan hatásoknak vetik alá, melyek a szennyező fehérjék nagy többségét irreverzibilisen kicsapják. Hőstabil fehérjék esetében a magas hőmérsékleten történő kezelés vezet eredményhez. Egyes fehérjék, mint pl. a citokróm-c, oldódnak triklór-ecetsav oldatban is, mely a legtöbb fehérjét kicsapja.

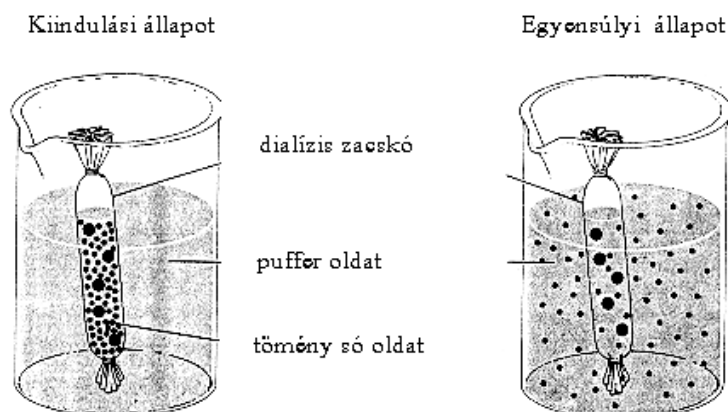
### **Oszlopkromatográfiai technikák**

A szennyező fehérjék többségétől megtisztított, de még nem kellően homogén preparátumot általában valamilyen oszlopkromatográfiai módszer segítségével tisztítjuk tovább. Ezekről a jegyzet más fejezeteiben részletes ismertetés található, ezért itt csak vázlatos felsorolásra szorítkozunk.

1. Ioncserés kromatográfia  
Fehérjék szeparálására térhálósított dextranszilikagél alapú (Sephadex) vagy szintetikus polimer (MonoBead, TSK) ioncserélő tölteteket használunk. Anioncserélők esetében a hordozóhoz kapcsolt ionos csoport rendszerint dietil-aminoetil (DEAE származékok), vagy kvaterner aminoetil-csoport (QAE származékok). Ez utóbbi erősebben bázikus. Kationcserés kromatográfiára karboximetil (CM), foszfoetil- (PE), illetve szulfopropil- (SP) csoportokat tartalmazó ioncserélőket használnak. A polisztirol alapú ioncserélőket (Dowex, Amberlite), minthogy a fehérjék számára effektív felületük a gél szemcsék kis pórusmérete miatt csekély, csak kisebb molekulású peptidok szeparálására használjuk.
2. Gélszűrés  
A molekulák méret és alak szerinti szeparálásra alkalmas módszer. A leggyakrabban használt oszloptöltetnek alapanyaga vagy térhálósított dextranszilikagél (Sephadex), vagy szintetikus hidrofil vinil gél (Fractogel TSK), illetve porózus üveg vagy szilikagél.

3. Reverzfézisú kromatográfia (RPC), hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (HIC).

A módszer alapja az, hogy a hidrofil gél felszínéhez kovalensen kötött alkil-szubsztituensekhez, egy oldat különböző komponensei, (eltérő hidrofób karakterük miatt) különböző erősséggel kötődnek. A két technika között az a különbség, hogy RPC-hez hosszabb szénláncú szubsztituenssel (C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>) nagyobb mértékben szubsztituált (100-300 mmol/ml gél) mátrixot használunk, míg HIC-hoz használt abszorbensek szubsztitúciós foka 10-50 mmol/ml gél, és a szubsztituens alkil láncja rövidebb (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>). A különbség azt okozza, hogy az RPC-hez használt, általában nagyobb kapacitású és jobb felbontást biztosító töltetekhez a fehérjék gyakran olyan erősen kötődnek, hogy az elúcióhoz szükséges nagy szerves oldószer koncentráció denaturációjukat váltja ki. A kevésbé hidrofób mátrix azonban csak viszonylag tömény sóoldatokban (pl. 0.7 - 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) képes a fehérjék megkötésére. A fehérjék elúciója a sókoncentráció csökkentésével történik, esetleg kevés etilalkohol (10%-ig) hozzáadásával biztosítható a rendkívül hidrofób felszínű fehérjék elúciója.
4. Affinitási kromatográfia  
Az eddig ismert izolálási módszerek a fehérje valamely fizikai vagy kémiai tulajdonságán (molekulaméret, töltés, oldékonyság stb.) alapulnak. Az affinitási kromatográfia az a módszer, amely a fehérjék valamilyen biológiai specifitását használja ki. A módszer alapja az, hogy kovalens kötéssel szilárd hordozóhoz kötnek olyan molekulákat, melyekkel az izolálni kívánt fehérje specifikus kölcsönhatásba lép - enzim esetén ez a szubsztrát vagy egy kompetitív inhibitor, receptor esetében pedig az effektor. A szilárd hordozó lehet a gélszűrészhez felhasznált bármely oszloptöltet, leggyakrabban a Sepharose gél. Egy immobilizált szubsztrátot tartalmazó oszlopon megfelelő pH-n és ionerőn csak a szubsztrátot felismerő enzim kötődik meg, a többi fehérje az oszlopról lemosható. A pH és az ionerő alkalmas változtatásával, vagy esetleg oldott szubsztrátnak a hozzáadásával az enzim tiszta állapotban eluálható az oszlopról.
5. Dialízis, ultraszűrés  
Gyakran van szükség arra, hogy a fehérjeoldatok ionösszetételét megváltoztassuk, illetve a fehérje mellől kis molekulású anyagokat eltávolítsunk. Ez a feladat megoldható gélszűréssel is, de nagyobb térfogatok esetén, vagy ha fontos hogy a fehérjeoldat térfogata ne növekedjen jelentősen, a dialízis a legegyszerűbb módszer. A fehérjét, vagy más makromolekula oldatát féligáteresztő hártýából (leggyakrabban módosított cellulóz) készült, két végén lezárt csőbe -dialízis zacskó- helyezzük, majd a csövet nagy térfogatú pufferoldatba merítjük. A kis molekulák szabadon áramlanak a dializáló membrán pórusain keresztül, míg a makromolekulák a csőben maradnak. A pufferoldat keverésével az egyensúly beállításához szükséges idő lerövidíthető. A 2.1 ábra szemléletesen a módszer elvét, és legegyszerűbb kivitelezési formáját.



2.1 ábra

### Az enzimaktivitás mérése

Az enzimek működése számszerűen jellemezhető az enzim mennyisége, az átalakított anyagmennyiség, és az ehhez szükséges idő közötti összefüggéssel. A gyakorlatban legtöbbször a specifikus aktivitás fogalma használatos. Egy enzimpreparátum specifikus aktivitása alatt az egységnyi fehérjemennyiségre ( $\mu\text{g}$ ,  $\text{mg}$ ) vonatkoztatott, adott időegység alatt ( $\text{sec}$ ,  $\text{min.}$ ) átalakított szubsztrátmennyiséget ( $\mu\text{mol}$ ,  $\text{mmol}$ ) értjük.

$$\text{specifikus aktivitás} = \frac{\text{átalakított szubsztrát mennyisége}}{(\text{fehérjemennyiség} \times \text{idő})}$$

A specifikus aktivitás értéke "indikátora" az enzimmennyiség tisztaságának. Tekintve, hogy legtöbbször csak az enzimmennyiségben levő összes fehérjét tudjuk analitikailag mérni (nem specifikusan a jelenlévő enzimfehérjét), minél nagyobb specifikus aktivitást mutat egy enzimmennyiség a preparálás során, annál tisztább. Ha a specifikus aktivitás értéke további tisztítási lépésekkel már nem növelhető, az enzim feltehetőleg homogén. Az enzimeket jellemezhetjük enzimaktivitás egységgel (jele U, unit) is. Ez az érték megmondja, hogy az adott körülmények között mennyi enzim szükséges egy önkényesen választott szubsztrátmennyiség (1  $\mu\text{mol}$ , 1  $\text{mmol}$  stb.) átalakításához egy önkényesen választott időegység (1 perc, 10 perc stb.) alatt.

Az SI rendszerben az enzimaktivitás egységét katalitikus egységnek (katal) nevezzük. 1 katal az az enzimmennyiség, amely 1 mól szubsztrát 1 másodperc alatt történő átalakításához szükséges. A katal a legtöbb gyakorlati célra túl nagy számértéket ad, ezért a mkatal, nkatal stb. használatos.

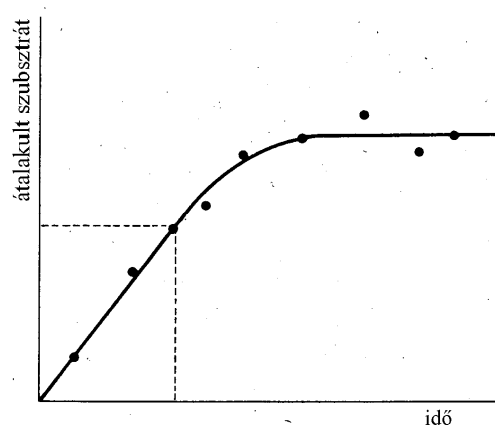
Az enzimaktivitás fentebb definiált számszerű kifejezéseinek csak akkor van reális értékük, ha az enzimaktivitás mérése olyan körülmények között történik, amikor az átalakult szubsztrát mennyisége:

- arányos az eltelt idővel, más szóval a reakció sebessége állandó (állandó enzimmennyiség esetén) illetve
- arányos az enzim mennyiségével (állandó reakcióidő esetén).

A fenti két eset akkor teljesül, ha a reakció során a szubsztrátkoncentráció csak elhanyagolható mértékben csökken. Ennek érdekében akkora szubsztrátfelesleget

biztosítunk, hogy a reakció során átalakult szubsztrát mennyisége a teljes szubsztrátmennyiséghez képest elenyésző legyen. Ha ezek a feltételek nem teljesülnek, az aktivitásmérés adatainak fent definiált módon történő kifejezése nem jogosult, félrevezető.

Egy enzim tanulmányozásának első lépése mindig az enzimaktivitás mérési feltételeinek kidolgozása. Ezen az előbbieken ismertetett feltételek kísérleti úton történő meghatározását értjük. Az első kísérletsorozatban az enzimaktivitás mérés időfüggését vizsgáljuk állandó enzimkoncentráció esetén. Az enzimreakciót viszonylag nagy térfogatban indítjuk el, majd meghatározott idő elteltével mintát veszünk a reakcióelegyből és meghatározzuk az átalakult szubsztrát mennyiségét. A mérés eredményeit grafikonon ábrázoljuk:



2.2. ábra. Átalakult szubsztrát-idő függvény

Látható hogy az enzimreakció sebessége (a görbe iránytangense) egy bizonyos idő múlva csökkenni kezd, elfogy a szubsztrát. További kísérleteinkhez azt az időintervallumot választjuk ki, amely a szaggatott vonallal jelzett tartományba esik, amikor a szubsztrát átalakulása arányos az idővel.

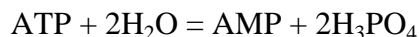
Következő kísérletsorozatunkban az enzimkoncentráció függvényében mérjük az állandó (az előző kísérlet alapján kiválasztott) inkubációs idő alatt átalakított szubsztrát mennyiségét. A helyes enzimkoncentrációt úgy választjuk ki, hogy az enzim aktivitását a legkényelmesebben, legpontosabban mérhessük, a mérés során végzett reakciók kiértékelése a mérőkészülékek érzékeny tartományában történjen stb. és természetesen a mérés abba az enzimkoncentráció tartományba essen, ahol az enzim átalakítási sebessége arányos az idővel.

Az enzimaktivitásmérés körülményeinek kidolgozásába beletartozik a megfelelő kontrollok kiválasztása is. A kontrollokkal a katalízis nélküli spontán kémiai átalakulást vesszük számításba. Minden esetben végezzük el a reakciót az enzim, illetve a szubsztrát elhagyásával. Koenzimmal működő enzimeknél külön koenzimkontrollok is szükségesek.

## 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:

- centrifuga
- turmixgép
- táramérleg
- jeges vízfürdő
- pH-mérő

### A gyakorlat kivitelezése

#### **Az apiráz enzim izolálása**

1. A burgonyát mossuk meg, és hámozatlanul vágjuk apróra, minden 100 grammjához adjunk 35 ml desztillált vizet, és alaposan aprítógépben homogenizáljuk, 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, és 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.
4. 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.
5. Pár perc állás után centrifugáljuk az elegyet (4000 RPM, 5 perc).
6. *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 fehérjéket. Az oldatot kb. 5 percig kevergetjük.
7. Ismételt centrifugálás után (4000 RPM, 5 perc), a felülúszóban lesz az enzim.
8. 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 fel nem oldódik. Az ammóniumszulfát reverzibilis kicsapó szer (kisózás!), mely a fehérjéket dehidratálja. Egy adott fehérje csak meghatározott ammóniumszulfát-koncentráció felett csapódik ki. A fenti körülmények között az apiráz még oldatban marad.
9. A kicsapódott idegen fehérjéket centrifugálás (4000 RPM, 5 perc) után eldobjuk.
10. A felülúszó minden ml-éhez további 140 mg ammóniumszulfátot adunk a 8. pontban leírt módon. Az enzimet az ekkor kiváló csapadék tartalmazza.
11. Centrifugálás után (4000 RPM, 5 perc) a felülúszót elöntjük, és az összes csapadékot 1 ml desztillált vízben feloldjuk.
12. Az így nyert preparátumot 1 db Eppendorf-csőbe tesszük, felcímkézzük (apiráz, 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 5, 10 és 20  $\mu\text{l}$  apiráz-preparátumot, 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 értékeit* 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 szerves 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, kén-savas molibdátot tartalmazó kémcsövekbe mérünk. Kémcsőkeverővel összekeverjük, és 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 indítjuk 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 leállítás után 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.

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

**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 μl (!)	0.2M borát puffer ml	0,01 M CaCl <sub>2</sub> ml	H <sub>2</sub> O ml	5 mM ATP ml
1-2	25	1.0	1.0	1.6	0.4
3-4	50	1.0	1.0	1.6	0.4
5-6	75	1.0	1.0	1.5	0.4
7-8	100	1.0	1.0	1.5	0.4
9-10!!	75	1.0	1.0	1.5	0.4

1. Az 1-8. sz. csöveket már 5 perccel a mérés előtt 30 °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 °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 μmol foszfát/(mg enzim x perc) egységben!**

## 4. GYAKORLAT

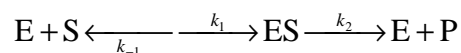
### Tripszin aktivitásának mérése mesterséges szubsztráttal

#### Bevezetés: Enzimkinetika

Az élő szervezetben a kémiai reakciók enzimek segítségével játszódnak le. Ezek a figyelemre méltó katalitikus reakciók nagy specifitást mutatnak az egyedi reakcióutakra és szubsztrátokra nézve. Az enzimek nem csupán passzív felületek, ahol a reakciók lejátszódnak, inkább bonyolult molekuláris gépek, melyek különböző mechanizmusokon keresztül működnek. Az enzimek egy része csak egy szubsztrátot köt, mások két vagy több szubsztrátot kötnek. A kötődési illetve leválási sorrendek egyes enzimeknél fontosak, másoknál nem. Néhány szubsztrát kovalens intermedierben kötődik az enzimhez, mások nem.

Az enzimreakciók kinetikai analízise legtöbbször hatásos eszköz a reakciómechanizmusok felderítésére.

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 explicite integrálni, csak egyszerűsítések után oldható meg.

#### Egyszerűsítés egyensúly feltételezésével

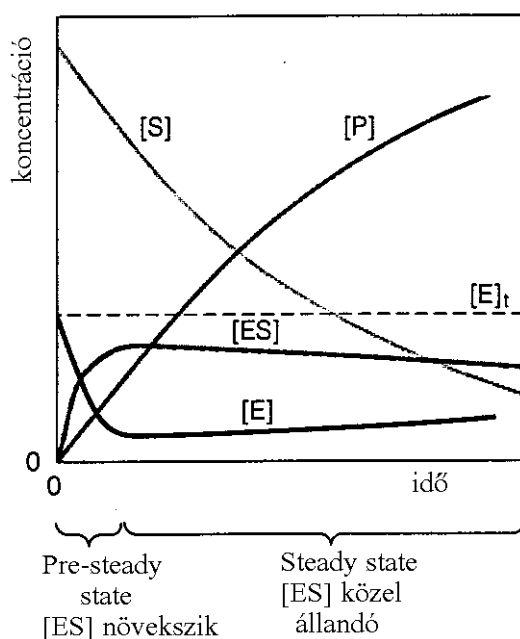
1913-ban Leonor Michaelis és Maude Menten feltételezték hogy  $k_{-1} \gg k_2$ , így a reakció első lépésében egyensúly alakulhat ki a szabad enzim és szubsztrát, és az enzim-szubsztrát komplex között, és a termékkeletkezés irányába mutató,  $k_2$  ütemű bomlás nem befolyásolja az  $[ES]$  értékét. Ekkor igaz lesz, hogy,

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (3.)$$

ahol  $K_S$  az enzim-szubsztrát komplex disszociációs állandója. Ezzel az egyszerűsítéssel (2.) megoldható, bár ez az egyszerűsítés az igazán hatékony enzimek esetében nem írja le a valóságot, hiszen minél hatékonyabb egy enzim, a  $k_2$  annál magasabb a  $k_{-1}$ -hez képest, vagyis az  $[ES]$  értékét ilyenkor nagyban befolyásolja a  $k_2$  ütemű bomlás.

Ettől függetlenül, az úttörő munka elismeréseképpen az ES komplex mint Michaelis-komplex ismert.

*Steady-state (állandósult állapot) megközelítés*



1. ábra

Az 1. ábrán látható a reakció különböző résztvevőinek koncentrációváltozása a reakció előrehaladtával, ha a szubsztrát koncentrációja sokkal nagyobb, mint az enzimkoncentráció. 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 szubsztrátkoncentráció nem csökken jelentősen. Ilyenkor ugyanis az ES keletkezésének sebessége megegyezik az ES bomlásának a sebességével, vagyis az  $[ES]$  steady-state, azaz állandósult állapotban van:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (4.)$$

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  $[ES]$ . Ezt a közelítést elsőként G.E. Briggs és James B.S. Haldane javasolta 1925-ben.

Bár a szabad enzim illetve az enzim-szubsztrát komplex koncentrációja általában nem határozható meg, felírható a teljes enzimkoncentráció, mint a kettő összege:

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (5.)$$

A 4. és 5. egyenlet felhasználásával a 2. egyenlet:

$$k_1([E]_T - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (6.)$$

Amit [ES]-re megoldva

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad (7.)$$

egyenletet kapjuk, ahol

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (8.)$$

A  $K_M$  az úgynevezett Michaelis konstans.

A (7.) segítségével felírhatjuk a kezdeti sebességet:

$$V_0 = \left\langle \frac{d[P]}{dt} \right\rangle_{t=0} = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad (9.)$$

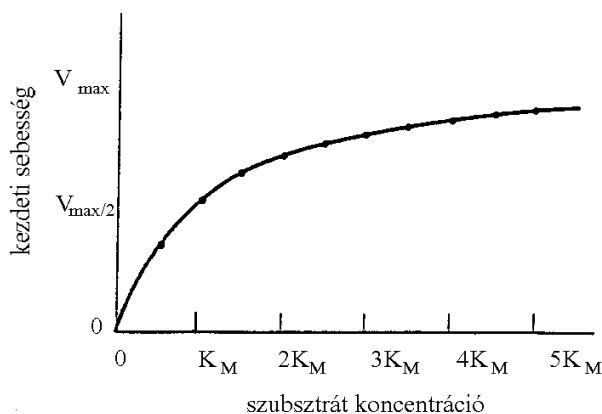
Kezdeti sebességet határozunk meg, ezért legfeljebb annyi ideig mérjük a reakció zajlását, amíg a szubsztrátnak még csak kevesebb, mint 10%-a alakult át terméké, vagyis a szubsztrátkoncentráció, és ezért a sebesség, praktikusán még a kiindulásinak (állandónak) tekinthető. A maximális sebességét a reakció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

$$V_{\max} = k_2 [E]_T \quad (10.)$$

Így a kezdeti sebességet felírhatjuk a (9.) és (10.) kombinálásával:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (11.)$$

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 (11.) 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  $k_{\text{cat}}$

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 10. egyenletből látszik hogy a Michaelis-Menten modell szerint a  $k_{\text{cat}}=k_2$ , de azon enzimreakciónál, melyek bonyolultabb mechanizmus szerint játszódnak le, a  $k_{\text{cat}}$  több elemi sebességi állandó függvénye lehet.

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

### 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.) Még olyan nagy szubsztrátkoncentráció esetén is, amikor  $[S]=10 K_M$ ,  $v_0$  csak 91%-a  $V_{\max}$  -nak, így az extrapolált érték legtöbbször alábecsüli a valós értéket.

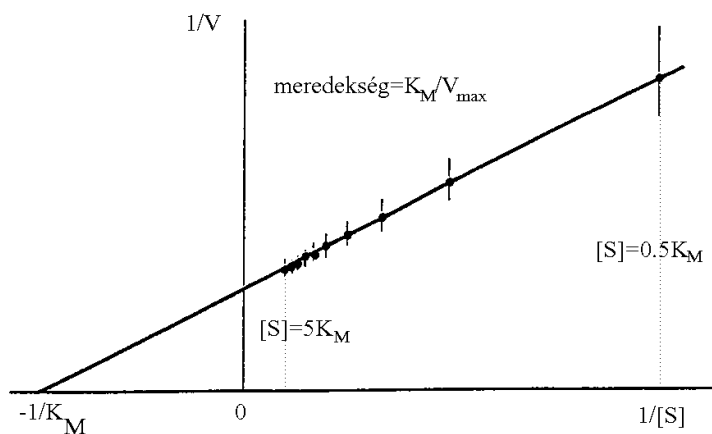
### A kettős reciprok módszer

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

A Lineweaver-Burk féle 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.

#### Nem-lineáris regresszió

Napjainkban már több olyan számítógépes program is hozzáférhető (Graphit, Origin), mely nem-lineáris regresszióval hiperbolát képes illeszteni megfelelő adatsorhoz. A mi esetünkben a program függvény-készletéből a derékszögű hiperbola alábbi egyenlettel leírható formáját kell kiválasztanunk:

$$y = \frac{P1 \times x}{P2 + x} \quad (13.)$$

ahol  $y$  = a mért kezdeti sebesség ( $v_0$ )  
 $x$  = a szubsztrát koncentráció [S]

a paraméterek jelentése :

P1 = a maximális sebesség ( $V_{max}$ )  
 P2 = a Michaelis állandó ( $K_M$ )

A program működéséhez általában szükséges, hogy a P1 és P2 paraméterek kiindulási értékeit megadjuk.

Megfelelő kiindulási értékek:

- 1 esetében: a mért legnagyobb  $v_0$  érték kétszerese
- 2 esetében a legnagyobb [S] fele

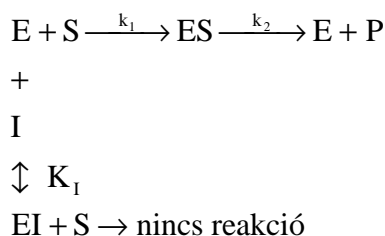
## Enzimgátlás

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:

$$K_1 = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (14.)$$

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

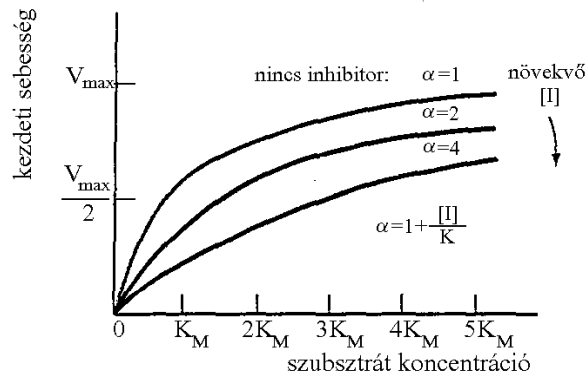
Ha kifejezzük  $V_0$ -t a mérhető paraméterekkel, a következő egyenletet kapjuk:

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

ahol:

$$\alpha = \left\langle 1 + \frac{[I]}{K_1} \right\rangle \quad (16.)$$

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)

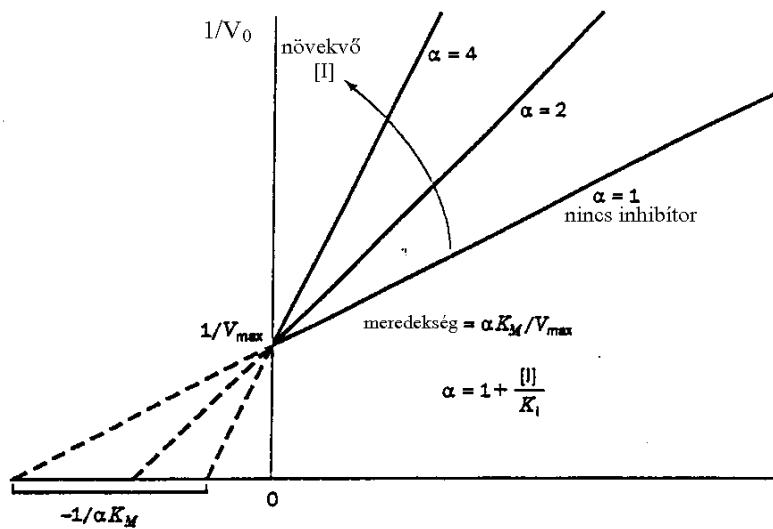


4. ábra

A 15. egyenlet reciprokát felírva az alábbi egyenletet kapjuk.

$$\frac{1}{v_0} = \left\langle \frac{\alpha K_M}{V_{max}} \right\rangle \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \tag{17.}$$

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

## 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, 11.0

A hullámhossz: 405 nm, a terméként 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 inhibitorot és a tripszint, majd 20 perc inkubálás után a szubsztrát hozzáadásával indítjuk a reakciót.

### **A mérés kivitelezése**

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 küvettába, és haladéktalanul regisztráljuk az abszorbancia változását. A reakció elindítása utáni gyors mérés azért fontos, hogy a kiindulási koncentráció-viszonyoknak 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  $\mu$ l 0.1M-os BAPNA  
10  $\mu$ 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],  $\mu$ M) függvényében, és ennek reciprok függvényét ( $1/V_0-1/[S]$ ).

**Határozza meg a maximális sebesség ( $\mu$ M/perc) és a Michaelis konstans ( $\mu$ 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  $k_{cat}$  értékét! (Használja a 10. egyenletet. Jelen mérési körülmények között  $k_2=k_{cat}$ .)

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 $\mu$ l	8 $\mu$ l	12 $\mu$ l	18 $\mu$ l	25 $\mu$ l	40 $\mu$ l
tripszin	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ 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 ( $[I]$ ,  $\mu\text{M}$ ) 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 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
0.5 mM benzamidin	-	10 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	-	-	-	-
10 mM benzamidin	-	-	-	-	5 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	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 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$

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

## Bevezetés az 5. és a 6. gyakorlatokhoz

### Elektroforetikus módszerek

#### 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 választhatóak el egymástól.

A töltéssel rendelkező testre a „ $q$ ” töltés és az „ $E$ ” elektromos térerő szorzatával egyenlő  $F_e$  elektromos erő hat. Az  $E$  mértékegysége (newton/coulomb), illetve (volt/cm). Az elektroforézisek egyik fő paramétere az alkalmazott térerő, amit volt/cm értékben adnak meg.

$$F_e = q \times E$$

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 (lásd lent) az ( $f$ ) értéke a gél pórusméretével szabályozható.

$$F_k = f \times v$$

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 egyenletes sebességgel halad ( $F_e = F_k$ , tehát  $F_{eredő} = 0$ ).

$$q \times E = f \times v$$

A részecske elektroforetikus mozgékonyága ( $\mu$ ) megmutatja, hogy a részecske adott térerő mellett adott közegben mekkora sebességgel vándorol. Ez egyenesen arányos a töltésével ( $q$ ), és fordítottan arányos a közegellenállási együtthatóval ( $f$ ).

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

Az eltérő mozgékonyágú 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. Ez utóbbi vizes oldata rendkívül nagy viszkozitású. 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. Kémiaiailag 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. Ezek a szabad gyökök önmagukban nem képesek az akrilamid molekula kettős kötését felhasítva elindítani a gyökös polimerizációt, viszont gerjesztik az iniciátor molekulákat. Ez



utóbbiakból ekkor szabad gyökök alakulnak ki melyek már kiváltják a polimerizációt. 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. Az elektroforézis "geometriája" szerint kétféle eljárás használatos. A korábban kidolgozott módszer esetében a gélt egy üvegcsőben hozzuk létre. Az így létrejövő géloszlopban csak egy mintát lehet futtatni. Az újabb eljárás szerint a gélt 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. Ez egyrészt nagyban növeli a vizsgálható mintaszámot, másrészt megkönnyíti az egyes minták elektroforetikus eredményének összehasonlítását.

Az elektroforézis sikerét döntő mértékben befolyásolja a pH és az akrilamid koncentráció helyes megválasztása. Fehérjék esetén 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 puffertankokban. Ennek a módszernek az előnye az egyszerűségében rejlik, viszont a felbontóképessége valamivel rosszabb, mint a jóval bonyolultabb ún. diszkontinuus pufferrendszereket alkalmazó módszereké.

A diszkontinuus elektroforetikus technikák 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 térrő

is, ezért a fehérjék vándorlása felgyorsul, de csak addig, amíg eléri 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 koncentráció 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-dodecil-sulphate) poliakrilamid gélelektroforézis, melyet a 6. számú gyakorlat mutat be.

## **B) Natív PAGE**

Ha az elektroforézist nem-denaturáló közegben, és alacsony hőmérsékleten végezzük, akkor számos enzim megőrzi natív szerkezetét és így enzimaktivitását. Ebben az esetben az enzimek a gélben specifikusan kimutathatók még akkor is, ha nagyon nagy mennyiségben vannak jelen más fehérjék is. Egy ilyen „festési” eljárás során a gél egy olyan szubsztrát oldatába áztatjuk, amelyet a kimutatni kívánt enzim szelektíven alakít át, és a termék színes és oldhatatlan. Így ahol a gélben az adott enzim megtalálható, ott a helyét egy színes csapadék jelzi.

Az általános bevezetőben leírtak szerint a hagyományos akrilamid gélelektroforézis során a szeparáció a fehérjék relatív töltésétől, alakjától és méretétől egyaránt függ, ezért első megközelítésben nem alkalmas pl. a fehérjék molekulatömegének meghatározására. Arra sem ad választ, hogy egy minta homogén-e, hiszen ha a fehérjék pl. aggregálódnak, egy csíkot kaphatunk a gélen akkor is, ha valójában többféle fehérje van jelen. Azonos okokból kifolyólag azt sem lehet egy ilyen gél alapján egyértelműen eldönteni, hogy egy fehérje hány alegységes. Ezen kérdések megválaszolására a poliakrilamid gél elektroforetikus technikák leginkább elterjedt válfaja, az SDS poliakrilamid gélelektroforézis bizonyult alkalmasnak.

## **C) 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 aleggyszerkezet felbomlik, és a fehérjék denaturálódnak. Az SDS mintegy "kitekeri" 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 aleggységek 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 aleggységek 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 pufferrendszerrel 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 aleggység ek molekulatömegét határozzuk meg, vagyis a fehérje tényleges natív molekulatömegének kiszámításához az aleggyszerkezetet is ismerni kell.

#### D) Izoelektromos fókuszálás

Izoelektromos fókuszálás során olyan körülményeket teremtünk, hogy a fehérjék kizárólag az izoelektromos pontjuk alapján váljanak el egymástól. Az eljárást a vetített anyag részletesen ismerteti, itt csak annyit emelünk ki, hogy az eljárás során a méret- és alakkülönbségek okozta esetleges elválást úgy akadályozzuk meg, hogy nagyon nagy pórusméretű gélt használunk, ami még az igen nagy fehérjék vándorlását sem akadályozza, és töltéseket nem hordozó urea segítségével denaturáljuk a fehérjéket. Az urea egyben oldatban is tartja a denaturált fehérjéket. Az ureával tehát egyfelől megakadályozzuk a fehérjék közötti aggregátumok kialakulását, másfelől hasonló (ebben az esetben statisztikus gombolyag-szerű) alakot hozunk létre a natív helyett.

## **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 függetlenül akár már 0.1 µg fehérje is jól detektálható. Az eljárás részletes leírása az 5. számú gyakorlatnál található.

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 fehérjéket első lépésben SDS gélelektroforézissel (lásd 6. 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 fehérjéket a gélben kialakult mintázatot megőrizve rögzítjük a nitrocellulóz membránra. 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. Enzimatis aktivításon 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 specifikusnak megfelelő enzimreakció lejátszódik. Olyan szubsztrátot használnak, mely a reakció során színes terméké alakul, és ez a termék ráadásul csapadék. Ez azt jelenti, hogy a gélnak csak azon területei színeződnek el, ahol az adott enzim van. Erre látunk példát az 5. számú gyakorlatban.

## 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 gélre is igaz, számos, már az akrilamid gélnél is említett előnyös tulajdonság. Ez a gél is hidrophil, 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.

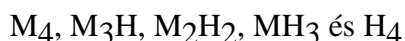
A kétszálú DNS kimutatására leggyakrabban használt festék az etidium-bromid. Az etidium-bromid gyűrűs vegyület, amelynek molekulája képes a DNS kettősspirálban a bázisok közé beékelődni. Az ilyen tulajdonságú vegyületek mutagének lehetnek, hiszen a replikáció során megzavarhatják a DNS polimeráz működését. Az agaróz gélelektroforézissel a 9. gyakorlaton találkozunk. Etidium-bromid helyett ott egy nem mutagén festéket használnak majd.

## 5. GYAKORLAT

### Tejsav-dehidrogenáz izoenzimek elválasztása natív poliakrilamid gélelektroforézissel

Azokat az enzimeket, amelyek molekuláris szerkezete eltérő, de azonos kémiai reakciót katalizálnak, izoenzimeknek vagy izozimeknek nevezzük. Elsőként a tejsav-dehidrogenázról (lactate-dehydrogenase, röv. LDH) sikerült bebizonyítani, hogy az állati eredetű szövetekben izoenzimek formájában van jelen. Kiderült, hogy a legtöbb szövet ötféle tejsav-dehidrogenáz izoenzimet tartalmaz.

A tejsav-dehidrogenáz négy alegységes fehérje. Kétféle alegység létezik. Megkülönböztetnek M (muscle) típusú, és H (heart) típusú alegységet. Az M alegység főleg az vázizmokra, a H alegység leginkább a szívizomra jellemző. A két alegységet két külön gén kódolja. Mivel a kétféle alegység véletlenszerűen kombinálódhat egymással, végeredményképpen ötféle izoenzim lehetséges:



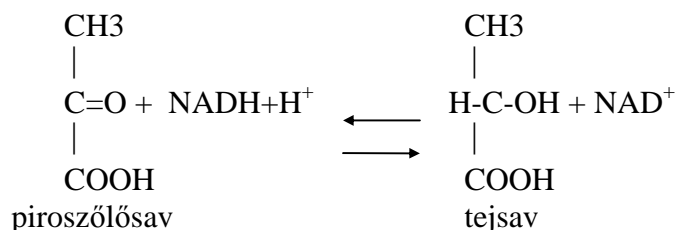
A véletlenszerű kombinálódás miatt az egyes izoenzimek aránya a különböző szövetekben attól függ, hogy az egyes alegységeket kódoló génekről az átírás milyen hatékonysággal zajlik. A kétféle alegység molekulatömege azonos, 34.000 Da (vagyis a tetramer izoenzimek molekulatömege 136.000 Da), de töltésük különböző. Ezért aztán az egyes izoenzimek töltése is különböző, és így ezek elválaszthatók egymástól natív poliakrilamid gélelektroforézissel. A natív körülmények miatt az egyes alegységek nem válnak szét, tehát magukat a tetramer izoenzimeket választjuk el egymástól az elektroforézis során! Leggyorsabban a  $H_4$ , leglassabban az  $M_4$  alegység szerkezetű izoenzim vándorol.

Az egyes izoenzimek enzimatis paramétereik tekintetében is eltérést mutatnak. A  $H_4$  típus alacsony  $K_M$  értéket mutat piroszőlősavval szemben, és a piroszőlősav az enzim allosztérikus inhibitora. Az  $M_4$  típus ezzel ellentétben az említett metabolittal szemben jóval magasabb  $K_M$ -mel rendelkezik, és a piroszőlősav még nagy koncentráció mellett sem gátolja. A többi izoenzim ilyen jellemzői e két típus értékei között variálnak aszerint, hogy bennük az egyes alegységek milyen arányban vannak jelen.

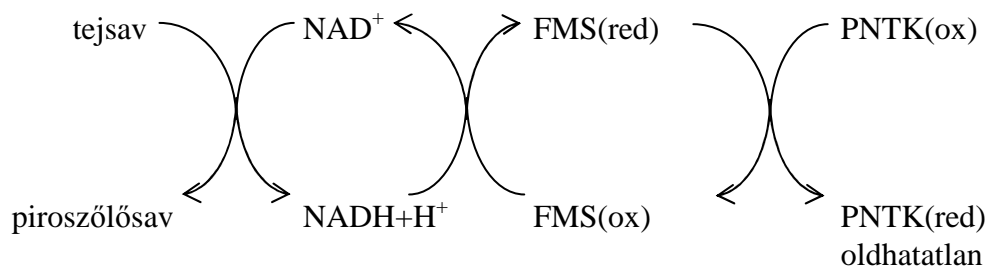
Az a tény, hogy az egyes izoenzimek aránya szövetspecifikus, roppant nagy diagnosztikai jelentőséggel bír. Egyes betegségek esetén, mint pl. szívinfarktus, fertőző májgyulladás, egyes tumorok, bizonyos izombetegségek stb. következtében az érintett szervek szöveteiben jelentős sejtpusztulás indul el, és a sejtek anyagai a vérbe ürülnek. A szérumba normálisan jellemző LDH izoenzimeloszlás ekkor elmozdul a sérült szövetre jellemző eloszlás felé.

A szövetekre jellemző izoenzim-összetétel kimutatása igen bonyodalmas lenne, ha ehhez az enzimet homogén formában, tisztán kellene előállítani. Ez elkerülhető, ha a szövet-homogenizátum elektroforetogramját nem hagyományos fehérjefestési eljárással - mely szinte megszámlálhatatlanul sok fehérjekomponenst mutat -, hanem a vizsgált enzim működésére jellemző specifikus reakció segítségével tesszük láthatóvá. Így csak a vizsgált enzim helyén jelentkezik elszíneződés, ami lehetővé teszi a kiértékelést.

A tejsav-dehidrogenáz a következő reverzibilis folyamatot katalizálja:



Az LDH kimutatható egy speciális színreakcióval, mely a reakcióban szereplő NADH koenzim redukáló képességén alapul. A gélt egy megfelelő pufferoldatban inkubáljuk. Ez tejsavat, NAD koenzimet, fenazin-metaszulfátot (FMS, elektronakceptor), és para-nitro-tetrazólium-kéket (PNTK, redox festék) tartalmaz. A reakció során keletkező NADH redukálja a FMS-t, ami az oxidált formában jelenlévő sárgás színű PNTK-t redukált formává alakítja. Az így keletkező termék egy sötétkék csapadék, amely a gélben színes csíkok formájában jelenik meg, az enzimet tartalmazó helyeken.



A gyakorlaton sertés szerv homogenizátumok izoenzim vizsgálatát végezzük el, hogy megállapítsuk az egyes szervekre jellemző izoenzim összetételt.

### 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 tankuffer 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:**

0,5 M tejsav (Na-laktát)            4,5 ml  
0,2 M Trisz-HCl pH 8,0            21,0 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 tejsavban és Trisz-HCl pufferben, és 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 átpipettázunk 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 gél 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 helyezzük (lásd "anyagok"), és fénytől védett helyen kb. 10 percig állni hagyjuk. 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 gél 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 gél 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:

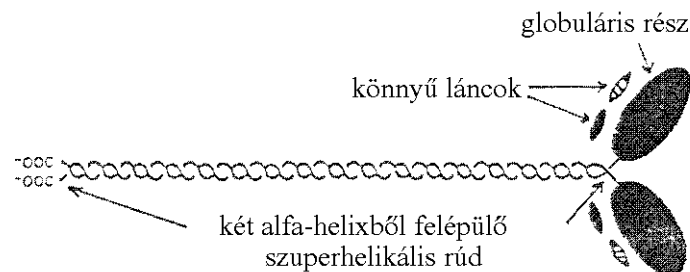
**Értékeljék ki a kapott elektroforetogramokat! Hasonlítsák össze az összfehérje-festéssel, és az enzimatis elóhívással kapott géképeket. Jellemezzék az egyes szövetek LDH izoenzimeinek arányát.**

## 6. GYAKORLAT

### Miofibrilláris fehérjék molekulatömegének meghatározása SDS poliakrilamid gél elektroforézissel

#### Bevezetés

A miofibrillumok a harántcsíkolt izomszövet izomroston belüli összhúzóelemi 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.

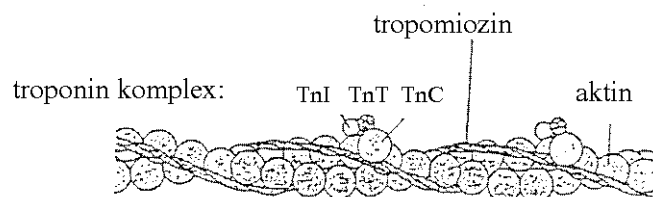


A miozin sematikus képe



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

Festékoldat:

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

festéktelenítő: 7% metanol, 9% ecetsav

Kalibráló fehérjék:

Rn-áz Ms: 15000

Rn-áz

mioglobin Ms: 16800

Jelölésük:

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 gél-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 "fésű" 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 gél oldatát.

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 "fésű" mellyel a mintafelvívő zsebeket alakítjuk ki. Ügyeljünk arra, hogy a "fésű" fogai alá ne kerüljenek buborékok. Gyorsan kell dolgozni, mert a koncentráció géloldat az itt alkalmazott magasabb ammónium-perszulfát koncentráció miatt percek alatt polimerizál.

Amíg a minta gél polimerizál, a már kezelt kapott miofibrillumot (jele: Miof.) a kalibráló fehérjét tartalmazó Eppendorf csövekkel együtt vízfürdőben 1

percig forraljuk. Ne felejtsek 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 géllemez 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(Mt)-relatív mobilitás koordinátarendszerben. Határozzuk meg a főbb miofibrilláris fehérjék molekulatömegét!**

## Bevezetés a 7. és 8. gyakorlathoz

### Oszlopkromatográfiás eljárások

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, diffúzión, oldékonyságon, affinitáskromatográfia esetén pedig különleges kölcsönhatásokon. A gélszűrés (méret szerinti kizárásos kromatográfia) esetében az elválasztás alapja a molekulák méretének és alakjának különbözősége.

Minden kromatográfiás eljárásnak közös vonása, hogy az egyik fázis folyamatosan áramlik a másik, ún. álló fázissal szemben. Az álló fázis halmazállapota lehet szilárd vagy folyadék, a mozgó fázis pedig folyadék vagy gáz. A folyadék mozgófázisú kromatográfiás módszereket a kivitelezés módjától függően feloszthatjuk oszlop-és rétegekromatográfiás módszerekre. Ezek a feladat céljának megfelelően analitikai vagy preparatív méretben hajthatók végre.

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-szubstrát, 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.

A gyakorlaton alkalmazott kromatográfiás módszereket részletesebben az egyes feladatok leírásánál ismertetjük, a kromatográfiás elválasztások minőségére vonatkozó általános jellemzőket és azok számolási módját pedig az ioncserélő kromatográfia leírásánál találjuk.

### Gélszűrési kromatográfia.

#### Bevezetés

Gélszűrés során a kromatográfiás oszlop töltete egy finom szemcsés, 10-300  $\mu\text{m}$  átmérőjű gömbökből álló porózus, hidrofil gél. Ennek segítségével a kromatográfiás oszlopban két folyadéktér alakul ki. Az egyik a gélszemcséken kívüli szabadon mozgó mobil fázis, a másik a gélszemcsék belsejében levő korlátozott mozgású folyadéktér. Ha egy oldat halad keresztül egy ilyen

kromatográfiás oszlopon, az oldott molekulák mozgása alapvetően két tényezőtől függ, egyrészt a mozgó fázis áramlási sebességétől, másrészt a diffúziótól, ami lehetővé teszi, hogy az oldott molekulák, ha méretük engedi, átjárnak a gél szemcsék belsejébe.

Egy molekulakeverék szétválasztása azon alapul, hogy egy adott pórusméret-tartománnyal rendelkező géloszlop esetén egyes molekulák méretüknél fogva nem férnek be a gél szemcsék belsejébe, ezek számára csak a mobil fázis, vagyis csak a gél szemcsék közötti tér áll rendelkezésre, ezért ezek gyorsan keresztülfolynak az oszlopon. A kisebb molekulák viszont méretüknek megfelelően több-kevesebb időt az álló fázis, a gél szemcsék belsejében levő folyadékterben töltenek, ezért lassabban jutnak keresztül a kromatográfiás oszlopon.

A gél szűrés 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 megoszlási kromatográfiás 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 mobil fázison halad keresztül, vagyis a gélből teljesen kizáródik. A  $V_s$  egyenlő az álló fázis térfogatával, vagyis a gél szemcséken 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  $V_t - V_o$  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:

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

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, pl. peptidek 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. A nagy pórusméretű, kevés keresztkötést tartalmazó dextrans gélek mechanikai tulajdonságai nem túl kedvezőek, ezek könnyen összenyomhatók, ezért igen nagy molekulatömegű vagy elongált molekulák elválasztására szintetikus polimerekből készült rigidebb géleket használnak.

Ha az elválasztandó anyagok közötti méretkülönbség igen nagy, mint például egy makromolekula sómentesítése esetén, célszerű olyan gélt választani, ahol a nagy molekulatömegű komponens a kizárási térfogatban ( $V_o$ ) eluálható ( $K_{av}=0$ ), míg a kis molekulatömegű komponens a  $V_t$  közelében jelenik meg ( $K_{av}=1$ ). Ilyenkor a makromolekula-frakció élesen, minimális sáv szélességgel és hígulással jelenik meg a lehető legrövidebb idő alatt.

Makromolekulák frakcionálása esetén, ha a keresett komponens molekulatömege ismert, olyan gélt válasszunk, ahol az adott komponens körülbelül a frakcionálási tartomány felénél eluálható. Tehát például ha egy fehérjekeverékből egy 100 kDa molekulásúlyú fehérjét kívánunk izolálni, olyan gél ajánlható, ahol a frakcionálási tartomány 10-250 kDa molekulásúly tartományba esik.

#### **b) A gél szemcseméretének kiválasztása**

Finom szemcsékkel töltött kromatográfiás oszlopban a gél jobban kitölti a rendelkezésre álló térfogatot, ezért csökken a mobil fázis 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.

A legtöbb feladatra a Fine és Medium jelzésű (20-150  $\mu\text{m}$ ) szemcseméret jól használható. Preparatív munkánál illetve sómentesítésnél, ahol nagy áramlási sebesség kívánatos, illetve az elválasztandó komponensek kisebb felbontóképesség mellett is kellően elválnak, durva szemcsés, Coarse jelzésű gélek is használhatók.

#### **c) Az oszlop méretének kiválasztása**

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

Analitikai célra 1 cm körüli átmérőjű oszlopokat használnak, az átmérő növelésével az elválasztható minta mennyisége vagyis az oszlop kapacitása növelhető.

#### **d) A mintatér fogat 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 szeparálandó 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 mólos 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 só el kívánjuk távolítani, célszerű illékony só, 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, mivel nem alakul ki egyensúly az álló és mozgó fázis között. 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.

## 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 töltենék. A duzzasztás során dekantálással el kell távolítani a töredezett, nehezen ülededő, 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 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 tölcserő az oszlop tetejéhez és öntsünk lehetőleg egyszerre annyi egyenletesen felkevert, tejföl sűrűségű gélsuszpenziót az oszlopba - kihasználva a tölcserő 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 gélágyban megjelenő, hosszanti irányú repedések jelzik).

4. Amikor az oszlopban a gél a kívánt magasságban leülepedett, távolítsuk el a tölcsért, 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 mintafelvitel 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 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 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

### Ioncsérés kromatográfia

#### Bevezetés

A töltéssel rendelkező molekulák elválasztására az egyik leghatékonyabb módszer az ioncsérés kromatográfia.

Az ioncsérés kromatográfiát leggyakrabban oszlopkromatográfia formájában hajtják végre, bár ismeretesebbek olyan vékonyréteg-kromatográfiás módszerek is, melyek elsősorban az ioncsere elvén működnek. A továbbiakban kizárólag az oszlopkromatográfiával foglalkozunk.

Az ioncsérés kromatográfiához használt oszloptöltetek egy oldhatatlan hordozó (mátrix) felszínéhez kovalens kötéssel kötött töltéssel rendelkező csoportokat tartalmaznak. A vizes oldatban szuszpendált mátrix töltött csoportjai körül az ellentétes töltésű oldott ionok ionfelhőt képeznek. Az ionfelhőben az ionok reverzibilisen kicserélődhetnek, a mátrix jellegének és tulajdonságainak megváltoztatása nélkül.

A mátrix töltött csoportjai lehetnek pozitív vagy negatív töltésűek. A pozitív töltésű mátrix az oldatból negatív töltésű ionokat, anionokat köt, ezért anioncsereelőnek nevezzük. A kationcsereelő mátrixok töltése negatív.

Az ioncsereelő mátrixok felépítése szerint megkülönböztetünk hidrofób és hidrofil mátrixú ioncsereelőket. A hidrofób mátrixú ioncsereelőket leggyakrabban nagymértékben szubsztituált polisztirol gyanták. Szervetlen ionok megkötésére, pl. vízlágyításra kiválóan alkalmasak. Mátrixuk hidrofobicitása és nagy felületi töltéssűrűségük miatt a fehérjéket gyakran denaturálják.

A hidrofil mátrixú ioncsereelőket először módosított cellulózból állították elő. A cellulóz mechanikai tulajdonságai azonban nem kedvezőek, a cellulózsálak törnek, nehéz jó minőségű oszlopot készíteni. Ezeket a hátrányokat részben kiküszöböli a Sephadex (dextrán) alapú ioncsereelő mátrix.

Az utóbbi években szintetikus hidrofil polimerekből szabályos gömb alakú és monodiszperz méreteloszlású mátrixokat állítottak elő. A legismertebb ilyen anyag a Pharmacia cég által forgalmazott MonoBead alapú ioncsereelő mátrix.

Az ioncsereelő mátrixokhoz kapcsolt töltött csoportokat az alábbi táblázatban foglaltuk össze:

#### 8.1. táblázat

<b>Az ioncsereelő funkció csoportjai</b>	
<b>Anioncsereelő</b>	<b>funkció csoport</b>
diethyl-aminoetil (DEAE)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
quaterner-aminoetil (QAE)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
quaterner-ammónium (Q)	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
<b>Kationcsereelő</b>	<b>funkció csoport</b>
karboximetil (CM)	$-\text{OCH}_2\text{COO}^-$
szulfopropil (SP)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
metilszulfonát (S)	$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

A szulfonil és kvaterner ammónium csoportokat hordozó ioncserélőket nevezzük erős ioncserélőknek, ezek gyakorlatilag teljesen töltöttek pH 3,0 és 11,0 között. A DEAE és CM csoportok disszociációs foka és ennek következtében ezen ioncserélők kapacitása is függ a közeg pH-jától.

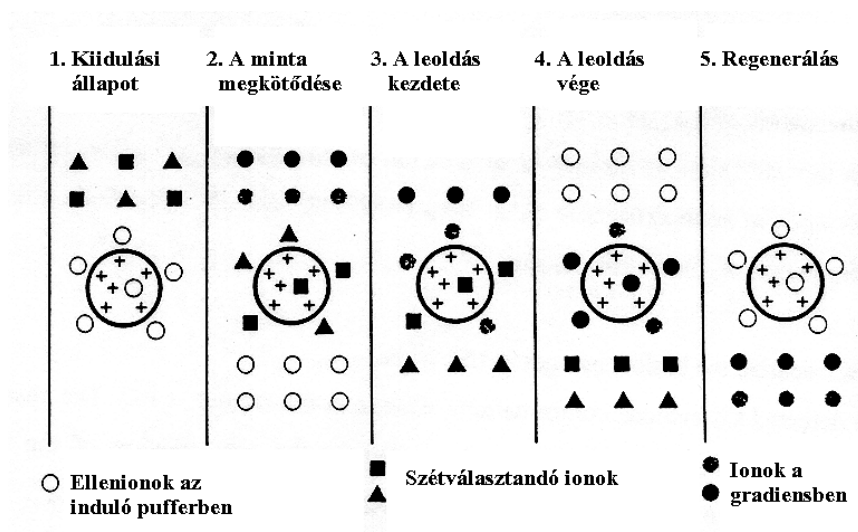
### Az ioncsere elmélete

A legtöbb ioncsérés kísérletet öt fő fázisra lehet osztani (8.1 ábra).

Az első fázis az ioncserélő oszlopnak az ún. induló pufferrel történő egyensúlyba hozása, a kísérlet kezdeti körülményeinek (pH és ionerő) beállítása. Az ioncserélő töltött csoportjaihoz ebben a fázisban könnyen kicserélhető egyszerű ionok (klorid vagy nátrium) kapcsolódnak.

A második fázis a minta felvitele és reverzibilis megkötése az oszlopon. Amennyiben a mintában található anyagok egy része nem kötődik az oszlophoz, ezek az oszlopon áthaladnak illetve az induló pufferrel történő mosással eltávolítjuk őket. Azt, hogy mely anyagok kötődnek és mely anyagok nem, az ekvilibráló puffer (lásd lejjebb) pH-jának és az illető anyag izoelektromos pontjának viszonya dönti el. Anioncsere esetén minden olyan molekula kötődik, aminek izoelektromos pontja az ekvilibráló puffer pH-ja alatt van. Kationcsere során pedig azok az anyagok kötődnek, amelyeknek az izoelektromos pontja az ekvilibráló puffer pH-ja felett van.

A harmadik és negyedik fázis az elúció, a kötött molekulák deszorpciója, amit az eluáló puffer összetételének megváltoztatásával érünk el. Az elúció az ionerő, azaz a jelenlévő ellenionok koncentrációjának növelésével vagy az eluáló puffer pH-jának változtatásával történhet. Az ionerő vagy pH folyamatos változtatását nevezzük gradiens elúciónak. Sógrádienssel történő elúció során az oszlopról először a kisebb nettó töltésű, gyengébben kötődő molekulák válnak le. pH-grádienssel történő elúciókor pedig az anyagok izoelektromos pontjuk sorrendjében mosódnak le. Például anioncsere esetén a gradiens csökkenő pH-jú kell legyen, ezért először az az anyag válik le, amelynek az izoelektromos pontja a legmagasabb az oszlophoz kötődött molekulák közül. (A pH csökkenésére ez veszi el először nettó töltését, azaz válik nulla nettó töltésűvé, ami miatt már nem tud az oszlophoz kötődni.)



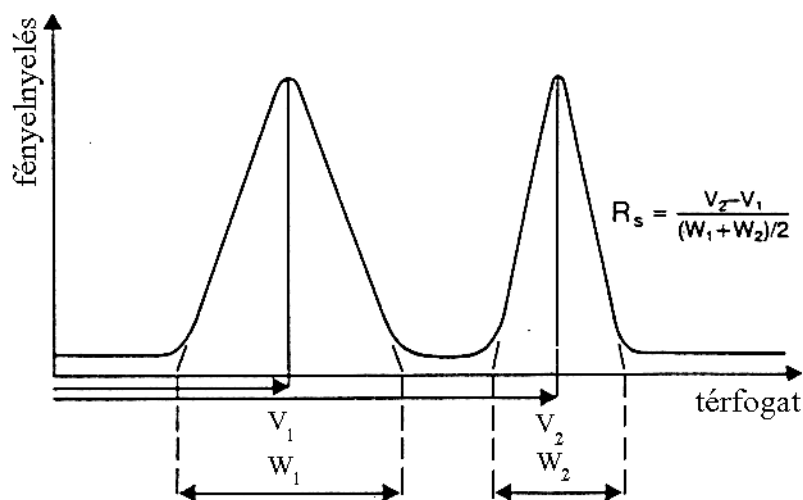
8.1. ábra. Az ioncsérés kromatográfia fázisai (sógrádiens elúció)

**Az ioncserés szeparálás kvantitatív jellemzése.**

Az ioncserés kísérlet eredményét, minden más kromatográfiai módszerhez hasonlóan, több paraméterrel lehet számszerűen jellemezni.

**Felbontás (Resolution,  $R_s$ ):**

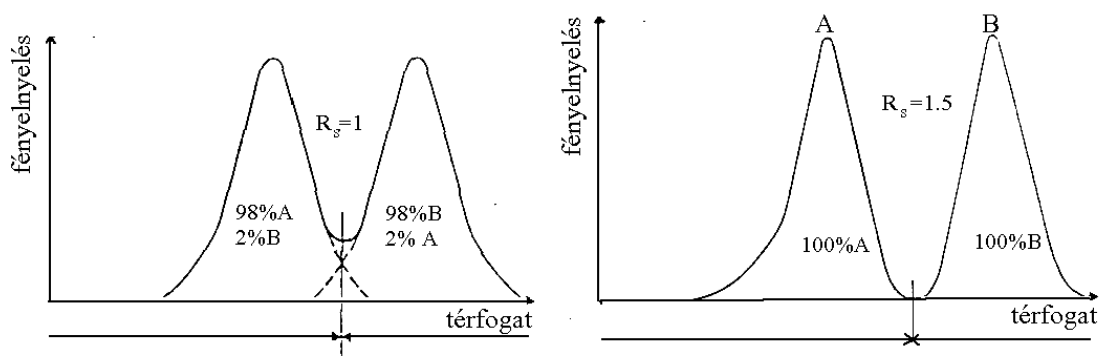
A csúcsok szétválására jellemző szám. Definíció szerint a csúcsok maximuma (elúciós térfogat) közötti távolság osztva a csúcsok szélességének átlagával. (8.2. ábra) Az elúciós térfogatot és a csúcshélességet azonos egységekben kell mérni,  $R_s$  dimenzió nélküli szám.



8.2. ábra. A felbontás meghatározása

Számításokkal igazolható, hogy abban az esetben, ha  $R_s=1$  és ha a két csúcs ideális alakú (Gauss görbe) és egyforma méretű, akkor 98%-os tisztaságban nyerhető ki mindkét komponens. Tökéletes, ún. alapvonal szeparálás akkor érhető el, ha  $R_s > 1.5$  (8.3. ábra).

Megjegyzés: teljesen szeparált csúcs nem jelenti azt, hogy teljesen tiszta anyagot kapunk. Sokszor előfordul az, hogy az adott kromatográfiai körülmények között két vagy több anyag együtt eluálódik.



8.3. ábra. A felbontás és a szeparáció kapcsolata

A kromatográfiás szétválasztást, az egyes csúcsok viselkedését, illetve a kromatográfiás oszlop hatékonyságát további három paraméterrel is jellemezhetjük.

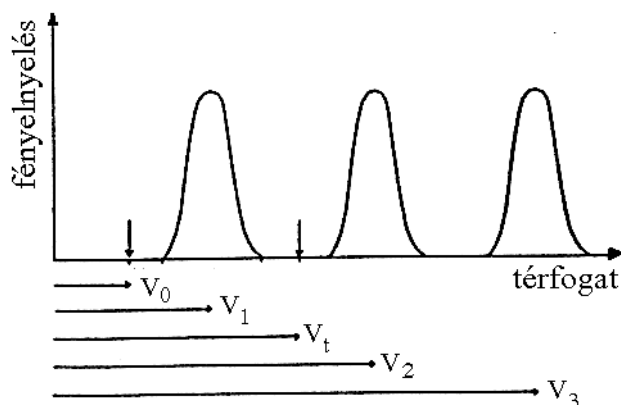
### Retenció

A retenciófaktor egy anyag visszatartottságának mértéke. A retenciófaktor minden egyes csúcsra ki lehet számolni. A 8.4. ábrán látható ideális kromatogramban az első csúcsra az alábbi módon számítható

8.1. egyenlet:

$$k_1' = \frac{V_1 - V_0}{V_0}$$

ahol  $V_1$  az első anyag elúciós térfogata,  $V_0$  az oszlop kizárési térfogata (az oszlopon kölcsönhatás nélkül áthaladó anyag elúciós térfogata)



8.4. ábra Idealizált kromatogram a retenciófaktor kiszámításának bemutatására

Az abszorpciós technikákra, többek között az ioncserés kromatográfiára az jellemző, hogy  $k'$  értéke nagy, mivel az elúciós térfogatok sokkal nagyobbak lehetnek, mint az oszlop térfogata ( $V_0$ ).

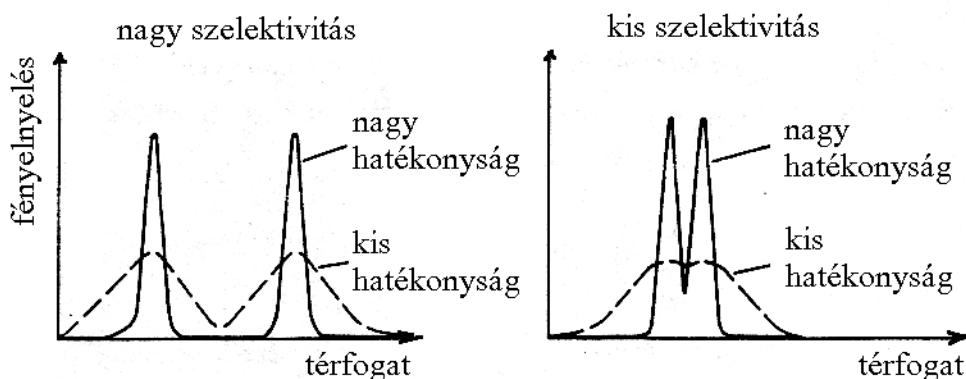
### Szelektivitás ( $\alpha$ )

A szelektivitást ( $\alpha$ ) a 8.4. ábrán látható kromatogram adataiból az alábbiak szerint számítjuk ki, a  $V_1$  és  $V_2$  elúciós térfogatú anyagokra:

8.3. egyenlet:

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} \approx \frac{V_2}{V_1}$$

A szétválasztás szempontjából a jó szelektivitás fontosabb, mint a jó hatékonyság (lásd 8.5.ábra).



8.5.ábra. A hatékonyság és a szelektivitás hatása az elválasztásra.

A szelektivitás függ a mátrix ionos csoportjainak számától és jellegétől, de a kísérleti körülményeknek (pH, ionerő, a puffer megválasztása) is fontos szerepük van a szelektivitás meghatározásában. Az ioncserés kromatográfia sokoldalú alkalmazhatóságának az egyik alapja az, hogy a kísérleti körülményeket a fent említett tényezők variálásával, illetve a gradiens elúció segítségével tág határok között tudjuk változtatni.

### Kapacitás

Egy ioncserélő kapacitása megadja azt, hogy mennyi elleniont képes megkötni. A kapacitásnak három formáját különböztetjük meg:

**Teljes kapacitás:** a töltött csoportok száma egy gramm száraz ioncserélőre vagy egy ml duzzasztott géltre vonatkoztatva. Meghatározható erős savval vagy erős bázissal történő titrálással.

**Szabad kapacitás:** makromolekulák számára sztérikus okok miatt a teljes kapacitásnak csak egy része hozzáférhető, ez a szabad kapacitás

**Dinamikus kapacitás:** amennyiben az adott makromolekula kötődését az oszlopon a puffer áramlása közben vizsgáljuk, az ún. dinamikus kapacitást kapjuk.

A szabad és a dinamikus kapacitás függ:

- az elválasztandó anyag tulajdonságaitól
- az ioncserélő tulajdonságaitól
- az adott kísérleti körülményektől

Az elválasztandó anyagoknak az ioncserés szeparálás szempontjából fontos tulajdonságai: a molekula méretük és töltésük pH függése. Ebből következik, hogy az ioncserélők kapacitása a különböző fehérjékre különböző.



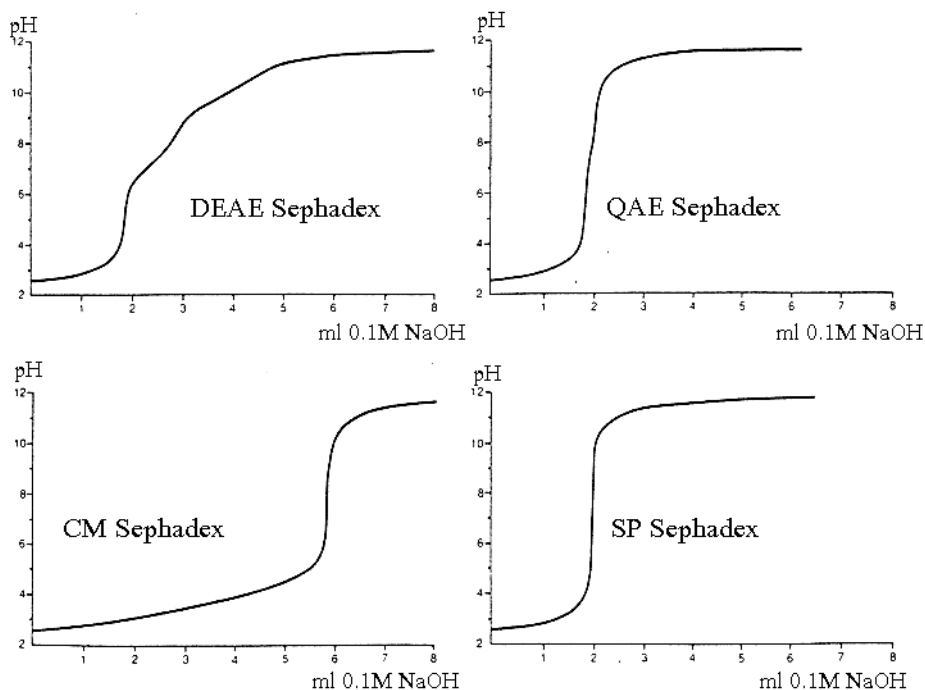
## Sephadex alapú ioncserélők

A Sephadex G-25 és G-50 gélszűrő mátrixok négy különböző csoporttal történő módosításával nyolc különböző ioncserélőt állítottak elő (8.2 táblázat). A G-25-ből származó mátrixok (A-25 és C-25) több keresztkötést tartalmaznak, ezért rigidebbek, kevésbé duzzadnak, mint a G-50-ből származók.

8.2. Táblázat. A Sephadex ioncserélők tulajdonságai

Ioncserélő	Teljes kapacitás $\mu\text{mol}/\text{mg}$	Teljes kapacitás $\mu\text{mol}/\text{ml}$	Funkcionális csoport	Ellenion
DEAE Sephadex A-25	$3.5 \pm 0.5$	500	dietilaminoetil	klorid
DEAE Sephadex A-50		175	dietilaminoetil	klorid
QAE Sephadex A-25	$3.0 \pm 0.4$	500	dietil-(2hidroxypropil)aminoetil	klorid
QAE Sephadex A-50		100	dietil-(2hidroxypropil)aminoetil	klorid
CM Sephadex C-25	$4.5 \pm 0.5$	550	karboximetil	nátrium
CM Sephadex C-50		170	karboximetil	nátrium
SP Sephadex C-25	$2.3 \pm 0.3$	300	szulfopropil	nátrium
SP Sephadex C-50		90	szulfopropil	nátrium

A különböző Sephadex ioncserélők titrálási görbéit a 8.6. ábrán láthatjuk.



8.6. ábra. 0,1 gramm Sephadex ioncserélő 50 ml 1 M KCl-ban, 0,1 M NaOH-dal titrálva

## AMP, ADP és ATP elválasztása

### A gyakorlat kivitelezése

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

#### Eszközök:

Sephadex A-25-tel töltött oszlop (BioRad Econo column)  
perisztaltikus pumpa (ISCO Tris)  
grádiens 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 grádiens keverő edényt. Öntsünk a grádiens keverőedény **jobb oldali 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 helyezük be az Y-csövet. Az Y-cső rövidebb szárához csatlakoztassuk a műanyag fecskendőt. 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 gradiens keverő edény két kamrája közlekedőedényként funkcionál. A gradiens keverő edény jobb oldali kamrájába merítsük bele a gradiens 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 gradiens edény kifolyónyílásának alá. A gradiens elúciót a gradiens 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 küvetájából távozó folyadékot egy 250 ml-es mérőhengerben gyűjtjük. Figyeljünk arra, hogy a gradiens 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 gradiens keverő motort, az UV monitort és a rekordert. A tollat vegyük ki és tegyük rá a kupakot. Mossuk el a gradiens 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

#### Bevezetés

A plazmidok számos baktériumfajban megtalálható, extrakromoszómális, 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 restrikciós, modifikációs rendszerek, melyek enzimei szintén plazmidon kódoltak.

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 kromoszómájának 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. Ezt a régiót a replikációs origóval együtt replikonnak nevezzük. A ma használatos plazmid vektorok replikációja független a sejtostádástól, ún. relaxált kontroll alatt áll. Ezt például a pMB1 plazmidban megtalálható pMB1 replikon képes biztosítani. (A pMB1 vektort először egy klinikai mintából izolálták Hershfield és mtsi, 1974). Az eredeti szekvenciájú pMB1 replikont tartalmazó vektorok kópiaszáma sejtenként 15-20. Az *E. coli* plazmidok között több különböző replikon szekvenciát is találtak (ColE1, p15A, pSC101). Két különböző szekvenciájú, különböző típusú replikont tartalmazó plazmid egymás mellett stabilan fenntartható ugyanabban a sejtben. Az azonos replikációs origót hordozó plazmidok azonban egymással inkompatibilisak, ezekből csak egyféle fordulhat elő egy sejtben.

Minthogy a plazmidok replikációja nem függ fehérjék expressziójától (a szükséges enzimek hosszú életidejűek a sejtben), a gazdasejt fehérjeszintézisének kloramfenikollal való gátlásával el lehet azt érni, hogy a sejt nem lesz képes a kromoszómális 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 szelekciós marker gének teszik lehetővé. A leggyakrabban használt szelekciós markerek antibiotikum-rezisztenciát biztosítanak.

A legelterjedtebben használt antibiotikumok és az azokat inaktiváló enzimek a következők:

Ampicillin: penicillin származék, a sejtfa bioszintézisét végző egyik enzimet gátolja. Az ampicillin-rezisztenciát ( $amp^r$ ) a béta-laktamáznak nevezett, az *E. coli* periplazmájában lokalizált enzim idézi elő. Az enzim a penicillin laktám gyűrűjét hidrolizálja. A hidrolizált penicillin hatástalan.

Tetraciklin: a 30S riboszómális alegység egyik fehérjéjéhez kötődik és megakadályozza a riboszóma transzlokációját. A tetraciklin-rezisztencia gén ( $tet^r$ ) egy 399 aminosavból álló membránfehérjét kódol, mely megakadályozza azt, hogy az antibiotikum bejusson a sejtbe.

Kloramfenikol: az 50S riboszómális alegységhez kötődik és így gátolja a fehérjeszintézist. A kloramfenikol-rezisztencia gén ( $cm^r$ ) a kloramfenikol acetiltransferáz enzimet ( $cat$ ) kódolja. Az enzim a citoplazmában található, acetil-KoA segítségével acetilálja a kloramfenikolt. A módosított kloramfenikol nem kötődik a riboszómához.

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, melyek lehetővé teszik az idegen DNS szakasz transzkripcióját és translációját.

A gyakorlatban felhasznált első, főként klónozásra használt vektorok a pMB1 replikon mellett több szelekciós markert tartalmaztak. Ilyen vektor a pBR322 (Bolivar és mtsi, 1977), melyben ampicillin- és tetraciklin-rezisztencia gén is található. A plazmid egyes származékait még ma is gyakran használják. A plazmid konstrukciója során elérték azt, hogy számos, kereskedelmi forgalomban is kapható restriktív endonukleáz enzim felismerési szekvenciája csak egyszer fordul elő a molekulában (1. ábra). Az idegen DNS szakaszoknak az antibiotikum rezisztencia génbe történő illesztése, vagyis a sikeres klónozási lépés a megfelelő rezisztencia elvesztését eredményezi. Ez az ún. inzerciós inaktiválás, bár megkönnyíti a rekombináns klónok azonosítását, kissé nehézkes, mert replika technika alkalmazását követeli meg.

A klónozó vektorok fejlesztése során a következő szempontokat vették figyelembe:

A plazmid méretének csökkentése. Kisebb plazmidba nagyobb idegen DNS szakaszok építhetők be. A méretcsökkentés együtt járt az egyik, általában a  $tet^r$  gén eliminálásával.

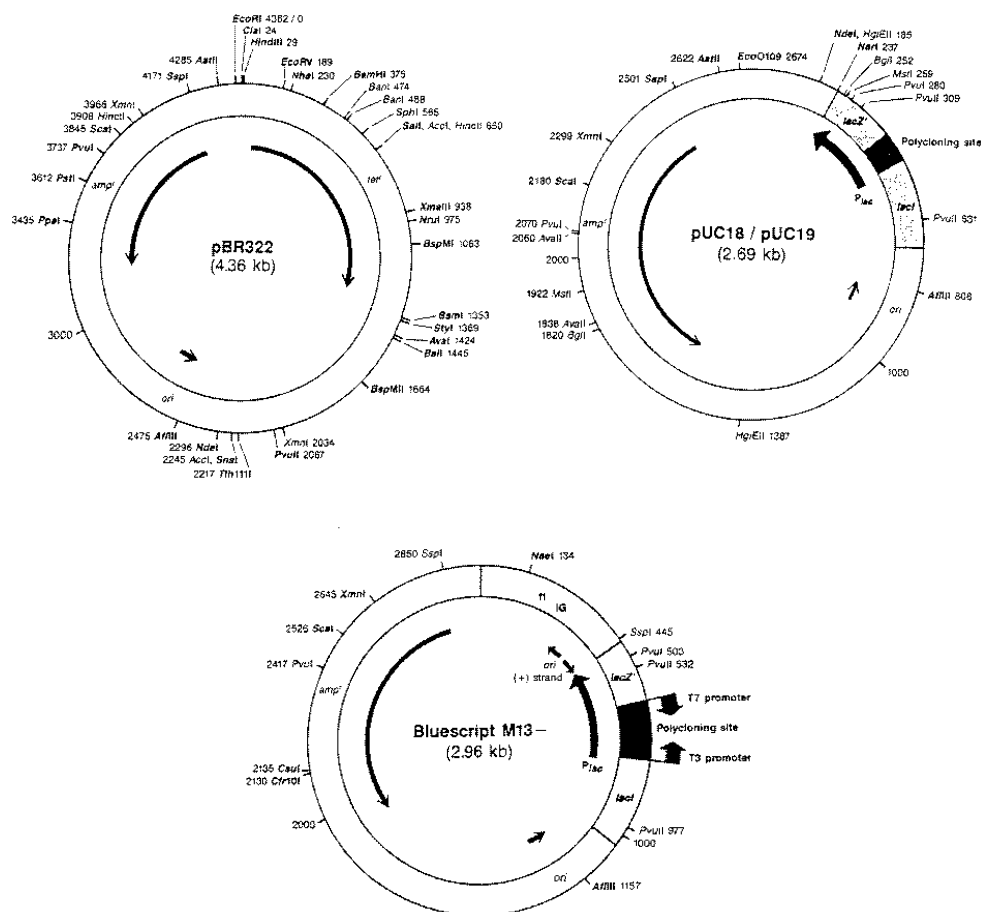
A kópiaszám növelése. A pMB1 replikon szekvenciájának módosításával a kópiaszám 500-700-ra növekedett (pl. pUC vektor család).

A felhasználható restriktív hasítási helyek számának növelése. Szintetikus oligonukleotid szakaszok, ún. polilinkerek vagy más néven poliklónozó helyek beépítésével egy rövid szekvencia szakaszra húsznál több különböző enzim felismerési helyét vitték be a legújabb típusú plazmidokba (Bluescript, pGEM).

Számos vektor tartalmaz virális RNS promóter szekvenciákat (a T3, T7, vagy az SP6 bakteriofágokból) a poliklónozó hely két oldalán. Ez az elrendezés lehetővé teszi, hogy a klónozott DNS szakasról *in vitro* RNS kópiát készítsünk.

Több új vektorba beépítették a filamentes fágok (M13) replikációs origóját, ami *in vivo* egyszálú DNS kópia termelését teszi lehetővé. Az egyszálú DNS szekvenáláshoz és irányított mutagenézishez használható fel.

A rekombináns kolóniák azonosítását nem inzerció inaktiválással végzik, hanem az ún. -komplementációs technikával. A vektor tartalmazza az *E. coli* lac operonjának egy szakaszát, ami az operátor régióból és a  $\beta$  galaktozidáz enzim első kb. száz aminosavát ( $\alpha$ -peptid) kódoló részből tevődik össze. Az enzimnek ez a szakasza, amelynek szintézisét izopropil-tio- $\beta$ -D-galaktoziddal (IPTG) indukálni lehet, képes a gazdasejt genomjában lévő, első száz aminosavától megfosztott  $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitásának intra-allélikus ( $\alpha$ -) komplementálására. A módosítatlan vektort tartalmazó baktériumok IPTG indukció hatására az enzim mindkét fragmentumát szintetizálják, ami azt eredményezi, hogy 5-bróm-4-klór-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid (X-gal) kromogén szubsztrát jelenlétében kék színű telepeket adnak. A vektorban a poliklónozó helyet az  $\alpha$ -peptidet kódoló régióba építették be. Idegen DNS szakasz bevitele elrontja az  $\alpha$ -peptidet kódoló részt, így megszünteti az  $\alpha$ -komplementációt. A rekombináns plazmidot tartalmazó telepek fehér kolóniákat adnak.



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

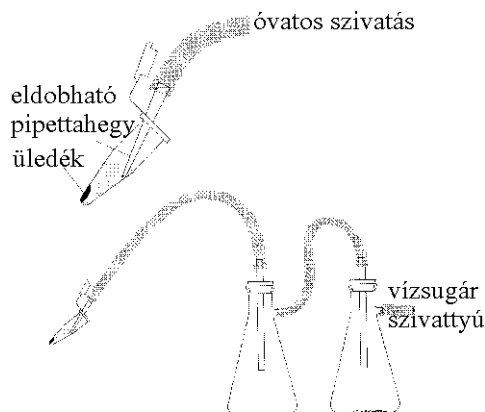
### A baktériumtenyészet növesztése

1. Steril fogpiszkáló segítségével oltsunk 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 szennyezést 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.

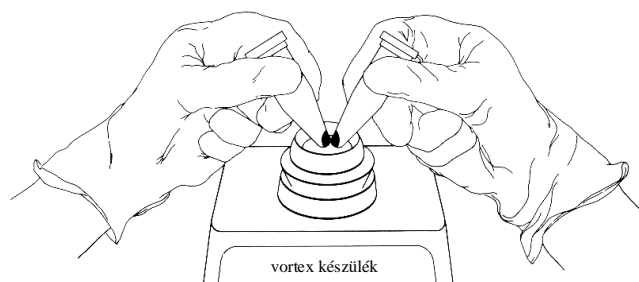
5. Adjunk minden csőhöz 100  $\mu$ l jéghideg I. oldatot.

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 tartjuk 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  $\mu$ 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 DNáz-mentes RNáz-t is tartalmaz a ribonukleinsavak lebontása céljából. A csövekre marker tollal írjuk fel a minta jelét, dátumot és monogramunkat. A feliratot cellulsszal 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 pipetázva, alaposan szuszpendáljuk fel a sejteket. Ügyeljünk rá, hogy ne maradjanak sejtsomók a szuszpenzióban, mert ezek nem tárnak majd fel a következő lépés során! Az MX1 oldat izotóniás, ebben a sejtek még nem tárnak 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, pipetázástól, ezek a fizikai hatások a genomiális DNS-t összetöredeliek és ezáltal a plazmid DNS preparátum kisméretű DNS-ekkel szennyeződik! Az MX2 oldat lúgos kémhatású Na-dodecilsulfát, 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 dodecilsulfát 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 pipetázzuk át a szilikáthalapú 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 enzimikus reakciókat.

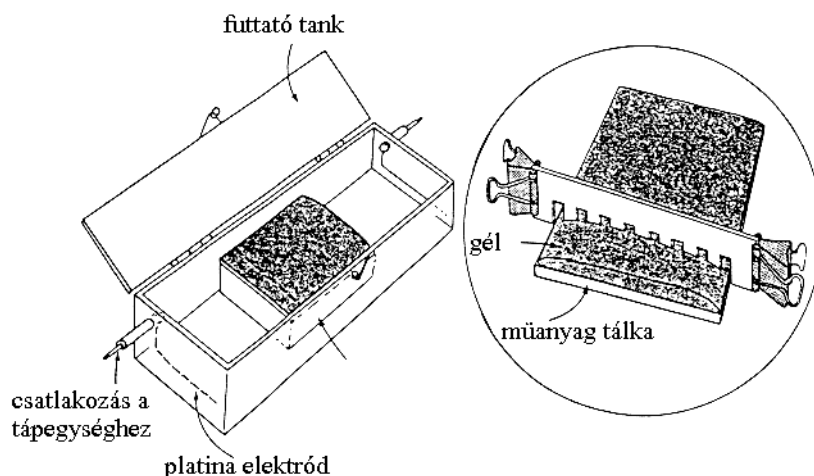
12. Helyezzük az oszlopot egy tiszta Eppendorf-csőbe, és a membrán közepére pipetázunk 50  $\mu$ l elúciós puffert (EB) vagy desztillált vizet, majd hagyjuk 2 percig állni a folyadékot az oszlopon. Alacsony ionerőn a DNS nem kötődik a szilikát - membránhoz, így arról lemosható. A plazmidot tartalmazó mintát centrifugáljuk le (2 perc 14000 fordulat/perc). A plazmid DNS-t a továbbiakban tároljuk jégen, illetve hosszútávon  $-20^{\circ}\text{C}$ -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. Mindkét festékre igaz, hogy DNS-sel alkotott komplexük UV fényel megvilágítva narancsszínű fényt kibocsájtva fluoreszkál, ez a DNS gélben való kimutatásának az alapja.

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 gélt a tálkából. A gélt helyezük az elektroforézis tankba, és töltjük fel a tankot 1× TAE pufferrel úgy, hogy a gél ellepje.

A plazmid mintákat kezeljük mintafelvívő pufferrel: mérjük mintánként 1 µl mintafelvívő puffert egy-egy Eppendorf csőbe, és ezt néhány fel-le pipettázással keverjük össze 3 µl 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 ártalmas, 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-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 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

#### Bevezetés

Az utolsó tíz évben nagyobb mennyiségű biológiai ismeret halmozódott fel, mint az elmúlt két és fél ezer év alatt összesen. Ez az újkeletű információ nagyobbrészt nukleinsav- és fehérjeszekvenciákat 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 aminosavszekvenciák analízisét jelenti, azonban sokkal szélesebb értelemben is használják. Az utóbbi definíció szerint 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 ~130 Gbp szekvenciát tartalmaz (2008 ősz), úgynevezett annotált fájlok formájában. Az annotáció a “nyers” szekvencia adatokhoz hozzárendelt információt jeleníti (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 már több mint kétszáz 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 ~500.000 annotált fájlban 170 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 (röntgenkrisztallográfia, 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 >50.000 röntgenkrisztallográfiai és >7000 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 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** publikációs adatbázis is, a biomedicina tárgykörébe tartozó (a biokémia, molekuláris biológia összes folyóiratát lefedő) 15 millió tudományos publikáció összefoglalója (és sok esetben a teljes közlemény is) ingyenesen hozzáférhető. A **Bookshelf** 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 transláció, 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. 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 temérdek hasznos oktatási segédanyag található.

Az *in silico* gyakorlat során több alkalmazásba fogunk „belekóstolni”, 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 „száraz laboratórium” feladat során egy keverékből kell kitisztítani egy adott fehérjét a **Proteins** szimulációs program segítségével. Bioinformatikai feladatként egyrészt ismeretlen nukleotidszekvenciákat kell az interneten elérhető programok és adatbázisok segítségével azonosítani és analizálni, másrészt egy fehérje térszerkezetét kell egy molekuláris grafikai program segítségével ábrázolni.

## 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 kromatográfias 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 fájlnek 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”). golyóspálcika

(„ball & stick”) vagy a szalagmodell („ribbon”, „cartoon”) is. A modellt színezzük 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 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.

Molekularészkek 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, 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)

### 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 kristallográfiás 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?

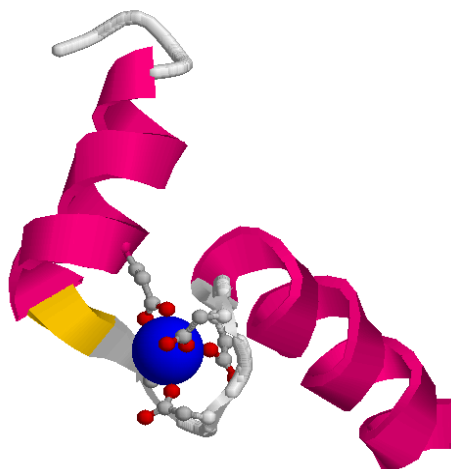
A fehérjék mozgékony részei, többnyire a terminális közeli aminosavak, gyakran hiányoznak a 3D-s szerkezetből, mert nem keletkezik róluk megfelelő szóráskép. Nézze át a pdb file-t! (notepad programmal megnyitható)

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. Színezzé 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.

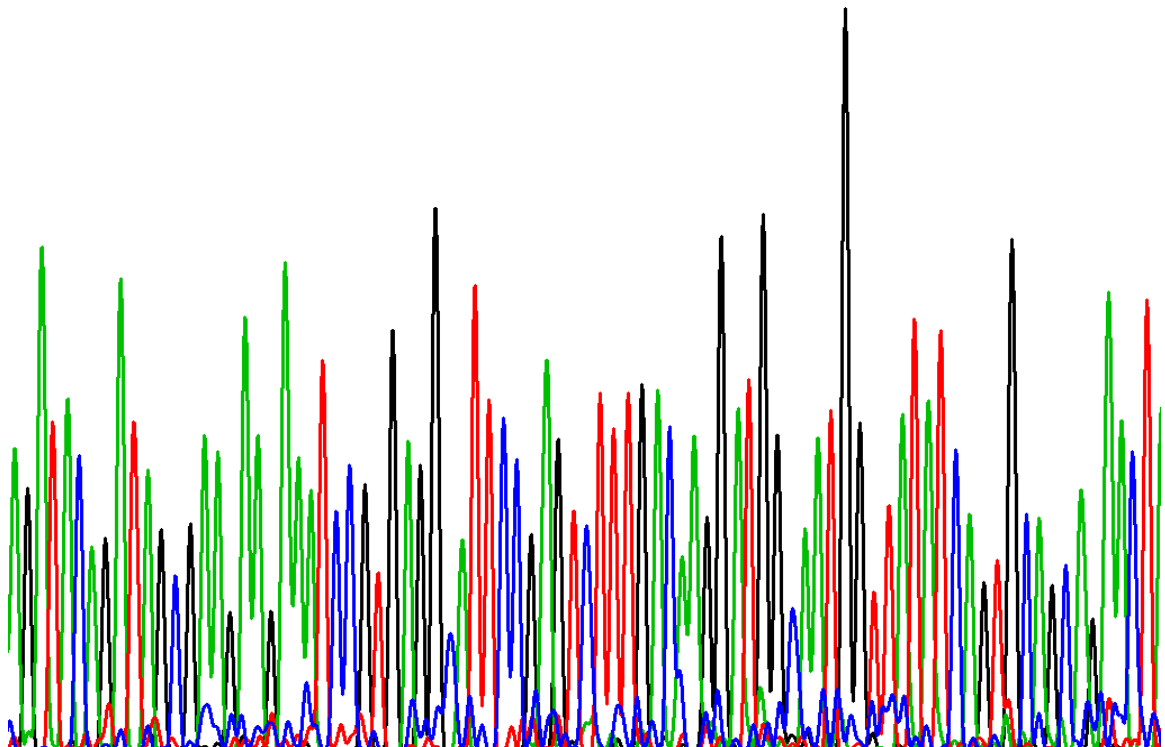




**Függelék:**  
**BIOINFO: bioinformatikai feladatok**

1. Olvasson el a DNS szekvenálási kromatogramokból kb. 40 bázisnyi szekvenciát, és azt használja a gén azonosítására a BLAST keresőprogrammal. Keresse meg a génterméket a SwissProt és a PDB adatbázisban is. Jellemezze röviden a szerkezetet.

130            140            150            160            170            180            190            200            210  
 A G A T A C G A G A T A G C G A A G A A G A A A T C C G T G A G G C A T T C C G A G T C T T T G A C A A G G A T G G C A A T G G T T A T A T C A G T G C A G C A G A A C T T



2. Azonosítsa egy cDNS szekvenciából kapott ORF (nyitott leolvasási keret) részlet alapján a gént. Melyik közös gyógyszer célfehérjéje a géntermék?

```
CAATTGTCATACGACTTGCAGTGAGCGTCAGGAGCACGTCCAGGAACTCCTCAGCAG
CGCTGTTACTATCCATGCCAGCACCAGGGCATCTGTGTCCGCTTCGGCCTTGACCGC
TACCAG
```

3. Az alábbi EST (“expressed sequence tag”, azaz rövid cDNS-szekvencia részlet egy géntermék valamelyik végéről) alapján azonosítsa a gén kódolta fehérjét. A gén melyik végét szekvenálták? Milyen téma foglalkoztathatja a kutatót, akitől a szekvencia származik?

```
GCTCCAGCAGCTGCAAGGCTCTGCTGC
```

4. A következő szekvencia is egy EST. Azonosítsa a génterméket. A cDNS melyik végét szekvenálták? Milyen motívumot (szignált) tartalmaz ez a szekvencia?

```
GTTTGGAAAGACTATCTTACTATTTTCAACAACAGCCTGACAACATTTCTATAGCCAAAA
ATAGCTAAATACCTCAATCAGTCTCAGAATGTCATTTTGGTACTTTGGTGGCCACAT
AAGCCATTATTCACTAGTATGACTAGTTGTGTCTGGCAGTTTATATTTAACTCTCTT
TATGTCTGTGGATTTTTTTCCTTCAAAGTTTAATAAAATTTATTTTCTTGGATTCCCTGA
TAATGTGCTTCTGTTATCAAACACCAACATAAAAATGATCTAAACC
```

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

```
GTCTCAAACGCGGCATCGAAAAGGCCGTGGAGAAGGTCACCGAGACCC
TGCTCAAGGGCGCCAAGGAGGTCGAGACCAAGGAGCAGATTGCGGCCA
CCGCAGCGATTTTCGGCGGGTGACCAGTCCATCGGTGAC
```

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

a. LSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAFL

b. EALREAHPIVEKILQYRE

6. 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
```

## 12. GYAKORLAT

### $\beta$ -glükózidáz preparálása levélből és aktivitásának mérése

#### A gyakorlat elvi alapja

A növényi  $\beta$ -glükózidáz sokféle  $\beta$ -glükózid hidrolízisét katalizálja. Szerepet játszhat a sejtfa vastagodásában a lignin bioszintézisben való részvétele alapján, a mikrobiális fertőzések által kiváltott védekező reakcióban, tartalék szénhidrátok mobilizálásában, hormonok koncentrációjának szabályozásában glükózil konjugátumaik hidrolízise révén stb.

Az általunk használt szintetikus szubsztrát (p-nitrofenil  $\beta$ -D-glükózid) hasadása során glükóz és p-nitrofenol szabadul fel. A p-nitrofenolnak 410 nm-en elnyelési maximuma van, így ezen a hullámhosszon követjük a reakció előrehaladását.

#### A gyakorlat kivitelezése

##### Anyagok, eszközök

búzalevél

polivinil-pirrolidon

50mM citrát puffer pH 5.0

4,31 g citromsav és 8,68 g  $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$  1000 ml-ben

200mM p-nitrofenil  $\beta$ -D-glükózid N,N-dimetilformamidban oldva (PNPG)

a p-nitrofenol moláris extinkciós együtthatója 410 nm-en:  $\epsilon_{410} = 17500 M^{-1} s^{-1}$

25 mM glükono-d-lakton 50 mM citrát pufferben oldva

100mM  $Na_2CO_3$

2mM, 20mM és 40mM-os PNPG

mérleg

dörzsoszár

centrifuga

37°C-os termosztát

spektrofotométer

##### A mérés menete

1 w/v% polivinil-pirrolidon oldatot készítünk 10 ml citrát pufferben, majd dörzsoszárban elhomogenizálunk benne 0,5 g búzalevelet. A homogenizátummal megtöltünk két Eppendorf-csövet, majd 5 percig centrifugáljuk. A tiszta felülúszót pipettával óvatosan leszívjuk, átviszük, kétszeresére hígítjuk citrát pufferrel egy tiszta kémcsőbe és jégre helyezzük. A továbbiakban ezzel az enzimpreparátummal dolgozunk.

A mérésekhez a szükséges számú Eppendorf-csövet megszámozzuk. A reakcióelegy komponenseit a megadott sorrendben a csövekbe pipettázzuk, a szubsztrát vagy az enzim extraktum kivételével. A reakciót ezek hozzáadásával

indítjuk, gyors keverés után a csöveket 37°C-on inkubáljuk. 15 perc után a reakciót 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hozzáadásával állítjuk le.

A kifejlődő sárga színt 410 nm-en fotometráljuk. Mivel maga az enzimpreparátum is jelentős elnyelést mutat ezen a hullámhosszon, a mérésekhez a szubsztrátot nem, csak az adott mennyiségű enzimpreparátumot tartalmazó kontrollokat is készítünk. A minták abszorbanciájából a kontrollnak megfelelő értéket rendre levonjuk. A 15 perc alatt bekövetkezett abszorbancia változásból — vagyis a görbe meredekségéből — a termék moláris extinkciós koefficiense segítségével kiszámítjuk a reakciók kezdeti sebességét (μM/min egységben).

### 1.) A reakciósebesség függése az enzim koncentrációjától

Mivel az öt mintában különböző az enzimpreparátum mennyisége, mindegyikhez külön referenciát készítünk: 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:

	1.	2.	3.	4.	5.
citrát puffer	50 μl	40 μl	30 μl	20 μl	-
enzim (extraktum)	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 (extraktum)	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.

**Feladat: Ábrázoljuk a kezdeti sebességet (μM/min egységben) a bemért enzimpreparátum térfogatának (μl) 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  $\beta$ -glükozidáz 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.
citrát puffer	90 $\mu$ l	75 $\mu$ l	60 $\mu$ l	80 $\mu$ l	70 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l
2 mM PNPG	-	15 $\mu$ l	30 $\mu$ l	-	-	-	-
20 mM PNPG	-	-	-	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	-
40 mM PNPG	-	-	-	-	-	-	30 $\mu$ l
enzim (extraktum)	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l

15 perc után a reakciót 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  hozzáadásával állítjuk le.

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

## 3.) Inhibíció 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.
citrát puffer	70 $\mu$ l	55 $\mu$ l	40 $\mu$ l	60 $\mu$ l	50 $\mu$ l	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l
25 mM glükono-d-lakton	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
2 mM PNPG	-	15 $\mu$ l	30 $\mu$ l	-	-	-	-
20 mM PNPG	-	-	-	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	-
40 mM PNPG	-	-	-	-	-	-	30 $\mu$ l
enzim (extraktum)	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l

15 perc után a reakciót 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  hozzáadásával állítjuk le.

**Feladat:** Ábrázoljuk az inhibitor jelenlétében és hiányában mért kísérletek eredményeit közös grafikonon: ábrázoljuk a kezdeti sebességet ( $\mu\text{M}/\text{min}$  egységben) a szubsztrát koncentráció ( $\mu\text{M}$ ) függvényében, majd készítsük el a kettős reciprok ábrázolást is! A grafikonok segítségével határozzuk meg a gátlás típusát és a glükono-d-lakton  $K_I$  értékét!

## 13. GYAKORLAT

### Oxidoreduktáz reakciók kimutatása

#### Dehidrogenázok kimutatása néhány citrát ciklus intermedier felhasználásával.

A citrát ciklus közös útvonala a tápanyagok 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 3 NADH, a borostyánkősav dehidrogenáz aktivitása során pedig FADH<sub>2</sub> keletkezik. A redukált koenzimek visszaoxidálása a csatlakozó elektrontranszport láncon keresztül történik.

A dehidrogenázok aktivitásának kimutatását feltárt élesztő szuszpenzió végezzük, ami természetesen tartalmazni fogja a citrát ciklus enzimeit és az elektrontranszport lánc komponenseit. Amennyiben a vizsgált mintákban gátoljuk az oxigén bejutását és az elektrontranszport láncot egy redukálható festékkel kiegészítjük, akkor oxidálható szubsztrát jelenlétében a dehidrogenázok által termelt redukált koenzimek visszaoxidálása során az O<sub>2</sub> helyett a redox festék lesz az elektron akceptor, a festék redukálódik és elszíntelenedik. Kimutatták, hogy a gyakorlat során használt redox festék a metilénkék a citokrom b és a citokrom c között működik elektron akceptorként, így oxigén távollétében a citokrom c<sub>1</sub>, citokrom c és a citokrom (a+a<sub>3</sub>) redukált állapotba kerül, ezért a NADH és a FADH<sub>2</sub> visszaoxidációja csak addig zajlik, míg van jelen redukálható metilénkék. A gyakorlat során borostyánkősav szubsztrát esetén a borostyánkősav malonát gátlását is megfigyelhetjük.

**Átnézendő tananyag:** citrát ciklus, terminális oxidáció, enzimek gátlása; kompetitív gátlás.

#### A gyakorlat kivitelezése

##### Anyagok és eszközök

pékélesztő  
Na-foszfát puffer 0,06 M  
citrát 0,04 M  
malát 0,04 M  
malonát 0,1 M  
szukcinát 0,04 M  
metilénkék 0,01 %  
kvarchomok  
dörzsoszár, vegyszerkanál, centrifuga, kémcsövek

##### A gyakorlat menete

10g élesztőt 30 ml 0,06 M Na-foszfát (pH 6) oldatban szuszpendálunk, rövid keverés után 3000 rpm-el centrifugáljuk, majd a műveletet megismételjük. A második centrifugálás után sejteket átkaparjuk egy dörzsoszárba és hidegen egy kis kanál kvarchomokkal eldörzsöljük, majd 10 ml foszfát pufferrel elkeverjük és a homokról a

feltárt sejtszuspenziót dekantáljuk. Ezt a preparátumot használjuk a dehidrogenáz aktivitás kimutatására.

Ezután az alábbi táblázat szerint összemérjük a vizsgálandó reakció elegyeket.

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

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 citrát ciklusra, és a terminális oxidációra vonatkozó ismereteink segítségével az elszíntelenedések idejében tapasztalt különbséget.**

## 14. GYAKORLAT

### Koleszterin és foszfatidilkolin izolálása tojássárgájából és elválasztásuk vékonyréteg-kromatográfiával

#### A gyakorlat elvi alapja

##### A vékonyréteg kromatográfia

A vékonyréteg-kromatográfia (TLC-Thin Layer Chromatography) egyszerű, gyors és olcsó módszer szerves komponensek elválasztására, kvalitatív vagy félkvantitatív analízisére. Az elválasztás alapja, mint minden kromatográfiás eljárásnál, az álló és mozgó fázis közötti megoszlás.

A vékonyréteg-kromatográfia a síkkromatográfiás eljárásokhoz tartozik, vagyis az elválasztás egy vékony állófázison keresztül valósul meg.

A vékony-réteg kromatográfia állófázisa különböző anyagokból készülhet, leggyakrabban szilikagélt, alumínium-oxidot vagy cellulózt alkalmaznak. A mozgó fázis olyan oldószer-keverék, amelyben a szeparálni kívánt minta komponensei jól oldódnak.

A gyakorlaton szilikagél vékonyréteglapokat használunk. A szilikagél 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 szilikagéltre felvitt minta komponensei eltérő erősséggel kötődnek a gélhez, valamint az eluensben (oldószerben) való oldhatóságuk is különbözik. Ahogy az oldószer halad a vékonyréteglapon, a kölcsönhatások eredője meghatározza, hogy meddig vándorol a minta adott komponense.

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

$$R_f = \frac{\text{Az anyag vándorlási távolsága a starttól}}{\text{Az oldószerfront vándorlási távolsága a starttól}}$$

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

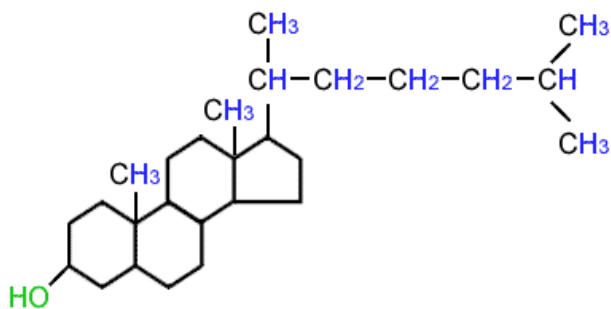
A lipidek vízzel nem oldható biomolekulák, amelyek azonban szerves oldószerben jól oldódnak. Szerepük a biológiai folyamatokban sokrétű: üzemanyagként szolgálnak, energiát raktároznak, a jelátviteli folyamatokban és a membránok alkotóiként egyaránt megtaláljuk őket.

##### 1. Koleszterin

A koleszterin a gerincesek minden szövetében – mintegy 0,05-5%-nyi mennyiségben – megtalálható, ciklopentanoperhidrofenantrén-vázatot tartalmazó, 27 szénatomból álló vegyület. C. Chevreul 1815-ben különítette el az epekből, melynek

fő alkotóeleme, Diels és Vieland kutatásainak eredményeképpen pedig a konstitúciója is ismertté vált 1932-ben.

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

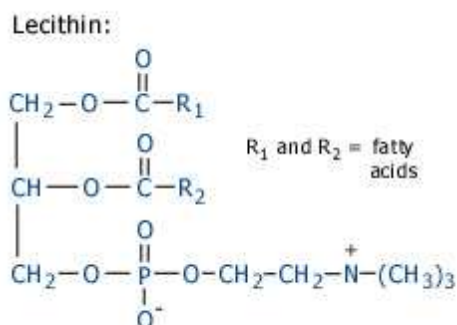


A szervezet egyik legellentmondásosabb molekulája, hiszen egyrészt nélkülözhetetlen életfontosságú funkciók ellátásához (membránok fluiditásának szabályozása, szteroidhormonok szintézise, epesavak szintézise), másrészt viszont ha a normálnál nagyobb mennyiségben van jelen, akkor a szívinfarktus és az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

A koleszterin egy része a táplálékkal jut a szervezetbe, másik része *de novo* szintézis útján keletkezik. A szintézis kiemelt helyei a máj, a mellékvese, a petefészek és a herék, ahol a koleszterinből más anyagok szintetizálódnak, így nagy mennyiségre van szükség.

## 2. Foszfatidilkolin (lecitin)

A lecitin a foszfolipidekhez tartozó vegyület. A foszfolipidek (vagy foszfátidok) nagy része glicerinszármazék (foszfogliceridek), ahol az 1-es helyzetű hidroxilcsoportot általában telített zsírsav, a 2-es helyzetű hidroxilcsoportot pedig egy egyszeresen vagy többszörösen telítetlen karbonsav (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 foszfátidilkolin név.)



Ahogy a foszfolipidek általában, a lecitin is struktúr lipid, amelyek legnagyobb része a membránok alkotásában vesz részt. Legfontosabb tulajdonságuk, hogy a molekulán belül apoláris és poláris részeket különíthetünk el (amfipatikus sajátság).

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

## A gyakorlat menete

### Anyagok, eszközök

4-szeresére hígított tojássárgája oldat

1% NaCl oldat

metanol

kloroform

ecetsav

Merck Silica Gel 60 vékonyréteglap

20% ammónium-szulfát

pipetták, centrifugacsövek, centrifuga, főzőpohár, celofán, grafitceruza, 50ml mérőhenger

### 1.) A lipidek izolálása

- A tojássárgájában nagy mennyiségben található koleszterin és lecitin, amelyek szerves oldószerekkel egyszerűen izolálhatók.
- 160 µl tojássárgája oldathoz adunk 600 µl 2:1 arányú metanol-kloroform elegyet.
- Az oldatot összerázzuk, majd 2500 rpm-el 4 percig centrifugáljuk. A centrifugálás után a felülúszót egy új csőbe átpipettázzuk.
- A felülúszóhoz hozzáadunk 200 µl 1% NaCl-ot és 200 µl kloroformot. Összerázzuk, majd megint centrifugáljuk 2500 rpm-mel 4 percig.
- Az alsó fázist kipipettázzuk, és ebből kromatografálunk.
- A kromatográfiához kontrollként 2%-os szójalecitin és 1%-os koleszterin oldatot (mindkettő diklór-metánban) használunk.

### 2.) Az izolált lipidek elválasztása

#### *A vékonyréteglapok előkészítése, mintafelvétel*

- A vékonyréteglapokat gyakran aktiválni kell felhasználás előtt. Ez annyit jelent, hogy éjszakán át 110-130 Celsius fokos kemencében szárítjuk a lapokat. Ily módon az esetlegesen megkötött víz távozik, a víztartalom csökkenésével pedig a szilikagél aktivitása megnő. A gyakorlaton előkészített, légszáraz lapokkal dolgozunk.
- A vékonyréteglapokat méretre kell vágni. A megfelelő méret kiválasztása sok tényező függvénye, 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!
- A méretre vágott lapokon tompa grafitceruzával bejelöljük a startot, valamint a minták helyét és számát. Figyejünk oda, hogy a szilikagélt ne sértsük meg a ceruzával! A startvonalat a lap aljától 1 cm-re rajzoljuk, a minták a lap oldalától és egymástól is 1-1 cm-re legyenek!
- A szilikagéltre a mintákat cseppentéssel visszük fel. Az izolátumból és az ismert oldatokból is **5-5µl-t** vigyünk fel. A felvitelhez automata pipettát használunk.

### A kromatogram kifejlesztése (futtatás)

- Az oldószer (eluens) kiválasztása: az alkalmazott oldószert az elválasztandó anyagok függvényében választjuk ki, a polárisabb anyagokhoz polárisabb oldószert kell választani. A gyakorlaton kloroform/metanol/ecetsav 65:25:10 v/v% -os elegyét alkalmazzuk. A futtató elegyből 50 ml-t kell készíteni.
- Futtató kádiként légmentesen zárható üveget használunk, amelyet a kromatogram kifejlesztése alatt zárva tartunk. Ilyen módon az üvegben a levegő **telített**, egyensúlyban van az oldószer gőzeivel. (Lehet használni ún, telítetlen kádakat is, ebben az esetben azonban nehezebb a mérést reprodukálni.)
- A mintákat tartalmazó, száraz vékonyréteglapot belehelyezzük a csavaros üvegbe. (Ügyeljünk rá, hogy ekkor az eluens ne lépje el a startvonalat.) A majd bezárjuk az üveget, és megfigyeljük, hogy a kapilláris erő hatására az oldószer elindul a lap teteje irányába.
- A futtatást addig végezzük, amíg az oldószer frontja a lap tetejétől 1 cm távolságra nem ér. Ekkor kivesszük, és hagyjuk megszáradni.

### Előhívás, detektálás

- UV-lámpa  
A legegyszerűbb detektálási mód. Bizonyos vegyületek fluoreszkálnak, azaz energiát képesek abszorbeálni, 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 vékonyréteglapon színes foltokat ad.
- Kénsavas vagy ammónium-szulfátos előhívás  
Gyakran alkalmazott, egyszerű detektálási mód, az érzékenysége azonban kicsi. A szerves vegyületek roncsolásán alapszik a módszer, hatására sötétbarna foltokként jelennek meg a vegyületek.

A gyakorlaton **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 fokos szárítószekrénybe tesszük, és addig hevítjük, amíg a foltok meg nem jelennek.

### Feladatok:

- Készítsen rajzot a kromatogramról, jelölje rajta a különböző anyagokat!**
- Az elválasztott komponensek milyen R<sub>f</sub> értékkel rendelkeznek?**
- A kromatográfiás viselkedés alapján milyen következtetést lehet levonni a lecitin és a koleszterin kémiai tulajdonságairól?**