

Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet

**dr Hegyi György
dr Kardos József
dr Kovács Mihály
dr Málnási-Czizmadia András
Micsonai András
dr Nyitray László
dr Pál Gábor
dr Radnai László
dr Reményi Attila
dr Venekei István**

Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet

írta dr Hegyi György, dr Kardos József, dr Kovács Mihály, dr Málnási-Czizmadia András, Micsonai András, dr Nyitrai László, dr Pál Gábor, dr Radnai László, dr Reményi Attila, és dr Venekei István
Szerzői jog © 2013 Eötvös Loránd Tudományegyetem

E könyv kutatási és oktatási célokra szabadon használható. Bármilyen formában való sokszorosítása a jogtulajdonos írásos engedélyéhez kötött.

Készült a TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0073 számú, „E-learning természettudományos tartalomfejlesztés az ELTE TTK-n” című projekt keretében. Konzorciumvezető: Eötvös Loránd Tudományegyetem, konzorciumi tagok: ELTE TTK Hallgatói Alapítvány, ITStudy Hungary Számítástechnikai Oktató- és Kutatóközpont Kft.

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



Tartalom

ELŐSZÓ	vi
1. Biokémiai és molekuláris biológiai eszközök	1
1.1. Biológiai eredetű minták és vegyszerek a laboratóriumban	1
1.2. Folyadékok tárolására szolgáló műanyag és üvegcsövek	1
1.3. Főzőpocharak és lombikok	4
1.4. Folyadékok térfogatának mérése: mérőhengerek és automata pipetták	5
1.5. Folyadékok keverése	9
1.6. Tömegmérés	9
1.7. Víz tisztítás; oldatok, eszközök sterilizálása	10
1.8. Sejtenyészetekkel végzett munka	12
1.9. Centrifugák	13
1.10. Egyéb, gyakorlati technikák: spektrofotométer, elektroforézis, kromatográfia	16
1.11. Biológiai minták tárolása	18
2. Mértékegységek és oldatok	21
2.1. A mértékegységekről	21
2.2. A mennyiségek számszerű kifejezési módjai	22
2.2.1. Az adatok pontossága – értékes (szignifikáns) számok	22
2.2.2. Nagy és kis mennyiségek kifejezési módjai: hatványkitevős és prefixum formák	22
2.3. Az oldatokról	23
2.3.1. Az oldatok meghatározása és főbb formái	23
2.3.2. Az oldatok mennyiségi leírása – koncentráció egységek	23
2.3.3. Oldatok készítése	24
2.4. Dialízis	25
2.4.1. A dialízis elve	25
2.4.2. A dialízis gyakorlati vonatkozásai és alkalmazása	26
3. Ionizációs egyensúlyok	28
3.1. Savak és bázisok ionizációs egyensúlya vizes oldatokban	28
3.2. A pH-t stabilizáló sav bázis rendszerek (pufferek) és a pH hatása az ionizációra	31
3.3. A pH mérése	34
3.4. Megértést tesztelő feladatok	34
3.5. pI és töltés számítási gyakorlatok	35
4. Spektrofotometria, fehérjekoncentráció mérése	41
4.1. Fotometria	41
4.2. Az UV-VIS fotométer	42
4.3. A fotometria egyéb alkalmazási lehetőségei	43
4.4. A fotometria során leggyakrabban felmerülő problémák	44
4.5. Fehérjekoncentráció meghatározása	44
4.6. A spektrofotometria gyakorlata	45
4.7. Fluorimetria	49
4.7.1. A fluoreszcencia fizikai alapja	49
4.7.2. A fluorimetria biokémiai és molekuláris biológiai alkalmazásai.	51
5. Sejtek feltárása és fehérjék izolálása	54
5.1. A sejtek feltárása	54
5.2. Sejtfractionálás	54
5.3. A centrifugálás	55
5.3.1. Differenciál centrifugálás - sejtfractionálás döntően részecske méret alapján	57
5.3.2. Sűrűség-gradiens centrifugálás - sejtfractionálás részecske sűrűség alapján	58
5.4. Fehérjék durva fractionálása	59
5.4.1. Oldhatóságon alapuló módszerek	60
5.4.2. Részecskeméreten alapuló módszerek	63
6. Kromatográfiai módszerek	64
6.1. Gél-sűrűségi kromatográfia	67
6.2. Ioncsere kromatográfia	70
6.3. Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia	72
6.4. Affinitás kromatográfia	74

6.5. Nagyhatékonyságú (nagynyomású) folyadékkromatográfia, HPLC	76
7. Elektroforézis technikák	80
7.1. Az elektroforézisről általában	80
7.2. A gélelektroforetikus technikákról általában	81
7.3. A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	82
7.3.1. A PAGE módszerről általában	82
7.3.2. Natív PAGE	85
7.3.3. SDS PAGE	85
7.3.4. Izoelektromos fókuszálás	87
7.3.5. Kétdimenziós (2D) elektroforézis	89
7.4. Az agaróz gélelektroforézis	90
7.5. Festési eljárások	91
7.5.1. Általános fehérjefestékek	91
7.5.2. Általános DNS-festékek	91
7.5.3. Specifikus fehérje-kimutatási eljárások	91
7.6. A fehérjeelválasztó gélelektroforézis technikák néhány jellegzetes példája	93
7.6.1. Natív PAGE - Tejsav-dehidrogenáz izoenzimek elválasztása és kimutatása	93
7.6.2. Miofibrilláris fehérjék molekulatömegének meghatározása SDS PAGE módszerrel	95
8. Fehérje-ligandum kölcsönhatások	97
8.1. Biomolekulák kölcsönhatásai	97
8.2. Reakciókinetika	97
8.3. A fehérje-ligandum kölcsönhatás	98
8.4. Összefüggés a szabadentalpia-változás és az egyensúlyi állandó között	99
8.5. A ligandumkötést stabilizáló erők	100
8.6. A kötési állandó meghatározása	102
8.7. Módszerek a kötési állandó kísérleti meghatározására	105
8.7.1. A felszíni plazmon rezonancia	106
8.7.2. Az izotermális titráló kalorimetria (ITC)	108
8.7.3. Fehérje-ligandum kötés mérése fluoreszcencia depolarizáció módszerével	109
8.8. Ellenőrző kérdések, feladatok	110
9. Enzimkinetika	111
9.1. Az enzimkatalízis termodinamikai értelmezése	111
9.2. A Michaelis-Menten kinetika	115
9.3. A kezdeti sebesség értékek és a fő kinetikai paraméterek meghatározása	122
9.4. Enzimgátlási típusok	125
9.4.1. Kompetitív gátlás	126
9.4.2. Unkompetitív gátlás	128
9.4.3. Vegyes típusú gátlás	129
10. Géntechnológia	131
10.1. Rekombináns DNS technikák (géntechnológia) és molekuláris klónozás	131
10.2. Plazmid vektorok	131
10.3. Rekombináns DNS-konstrukciók elkészítése	133
10.4. A rekombináns DNS sejtbe juttatása és a rekombináns kolóniák azonosítása	135
10.5. Plazmid DNS izolálása	137
10.6. Plazmid DNS analízise agaróz gélelektroforézissel	139
10.7. Polimeráz láncreakció (PCR)	142
10.8. Irányított in vitro mutagenézis	145
10.9. DNS-szekvenálás	148
11. Bioinformatika	154
11.1. Bevezetés	154
11.2. Szekvencia és térszerkezeti adatbázisok	154
11.2.1. Genbank	155
11.2.2. UniProt	158
11.2.3. Protein Data Bank (PDB)	160
11.3. Bevezetés a szekvenciák bioinformatikai analízisébe	161
11.3.1. Bioinformatikai feladatok a molekuláris klónozás során	161
11.3.2. Hasonlóságvizsgálat és szekvencia-illesztés	161
11.3.3. Fehérjeszekvenciák analízise	163

11.4. Fehérjék térszerkezetének molekuláris grafikai ábrázolása	164
11.4.1. RasMol	164
11.4.2. PyMOL	166
11.4.3. Jmol	168
12. Számolási és problémamegoldó feladatok	169
12.1. Megoldások	185
13. Utószó	192
Irodalomjegyzék	195

ELŐSZÓ

A „Bevezetés a biokémiába” gyakorlati jegyzet a biokémia módszertanának alapszintű megismertetésére szolgáló elektronikus tananyag, amely elsődlegesen az Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Karán folyó biológus alapképzés tantervében szereplő „Bevezetés a biokémiába” című szemináriumi gyakorlat hallgatói számára készült, de bármely elméleti és gyakorlati biokémiai tárgyú kurzus diákjai számára tartalmaz hasznos információkat. A tananyag feltételezi az általános kémiai, fizikai kémiai és szerves kémiai elméleti illetve számítási gyakorlati ismereteket, és a „Bevezetés a biokémiába” (vagy más alapszintű biokémiai) elméleti kurzus anyagának korábbi elsajátítását. A „Bevezetés a biokémiába” és a „Biokémia és molekuláris biológia” tárgy tananyagának nagy része elektronikus jegyzet formájában itt olvasható.

A „Bevezetés a biokémiába” című szemináriumi gyakorlat előkészíti a későbbi biokémiai előadások jobb megértését, s elengedhetetlen a későbbi laboratóriumi gyakorlatok sikeres elvégzéséhez. A szemináriumi gyakorlat a klasszikus szemináriumok és a gyakorlati foglalkozások ötvözéséből született oktatási „műfaj”, amely a kísérleti munka módszertanát bemutató előadásokból illetve számolási és problémamegoldó feladatok ismertetéséből és gyakorlásából áll. A szemináriumi gyakorlatokon az oktatók a biokémia és a molekuláris biológia műveléséhez szükséges alapvető módszerek elméleti hátterét ismertetik röviden, a módszereket és az ezekhez szükséges műszerek, eszközök egy részét demonstráció formájában mutatják be. Az oktatási tananyag összeállítása során különös hangsúlyt kapott, hogy a hallgatók a mindennapos biokémiai laboratóriumi élethelyzetekkel szembesüljenek. A problémák és számolási feladatok megoldása a hallgatók egymás közötti illetve az oktatóval való együttműködésére épít.

Hangsúlyozzuk, hogy az e-jegyzet nem a gyakorlatok „recept szintű” leírását tartalmazza. A jegyzet szerzői kollektívájának meggyőződése – amit több éves tapasztalataink megerősítenek –, hogy a későbbi laboratóriumi munka hatékonyságát nagymértékben növeli az itt bemutatott ismeretanyag szemináriumi formában történő oktatása, a módszertan hátterének még a gyakorlati alkalmazás előtti megismerése, és legfőképpen a biokémiai laboratóriumban előforduló kvantitatív szemléletmód példafeladatok megoldásán keresztül történő gyakorlása. Az e-jegyzet tananyaga egy félévben, 3 órás szemináriumi gyakorlatokat feltételezve teljes egészében ismertethető a biokémiai alapképzésben. Az anyag nem tér ki az összes makromolekula családra, hanem a fehérjék és a nukleinsavak vizsgálatára alkalmazott módszerekre, a molekuláris biológia módszertani hátterére koncentrálnak (a szénhidrátok és a lipidek vizsgálati módszereinek ismertetése részben a szerves kémia tárgykörébe tartozik, részben röviden az elméleti kurzus és az elméleti elektronikus jegyzet tárgyalja).

A biokémia és molekuláris biológia nagyon széleskörű módszertani arzenáljából az e-jegyzet fejezetei pontokba szedve az alábbi területeket érintik illetve az alábbi területekre vonatkozó ismeretek átadását tűzte ki célul a szerzőgárda:

- Biokémiai és molekuláris biológiai eszközök bemutatása.
- A biokémiai gyakorlatban használt mennyiségek, mértékegységek megtanítása.
- Makromolekulák (fehérje, DNS) koncentrációjának meghatározáshoz szükséges eljárások ismertetése.
- Makromolekulák előállításához és tisztításához szükséges eljárások bemutatása.
- Fehérje-ligandum kölcsönhatásokhoz és enzimkinetikai paraméterek méréséhez szükséges módszerek tárgyalása és a kísérletek tervezése.
- Molekuláris biológiai kísérletek kivitelezéséhez szükséges rekombináns DNS technológián alapuló eljárások gyakorlatorientált bemutatása.
- Molekuláris biológiai kísérletek tervezéséhez szükséges bioinformatikai adatbázisok és szoftverek bemutatása.
- Biokémiai és molekuláris biológiai kísérletek kivitelezéséhez szükséges, a gyakorlatban is megvalósítható kísérleti terv létrehozására alkalmas ismeretek átadása.
- Az ismertett területeken felmerülő kvantitatív problémák, számolási feladatok ismertetése, gyakorlása
- Az e-jegyzet ismeretanyagának elsajátítása és a szemináriumi gyakorlat sikeres elvégzése után a hallgatók képesek lesznek biokémiai laboratóriumi munkára és az alábbi feladatok kivitelezésére:
- Biokémiai kísérletek előkészítéséhez szükséges számítások elvégzésére (pl. pufferek elkészítése, koncentráció és ionizációs fok kiszámítása).
- Alapvető biokémiai kísérletek megtervezésére (pl. makromolekulák tisztításához szükséges eljárások kidolgozása, enzimkinetikai mérések megtervezése).
- Különböző kísérletes eljárásokhoz kapcsolódó gyakorlati nehézségek felismerésére (pl. hibaforrások azonosítása).
- A biokémiai laboratóriumi gyakorlathoz kapcsolódó szaknyelv megfelelő használatára.
- Molekuláris biológiai, bioinformatikai adatbázisok alapszintű használatára.

- Alapszintű rekombináns DNS technológiai eljárások tervezésére (pl. plazmid DNS izolálása, egy fehérje cDNS-ből történő előállítás).

Szerkezetileg a jegyzet tizenegy módszertani fejezetre és az azt követő számolási és problémamegoldó példafeladatokat tartalmazó fejezetre tagolódik.

A szerzők

Budapest, 2013. május 22.

1. fejezet - Biokémiai és molekuláris biológiai eszközök

szerző: Radnai László

A biokémiai és molekuláris biológiai kutatások célja az élőlényekben lezajló, az életjelenségek alapját képező kémiai folyamatok feltérképezése, az ezekben résztvevő molekulák azonosítása, szerkezetük, szerepük, kölcsönhatásaik megismerése, továbbá az élethez szükséges anyag-, információ-, és energiaáramlás molekuláris hátterének feltárása. Ezen célok komplexitásához és sokrétűségéhez mérten számos különböző laboratóriumi eszköz, mérőműszer, berendezés, illetve módszer áll rendelkezésünkre, melyek használatával feltett kérdéseinkre választ kaphatunk. E fejezet célja a biokémiai és molekuláris biológiai laborgyakorlatban használatos leggyakoribb eszközök bemutatása, illetve – ehhez szorosan kapcsolódóan – a biológiai minták, illetve egyéb, a kutatásokhoz szükséges vegyszerek helyes kezelésének és tárolásának ismertetése.

1.1. Biológiai eredetű minták és vegyszerek a laboratóriumban

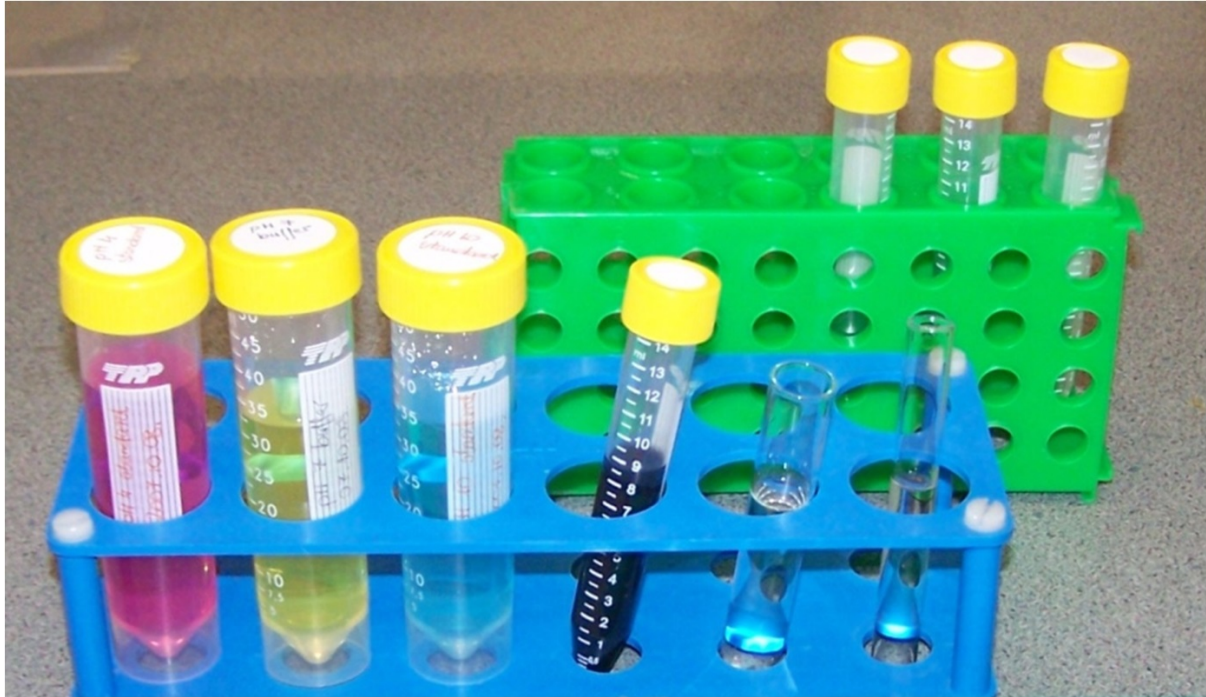
A „minta”, amellyel dolgozunk, valamilyen élőlényből származó szövet-, vagy sejtminta, esetleg mesterséges körülmények között tenyésztett sejtömeg, az ezekből készült homogenizátum, vagy „kivonat”, ill. az ezekből izolált, bizonyos mértékben tisztított komponens (fehérje, nukleinsav, stb.) lehet. Mivel az élet közege a víz, így mintánk az esetek jelentős hányadában egy vagy többkomponensű vizes oldat, kolloidális rendszer, vagy szuszpenzió (pl. baktériumsejtek a tenyésztésükre használt médiumban). Méréseink legtöbbször szintén vizes közegben történik. Az elmondottakat figyelembe véve nem meglepő, hogy számos olyan eszközzel fogunk megismerkedni, melyek folyadékok kezelését, tárolását, térfogatának mérését teszi lehetővé. Természetesen gyakran végzünk munkát szilárd anyagokkal, főként különböző kereskedelmi forgalomban megvásárolható vegyszerekkel, vagy szintetikus biomolekulákkal (peptidek, oligonukleotidok), ám ezeket majdnem minden esetben oldott állapotban használjuk fel kísérleteink során. A két legfontosabb gyakorlati ismeret ez esetben tehát az oldat elkészítésének módja, illetve az ehhez szükséges tömeg pontos kimérése. Gáz halmazállapotú anyagokkal ritkán végzünk munkát; ezeket tárolhatjuk palackozva (pl. O_2), cseppfolyós állapotban (pl. folyékony nitrogén), vagy oldat formájában (pl. HCl – sósavoldat, NH_3 – szalmiákszesz). Kezelésükkor nagyon fontos a biztonsági előírások betartása az esetleges robbanás, tűz, fagyási sérülések, ill. – belélegzés esetén – a fulladás vagy mérgezés elkerülése érdekében.

1.2. Folyadékok tárolására szolgáló műanyag és üvegcsövek

Folyadékok tárolására a laborgyakorlatban legtöbbször átlátszó műanyagból készült eszközöket használunk. A műanyag széles hőmérsékleti tartományban rugalmas marad, míg az üveg kisebb ütés, vagy hőváltozás hatására is könnyen elreped. A műanyag általában olcsó és könnyen alakítható, így pl. a belőle készült edények zárhatósága különböző (csavaros vagy „pattintós”) kupakkal megoldható. Folyadékok tárolása esetén ez utóbbi kritérium nagyon fontos, hiszen meg kell óvnunk a mintát az oldószer párolgásától, a környezetből a mintába hulló por, baktériumok, penészspórák és egyéb szennyeződések káros hatásaitól. Sok esetben meg kell óvni a mintát még a levegő gázainak mintába oldódásától is (pl. a levegő oxigénje a fehérjék cisztein oldalláncait oxidálva tiolenzimek aktivitásesökkenését eredményezheti, ill. diszulfid-hidakat hozhat létre az egyes fehérjemolekulák között), vagy az ennek következtében kialakuló változásoktól (pl. a szén-dioxid a mintában feloldódva szénsavvá alakul, a minta pH-ja csökken; ez fehérjék kicsapódását okozhatja). Az eszközök készítésére használt műanyagok további előnyös tulajdonsága, hogy a kísérleteink túlnyomó többségében használt vegyületekkel nem lépnek reakcióba. Előfordulhat azonban, hogy egyes kísérletekben szerves oldószereket használunk. Az ilyen kísérlet előtt nagyon fontos ellenőrizni, hogy az adott műanyag ellenáll-e az oldószereknek!

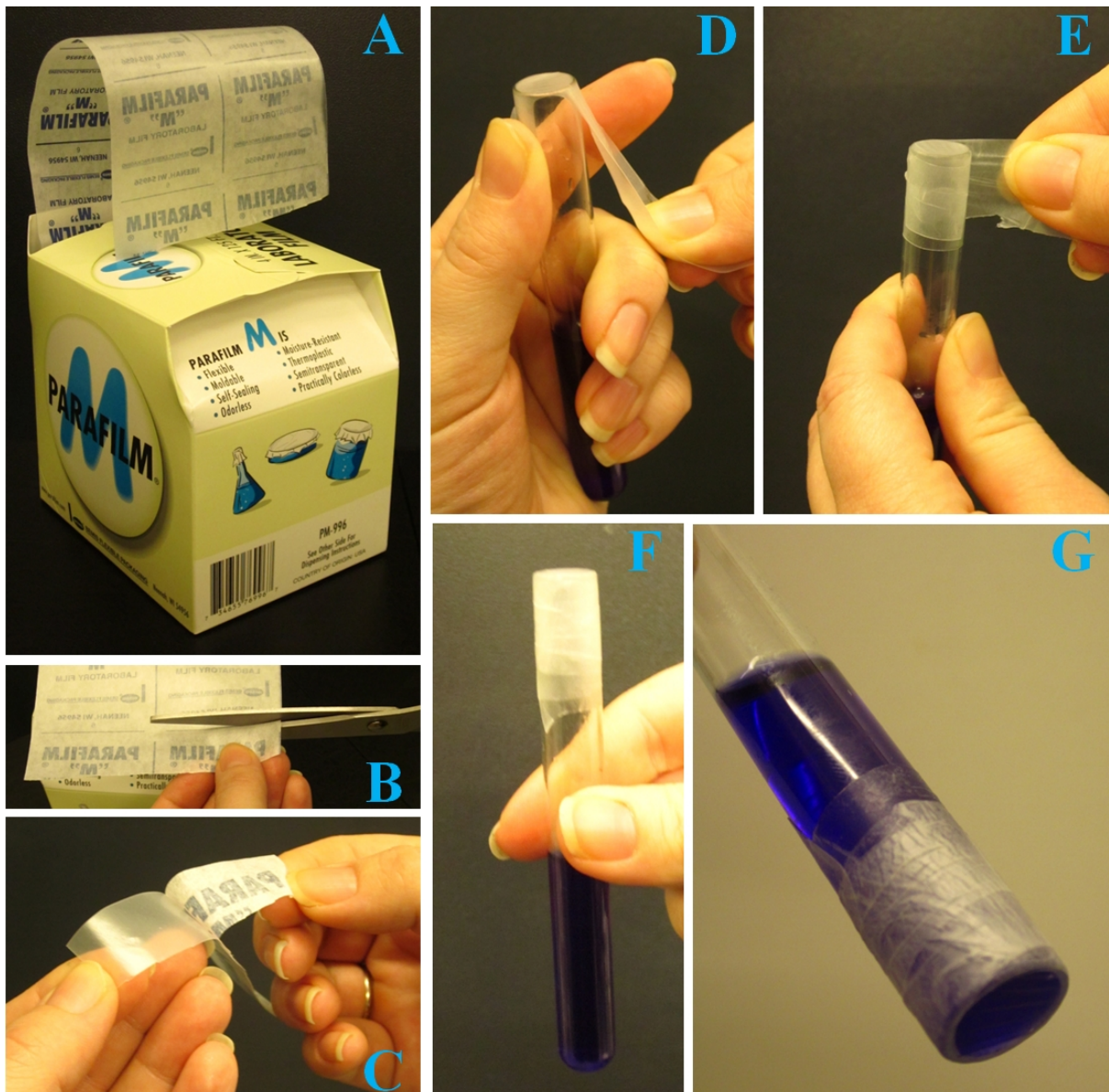
Nagyobb térfogatú laboratóriumi minták tárolására szolgálnak a csavaros kupakkal záródó Falcon-csővek (**1.1. ábra**). Általában 50 és 15 ml-es térfogatban készülnek. A csövek alja kúposan elkeskenyedik, ami előnyös, ha

csak kis térfogatú folyadék található a csőben (hiszen így egy helyre gyűlik össze), ám emiatt sajnos a cső nem áll meg a talpán, használatához állvány szükséges. Egyes 50 ml-es Falcon-csövek alján egy körkörös műanyag perem található; ezek állvány nélkül is megállnak az asztalon. Ügyelnünk kell azonban arra, hogy könnyen felborulnak! A csövek oldalán feliratok és beosztások segítik a csőben található folyadék térfogatának becslését. Pontos térfogatmérésre azonban a Falcon-cső nem alkalmas! A kupakok tetején, illetve a csövek oldalán található fehér területek a minták feliratozását teszik lehetővé. Rendkívül fontos, hogy a laboratóriumi mintákat minden esetben egyértelmű, jól olvasható feliratokkal lássuk el. Meg kell neveznünk a minta komponenseit, ezek koncentrációját, a használt oldószert, puffert, egyéb fontos paramétereket (pl. pH), továbbá dátummal ellátni a mintát (egy-egy komponensek bomlékonyak lehetnek), illetve célszerű a mintát készítő nevét is feltüntetni. Ha a minta veszélyes (pl. mérgező) ezt mindig jelezni kell! A műanyag csövek feliratozását általában alkoholos filctoll segítségével végezzük. Az elkészült feliratot a lekopástól egy darab átlátszó cellulux ragasztószalag segítségével védjük meg.



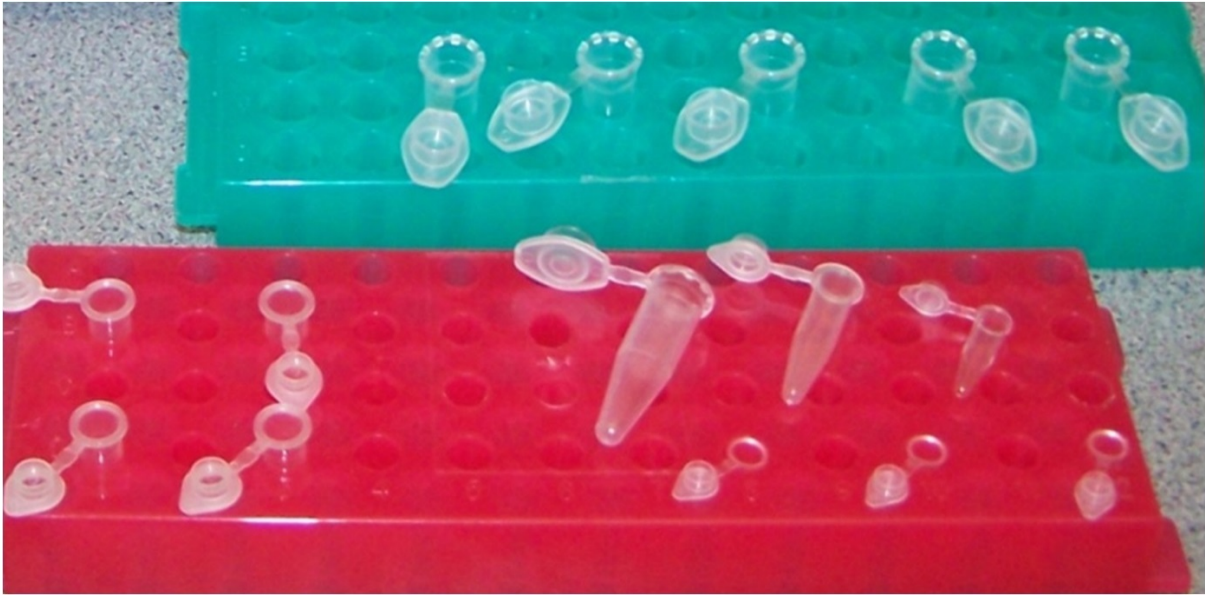
1.1. ábra. Falcon-csövek, kémcső és Wasserman-cső műanyag állványban.

Az üvegből készült kémcsöveket, illetve az ezeknél keskenyebb Wasserman-csöveket (lásd 1.1. ábra) – zárhatóságuk hiányában – általában csak ideiglenes jelleggel (reakcióelegyek összemérésére, kromatográfias módszereknél frakciók gyűjtésére, stb.) használjuk. Szükség esetén zárásuk egy darab parafilm segítségével megoldható (**1.2. ábra**). A parafilmből egy megfelelő méretű darabot vágva lefedhetjük a cső nyílását, majd a lelógó végeket megfeszítve a nyílás köré tekerjük. Ezzel az eljárással akár légmentes zárást is biztosíthatunk, így a parafilmet gyakran használjuk egyéb csövek, edények esetén is. (Gyakran még a kupakkal rendelkező csövek zárását is ilyen módon erősítjük meg.) Az üvegeszközök előnye, hogy a legtöbb vegyszernek, oldószernek ellenállnak. (A biokémiai laborgyakorlatban ez alól talán csak a tömény lúgok képeznek kivételt.)



1.2. ábra. A: Parafilm tekercs dobozban; B: A parafilmről megfelelő méretű darabot vágunk; C: A parafilm réteg leválasztása a papírról; D: Wasserman-cső nyílásának lezárása; E: A parafilm lelógó végét megfeszítve a cső szája köré tekerjük; F: Lezárt cső; G: A lezárt csőből a folyadék még annak felfordítása esetén sem folyik ki.

Kisebber térfogatok tárolására szolgálnak az Eppendorf-csövek (**1.3. ábra**). Ezek általában 1,5 ml-es térfogatban készülnek, bár vásárolhatunk ennél nagyobbakat (2 ml, 5 ml), illetve kisebbeket (0,5 ml) is. Használatukhoz szintén állvány szükséges. Az Eppendorf-cső tetején egy hajlékony összeköttetéssel a csőhöz kapcsolt, be- és kipattintható kupak biztosítja a zárhatóságot. A feliratozásra a cső oldalán, illetve a kupak tetején van lehetőség.



1.3. ábra. 1,5 ml es és 0,5 ml es Eppendorf-csövek, valamint 200 µl-es PCR csövek.

Az úgynevezett PCR-csövek (lásd 1.3. ábra) általában maximum 200 µl minta befogadására képesek. Főként a rekombináns DNS technikák során használatos enzimatikus reakciók összeméréséhez használjuk őket. Nevüket a talán legismertebb ilyen eljárásról a PCR-ről (Polymerase Chain Reaction, polimeráz-láncreakció) kapták, mely egy lineáris, kettős szálú DNS darab célzott, specifikus módon történő felszaporítására szolgál. A PCR-csövek az Eppendorf-csövekhez hasonlóan záródnak.

1.3. Főzőpoharak és lombikok

Oldatok elkészítésére és a kísérlet idejére történő tárolására főzőpoharakat (1.4. ábra) használunk. Méretük 10 ml és néhány liter között változhat. A folyadék térfogatának becslését beosztások és feliratok segítik, ám pontos térfogatmérésre ezek sem alkalmasak. A főzőpohár készülhet üvegből, vagy műanyagból. Amennyiben üvegből készül, alkalmas a benne található oldat láng felett történő melegítésére.



1.4. ábra. Üvegből és műanyagból készült, különböző méretű főzőpoharak.

A biokémiai laborgyakorlatban gyakran találkozhatunk különböző lombikokkal, melyek szintén alkalmasak oldatok tárolására. (Zárásuk csiszolt dugó, vagy parafilm segítségével megoldható.) Méretük általában ~50 ml és néhány

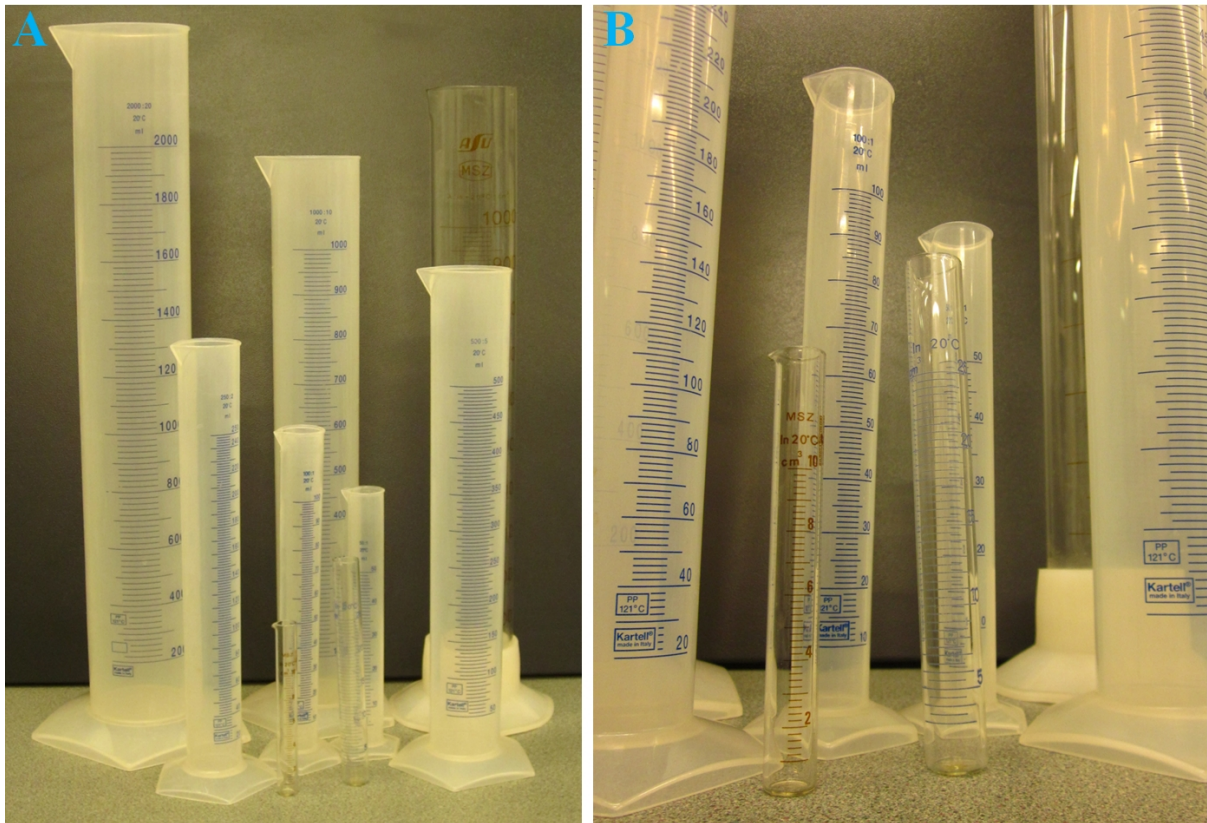
liter között változik. A főzőpoharakhoz hasonlóan üvegből, vagy műanyagból készülhetnek. Pontos térfogatmérésre csak a mérőlombik alkalmas, ám ennek használata a biokémiai laborgyakorlatban ritka. Leggyakrabban az Erlenmeyer-lombikot (**1.5.A ábra**) használjuk, főként baktériumok (esetleg egyéb sejtek) rázatott folyadékkultúrában történő tenyésztésre (**1.5.B ábra**). Az Erlenmeyer-lombik alsó része széles, míg nyaka elkeskenyedik. Ez a forma biztosítja a lombik alján található folyadékréteg nagy felületét, mely a tenyésztett sejtek gázcseréjéhez igen fontos, lehetővé teszi a lombik rögzítését a megfelelő (fűthető és/vagy hűthető) rázó inkubátorban, továbbá megvédi a folyadékot a keveredés közbeni esetleges kilöttyenéstől. A megfelelő gázcsere érdekében a lombikot egy darab alufólia segítségével fedjük le, mely nem zár légmentesen, viszont véd a külvilágból a tápvelesbe jutó baktériumok, spórák ellen.



1.5. ábra. A: Különböző méretű Erlenmeyer lombikok; B: Erlenmeyer lombikok használata *E. coli* sejtek tenyésztésére.

1.4. Folyadékok térfogatának mérése: mérőhengerek és automata pipetták

Folyadékok térfogatának pontos mérésére mérőhengereket (**1.6. ábra**) használunk. Különböző méretekből készülnek, egészen a 25-50 milliliterestől a néhány literesig. A legkisebbekkel már néhány ml folyadék pontos mérése is lehetséges. Oldatok elkészítésére, össze-, ill. kimérésére használjuk őket.



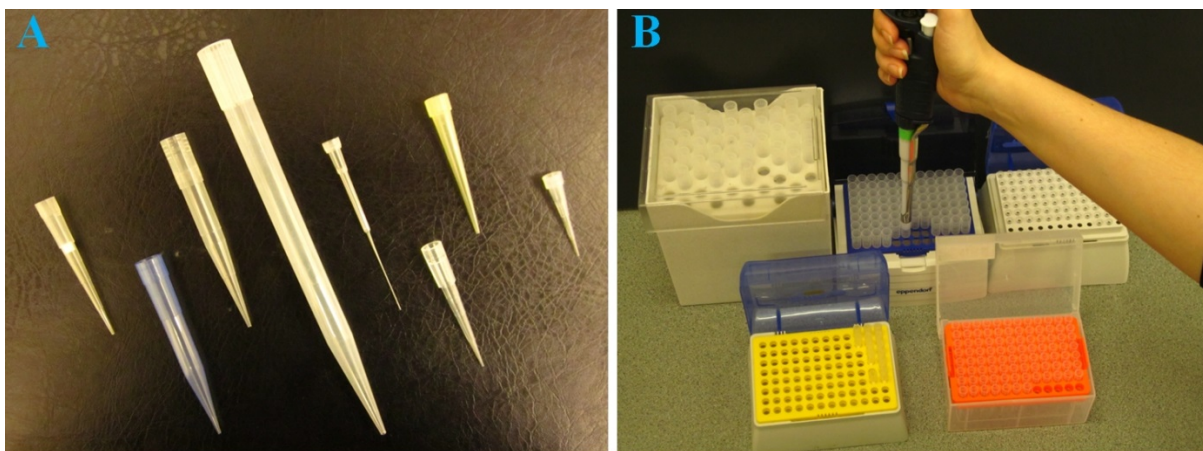
1.6. ábra. A: Különböző méretű, üvegből és műanyagból készült mérőhengerek; B: Kisebb mérőhengerek (100 ml - 10 ml).

Gyakran szükséges azonban a milliliternél kisebb térfogatok pontos mérése is. Ehhez automata pipettákat használunk. **(1.7. ábra)** A pipetta belsejébe egy dugattyút építenek, melyet egy fém rúdon keresztül, a pipetta tetején található nyomógomb segítségével mozgathatunk. A dugattyú lenyomásakor levegő áramlik ki az eszközből, míg felengedésekor vákuum keletkezik. A vákuum szívó ereje a pipetta alján található üreges szárra rögzített, eldobható, műanyag hegybe juttatja a folyadékot. A mozgatni kívánt térfogat állítható, mégpedig a dugattyú által bejárható út megváltoztatásával. Ezt egy csavaros mechanizmus segítségével tehetjük meg, egy erre szolgáló állítógomb eltekerésével. (Gyakran a dugattyút mozgató nyomógomb szolgál erre a célra is.) Az aktuálisan beállított térfogatot az eszköz oldalán található számlálóról olvashatjuk le. Fontos, hogy nem szabad a pipetta maximális kapacitásánál nagyobb, ill. a minimálisnál kisebb térfogatértéket „beállítani”, ugyanis ez az eszköz károsodását okozhatja! Az adott pipettára érvényes határértékeket (a pipetta mérési tartományát) annak műanyag burkolatán, esetleg tetején felirat jelzi. A nagyobb pipettákat általában 1 és 5 ml között használhatjuk. Az 1 ml és 1 µl között több különböző méretű pipetta segítségével dolgozhatunk. A legkisebb pipetták a 0,1 µl és néhány µl közötti térfogatok kezelésére alkalmasak.



1.7. ábra. A: Automata pipetták és méréstartományuk. B: Pipetták a pipettaállványon és különböző pipettahegyek pipettahegy-tartó dobozokban.

A különböző méretű pipettákra különböző méretű hegyeket csatlakoztathatunk. Több, speciális célra kifejlesztett pipettahegy is létezik, így pl. steril szűrővel felszerelt (steril munkához), vagy hosszított hegyeket is használhatunk. **(1.8.A ábra)** A pipettahegyek átlátszó műanyagból készülnek, ami lehetővé teszi a pipetázás folyamatának „ellenőrzését” (pl. a hegybe jutó buborék meghamisítja a mérést). Fontos, hogy minden használat után eldobjuk, ill. lecseréljük a használt hegyet, hiszen a rajtuk maradó folyadékcseppek beszennyezhetik tiszta törzsoldatainkat. (A nagy tisztaságú fehérje, enzim, nukleinsav, stb. mintákat – de egyes vegyszereket is – általában rendkívül költséges, munka és időigényes előállítani, így igen fontos tisztaságukra ügyelni. Beszennyezett mintákkal nem lehet megbízható kísérleteket végezni!) A hegy eltávolítása a pipetták többségén egy külön nyomógomb segítségével végezhető el, mely egy kar segítségével lelökli a hegyet a pipettáról. A hegyeket megvásárolhatjuk előre csomagolva, az adott hegy megfelelő tárolását, és a pipetta végére rögzítését elősegítő dobozokban is **(1.8.B ábra)**. (Elég az eszköz végét a kiválasztott hegy nyílásába nyomni, így az megszorul a pipettán. Fontos a szoros, légmentes kapcsolódás; ennek hiányában a hegybe nem a megfelelő mennyiségű folyadék jut, ill. a bejutott folyadék kicsöpög az átvitel közben.)



1.8. ábra. A: Különböző méretű, valamint speciális (steril szűrővel ellátott és hosszított) pipettahegyek; B: Pipettahegy rögzítése a pipettán, közvetlenül a dobozból.

A pipetta kezelése egyszerű, bár némi gyakorlást igénylő feladat. **(1.9. A-H ábra)** A pipetta dugattyújának három állása lehetséges. Alaphelyzetben („1. állás”) a dugattyút és a hozzá kapcsolt nyomógombot egy rugós mechanizmus felfelé nyomja. Amennyiben hüvelykujjunkkal, finom mozdulattal, nem túl nagy erőt kifejtve lenyomjuk a dugattyút, levegő áramlik ki a pipettából (a korábban rögzített) pipettahegyen át. Miután a beállított térfogatnak megfelelő levegőmennyiség távozott, a dugattyú érezhetően megáll („2. állás”). Ekkor a pipetta hegyét a kiválasztott folyadék felszíne alá merítjük, majd lassan felengedjük a dugattyút, így a megfelelő mennyiségű anyag a hegybe jut. Ezt követően a hegyet kiemelhetjük, a felszívott folyadékot pedig átvihetjük egy másik csőbe, vagy edénybe. A nyomógombot ismétlen lenyomjuk a 2. állásig, így a folyadék új helyére kerül. Gyakran előfordul, hogy egy kis csepp a pipettahegy végében marad. Ennek eltávolítása a pontosság miatt nagyon fontos; a dugattyú nagyobb erővel történő, további lenyomásával lehetséges (ekkor levegő áramlik ki a pipettából) („3. állás”). A pipettahegyet a folyadékból a dugattyú felengedése nélkül kell kiemelni; célszerűen a második állásból a harmadik állásba történő lenyomás közben, vagy azt megelőzően kerül erre sor. Nagyon fontos, hogy amíg a hegyben folyadék van, a pipettát nem dönthetjük oldalra; közel függőleges állásban kell tartani, ezzel elkerülve a folyadék dugattyúba jutását és az eszköz károsodását! Főként kis térfogatok pipettázásánál (pl. enzimoldatok) kell ügyelnünk arra, hogy a hegyet ne merítsük túl mélyen a pipettázandó folyadékba, ugyanis a hegy külső felületére tapadó folyadékcseppek jelentős pontatlanságokat okozhatnak!



1.9. ábra. A-B: A pipetta dugattyújának három állása; D-H: A pipettázás folyamata (D: térfogat beállítása, E: pipettahegy rögzítése, F: a folyadék felszívása, G: a hegy áthelyezése egy új csőbe, H: a folyadék leeresztése).

1.5. Folyadékok keverése

Amennyiben több, különböző folyadékot, vagy oldatot mérünk össze, gondoskodnunk kell azok alapos összekeveréséről. Pipettáink erre is alkalmasak: a hegyet a keverendő folyadékba merítve, majd a dugattyút az 1. és 2. állások között többször fel-le mozgatva elérhető a megfelelő keveredés. Alternatív megoldásként alkalmazhatjuk az úgynevezett Vortex-keverőt (**1.10.A ábra**). A készülék működtetéséhez a tetején található gumipárnát a keverendő folyadékot tartalmazó cső (ált. Falcon-, Eppendorf-, vagy kémcső) aljával lenyomjuk. Ekkor a gumipárna gyors, körkörös, mozgásba kezd, ami a folyadék rázkódásához, illetve forgásához vezet. Ez hatékony keveredést biztosít meglehetősen kis (10-50 μ l) térfogatok esetén is. Fontos, hogy a folyadék a csőben addig a pontig szökik fel, ahol azt fogjuk. Ha egy nyitott cső tetején tartjuk ujjainkat vortexelés közben, akkor a folyadék könnyen kifröccsenhet!

Nagyobb térfogatú oldatok keverésére mágneses keverőt használhatunk (**1.10.B ábra**). A készülék belsejében szabályozható sebességgel forgó motor egy erős mágnest forgat. A fedőlemezre helyezett főzőpohárba, vagy lombiba egy teflonbevonatú, szintén erős mágnest tartalmazó keverőbabát helyezünk. A belső mágnes forgó mozgását követi a keverőbaba mozgása, ezáltal az oldat is forgásba jön. Számos különböző méretű és alakú keverőbaba közül választhatunk (**1.10.C ábra**) a folyadék térfogatának, az edény alakjának és térfogatának függvényében. A keverő lehet hőmérséklet szabályozóval ellátva, ilyenkor a fedőlemeze fűthető. Ha pedig az oldatunk felmelegedése kerülendő, akkor a főzőpohár v. lombikot célszerű egy jeges-vizes oldatot tartalmazó kristályosító csészében helyezni a keverőlapra. A mágneses keverőt gyakran használjuk különböző szilárd anyagok oldódásának elősegítéséhez, gyorsításához, illetve akkor, ha az oldat intenzív, állandó keverése szükséges. Utóbbi esetre példa a pufferoldatok pH-jának beállítása. Ekkor egy digitális pH mérő berendezés segítségével követjük a pH változását, miközben erős sav, vagy bázis oldatát adagoljuk a pufferhez, egészen addig, míg a kívánt pH értéket elérjük. (A berendezéshez rendszerint egy kombinált üvegelektrod csatlakozik, mely az oldat H^+ (oxóniumion)-koncentrációjára érzékeny).



1.10. ábra. A: Folyadék keverése Vortex keverővel; B: Folyadék keverése pH mérés közben, mágneses keverő segítségével (a folyadékba fentről belemerül a pH mérő berendezés kombinált üvegelektrodja); C: Különböző méretű és alakú, teflonnal bevont, mágneses keverőbabák.

1.6. Tömegmérés

Az oldatok készítéséhez használt szilárd anyagok kimérését különböző pontosságú digitális mérlegek segítségével végezzük. Az egyszerűbb mérlegek 0,1 g pontossággal dolgoznak; mérési tartományuk a néhány grammos mennyiségektől a néhány száz grammos mennyiségekig terjed. (**1.11.A ábra**) Kisebb tömegek, akár tizedmilligrammos mennyiségek (századmilligrammos pontossággal) mérése analitikai mérlegeken lehetséges. Ezeket rezgésmentes asztalon kell elhelyezni, továbbá a mérés közbeni légmozgások zavaró hatását is ki kell küszöbölni. Utóbbi célra a mérlegre épített, átlátszó, nyitható búra szolgál (**1.11.B ábra**), amelyet a mérés közben

zárva kell tartani. A különböző vegyszerek kimérését a mérlegre helyezett, eldobható, műanyag tálca (esetleg egy főzőpohár, ill. egyéb edény), valamint vegyszereskanál, vagy spatula segítségével végezhetjük. Nagyon fontos a mérésre használt edény tömegét először üres állapotban lemérni, majd a mérleg kijelzőjét az erre szolgáló gomb segítségével lenullázni („tárázni”), így csak a kimért anyag tömegét mutatja a mérleg.



1.11. ábra. A: Digitális mérleg kimérő edénykével, spatulákkal és vegyszereskanalakkal; B: Analitikai mérleg rezgésmentes asztalon.

1.7. Víz tisztítás; oldatok, eszközök sterilizálása

A biokémiai és molekuláris biológiai kísérletekhez, az oldatok készítéséhez rendkívül tiszta vizet kell használnunk. Ezt sok laboratórium készen vásárolja, ám elkészíthető „házilag” is, pl. (többszöri) desztillációval, vagy a csapvíz szűrőkön, ill. ioncserélő gyantákon történő átvezetésével (1.12.A ábra). A különböző, egyre kisebb pórusméretű szűrők egymás után kötésével megszabadulhatunk a vízben található nagyobb, majd egyre kisebb szemcséjű szennyeződésektől, baktériumoktól és egyéb mikroorganizmusoktól, míg az ioncserélő gyanták a vízben oldott ionok eltávolítását végzik el. (Mind a szűrőket, mind az ioncserélő gyantákat időről-időre cserélni kell!) A víz minőségét az elektromos ellenállás (vagy a vezetőképesség) mérésével ellenőrizzük. (A tiszta víz ellenállása igen nagy.)

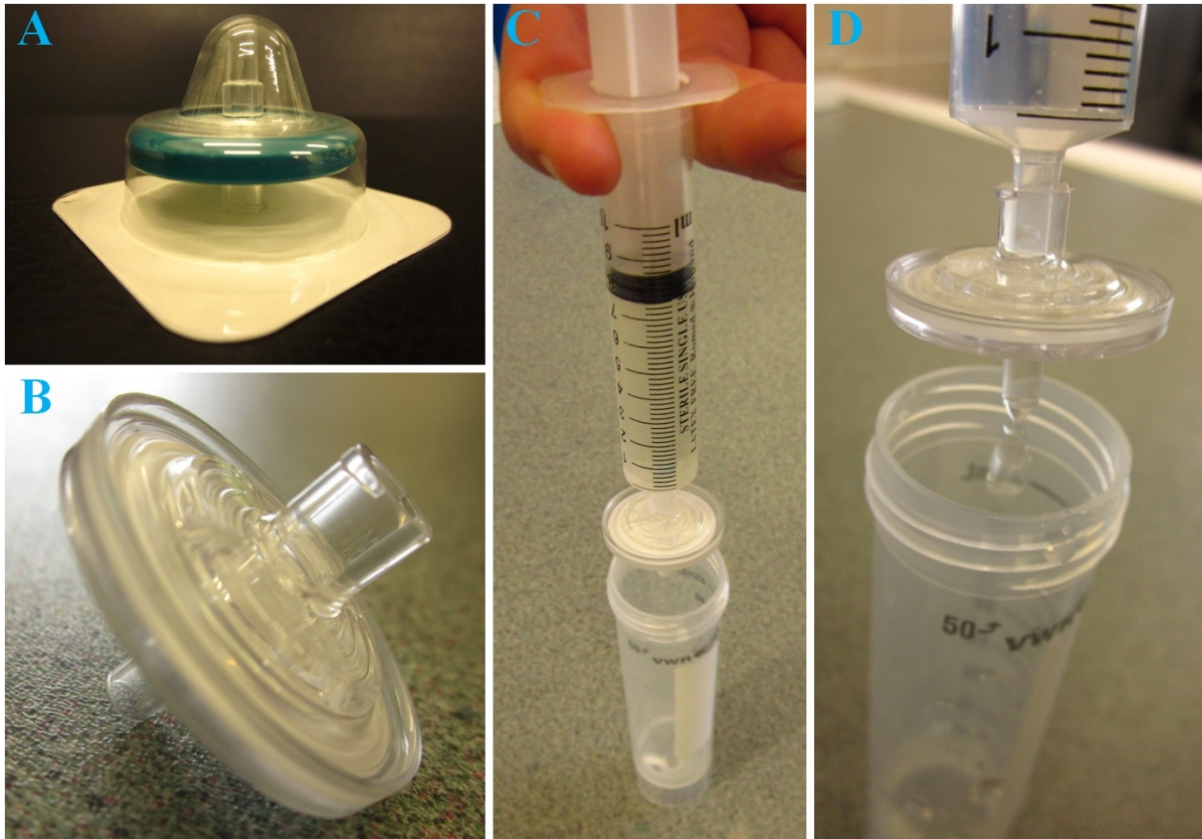
Az oldószerek, oldatok, vegyszerek, eszközök, csövek és edények tisztasága általános követelmény, ám sok esetben ezek sterilizálására is oda kell figyelnünk. A sterilitás nem jelent mást, minthogy a külvilágból a kísérleti rendszerbe jutó mikroorganizmusokat eltávolítjuk vagy elpusztítjuk. Számos fizikai és kémiai módszer közül választhatunk, a sterilizálandó anyag, vagy eszköz tulajdonságainak függvényében. Steril eszközöket zárt csomagolásban számos cég forgalmaz, ezeket pl. nagy energiájú (gamma) sugárzás segítségével sterilizálják.

Lehetőség van eszközeink „házi” sterilizálására is; erre a legelterjedtebb laboratóriumi megoldást az autoklávok jelentik (**1.12.B ábra**). Az autokláv tulajdonképpen egy erős falú tartály, melynek fűthető belső terébe kell a sterilizálandó eszközöket elhelyezni, majd ugyanide megadott mennyiségű vizet kell tölteni. (A víz nem lepi el a behelyezett eszközöket, ugyanis azok valamilyen emelvényen, a víz szintje fölött állnak.) A berendezés ajtajának légmentes lezárása után megkezdjük a belső tér felfűtését. Mivel ez egy zárt tér, így a hőmérséklet emelkedésével a víz párolgása miatt a nyomás is megnő. A művelet általában 20 percen keresztül, 121 °C -on végezzük. (A túlnyomás ellen biztonsági szelep véd.) A nagy nyomású gőz ennyi idő alatt elpusztítja még a legellenállóbb baktérium-endospórákat is. Természetesen csak olyan eszközöket sterilizálhatunk autoklávban, melyek kibírják az említett hőmérsékletet. Az üvegeszközökre ez kivétel nélkül igaz, de szerencsére a fentebb említett műanyag eszközök (Falcon-cső, Eppendorf-cső, pipettahegy, stb) szinte mindegyike ilyen (vagy vásárolhatunk ilyet). Nagyon fontos, hogy eszközeinket az autoklávba helyezés előtt dobozba tegyük, vagy egyéb módon becsomagoljuk (pl. alufólia), illetve az edényeket lefedjük, hiszen kivételkor újra beszenyeződhetnek. Az autoklávot használhatjuk oldatok sterilizálására is, de csak akkor, ha az oldat komponensei nem bomlanak el az alkalmazott hőmérséklet és nyomás mellett. (Ez a használt szervetlen vegyületek többségére, de számos egyszerű szerves vegyületre, pl. pufferekre is igaz.) A baktériumok tenyésztésére használt táptalajokat, médiumokat is autoklávban sterilizáljuk.



1.12. ábra. A: A laboratóriumi követelményeknek megfelelő tisztaságú víz előállítása szűrők és ioncserélők segítségével történik; B: Autokláv.

Amennyiben az oldat tartalmaz olyan komponenst, mely bomlásnak indulna az autoklávban (pl. glükóz, vagy egyéb cukrok), szűrők használatával kell a sterilizálást elvégezni (**1.13. ábra**). Ezek olyan kis pórusmérettel (0,2 μm) rendelkeznek, hogy a baktériumok nem jutnak át rajtuk. Fontos, hogy maga a szűrő is steril legyen; ezeket egyesével csomagolva vásárolhatjuk meg. Talán a legelterjedtebbek a fecskendőre szerelhető szűrők, de léteznek egyéb, pl. vákuum segítségével működtetett megoldások is.



1.13. ábra. A: Becsomagolt, steril szűrő; B: Az eszköz korong alakú, kiszélesedő részében található nagy felületű, 0,2 µm pórusméretű membrán még a baktériumokat is eltávolítja az oldatból; C: A szűrőt fecskendő végére rögzítjük; D: A szűrés folyamata.

1.8. Sejtenyészetekkel végzett munka

A sterilitás rendkívül fontos, hiszen az oldatokban elszaporodó mikroszkopikus élőlények az oldat komponenseit lebontják, saját anyagaik felépítése során hasznosítják, továbbá számos új vegyületet juttatnak az oldatba. (Érdekes, hogy egyes algák még a desztillált vízben is képesek elszaporodni!) Olyan kísérletekben, vagy munkafolyamatokban, ahol valamilyen sejtenyészetrel dolgozunk, (pl. *E. coli* baktérium használata a rekombináns DNS technikákban) szintén kulcsfontosságú a tenyészet tisztaságának megőrzése. Ekkor minden eszközt, oldatot, médiumot és táptalajt sterilizálnunk kell a használat előtt, továbbá a tenyészetekkel végzett munkát (pl. sejtek átoltását új táptalajra) steril fülkében (**1.14.A ábra**) végezzük el. A fülkében mikroorganizmusoktól megszárt levegő áramlik felülről lefelé. A belső tér kikapcsolt állapotban zárt. Használat közben az átlátszó előlapot felemeljük, majd az így létrejött nyíláson keresztül dolgozunk. A munkafolyamatok közben gumikesztyűt viselünk. A behelyezett eszközöket (pl. oltókacs, szélesztőbot) etilalkohol segítségével, és/vagy a bent található gázégő használatával tehetjük sterillé, de az eszközök többségét már eleve sterilen helyezük a fülkébe. Mivel a levegő lefelé áramlik, fontos, hogy ne emeljük kezünket, vagy nem steril eszközeinket (pl. pipetta) steril tenyészetek, táptalajok, vagy eszközök fölé, hiszen a légáramlás által lefelé sodort porszemcsék beszennyezhetik azokat. A munka végeztével a fülke előlapját lezárjuk, majd a belső teret UV fény használatával (beépített UV lámpa) tesszük csiramentessé.

A különböző, bakteriális vagy eukarióta sejtenyészetek számára a megfelelő körülményeket inkubátorok vagy fermentor segítségével teremtjük meg (**1.14. B-D ábra**). A megfelelő hőmérséklet biztosítása érdekében ezek a készülékek képesek a minták befogadására szolgáló belső tér fűtésére és hűtésére. (Az egyszerűbb, olcsóbb készülékek csak fűteni tudnak.) A különböző sejteket tenyészthetjük valamilyen felszínen: a baktériumsejteket petri-csészékbe öntött, gél állagú, agar lemezekben (**1.14.B ábra**), míg az eukarióta (pl. humán) sejteket – melyek általában túlélésükhöz igénylik a letapadást – erre szolgáló, lapos tenyésztő flaskák alsó felületére tapadtan, a megfelelő folyékony médium mellett (**1.14.C ábra**). Főleg eukarióta tenyészetek, de egyes baktériumok esetén is fontos a hőmérsékleten túl a megfelelő gázösszetétel (pl. O₂ mentes közeg; CO₂ szint, stb) biztosítása, ami szintén az inkubátor feladata. Amennyiben nagy mennyiségű sejt létrehozása a cél (pl. rekombináns fehérjék *E. coli*

baktériumban történő termelése esetén), rázatott folyadékkultúrákat alkalmazunk (**1.14.D ábra**). Ekkor a sejtek a folyadék teljes térfogatát kihasználva növekedhetnek. Ehhez – ahogy már említettük – általában Erlenmeyer-lombikokat használunk, továbbá rázó inkubátorokat, melyek gyors, körkörös mozgással biztosítják a behelyezett sejt-kultúra áramlását, és ezen keresztül az intenzív gázcserét.



1.14. ábra. A: Steril fülke; B: Inkubátor (37 °C), benne baktérium tenyészetek agarlemezekon; C: Inkubátor (37 °C), benne eukarióta sejttenyészetek; D: Fűthető rázó inkubátor (37 °C), benne folyadékkultúrában növekvő *E. coli* baktériumok.

1.9. Centrifugák

A rázatott folyadékkultúrából a sejteket különböző centrifugák segítségével távolíthatjuk el (**1.15. ábra**). Ugyanígy tulajdonképpen bármilyen szuszpenziót, vagy kolloidális rendszert (pl. kicsapódott fehérjék egy oldatban) szétválaszthatunk két frakcióra, melyeket általánosságban felülúszónak (oldat) és csapadéknak, vagy pelletnek (a centrifugacső alján összetömörödött anyag) nevezünk. A centrifuga felépítése alapvetően egyszerű: egy álló és

egy forgó részből (rotorból) áll. Az álló rész tartalmaz egy elektromos motort, mely a rotor forgatásáért felelős. A rotor feladata a mintákat tartalmazó centrifugacsövek befogadása. Mivel mintáink sok esetben hőérzékenyek (pl. fehérjék hődenaturációja), a centrifugák jelentős része hűthető belső térrel rendelkezik. Számos különböző méretű laboratóriumi centrifuga létezik, az egyszerű „asztali” készülékektől – melyek általában Eppendorf-csövek befogadására képesek – a több literes mintatérfogatok esetén alkalmazott preparatív centrifugákig. A nagyobb méretű készülékeket általában több, különböző rotorral is használhatjuk, így a centrifugálás paramétereit a mintákhoz szabhatjuk. A centrifugacsöveket mindig a rotor típusának megfelelően kell megválasztani (**1.16. ábra**). Nagyon fontos, hogy a mintákkal feltöltött centrifugacsöveket úgy helyezzük el a rotorban, hogy a szemközti csövek tömege azonos legyen, vagyis minden esetben alkalmazzunk ellensúlyokat (pl. vízzel töltött centrifugacső a mintával szemben) és a tömegazonosságot pl. kétkarú mérleggel ellenőrizzük. Ha a tömegeloszlás a forgástengely körül nem szimmetrikus, az – az alkalmazott igen nagy forgási sebességek mellett – a készülék tengelyének töréséhez, a rotor és az egész berendezés károsodásához, súlyosabb esetben balesethez vezethet.

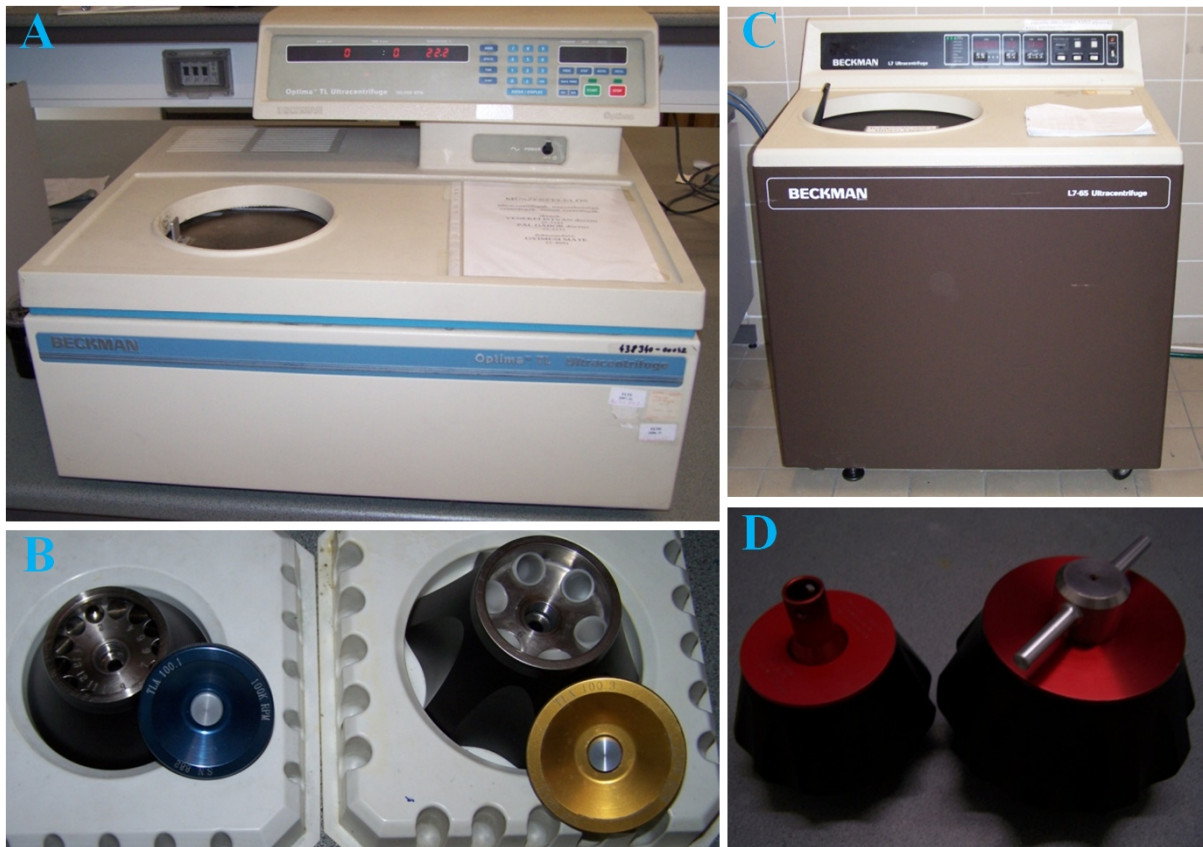


1.15. ábra. A: Asztali Eppendorf-centrifuga a rotorban szimmetrikusan elhelyezett Eppendorf csövekkel (maximális fordulatszám: 14 000/perc); B: Szemipreparatív, hűthető centrifuga, Eppendorf rotorral; C: Preparatív centrifuga és rotorja, mely több liter folyadék egyszerre történő centrifugálására képes; D: Szemipreparatív rotor és fedele; E: Preparatív rotor és fedele.



1.16. ábra. Különböző méretű centrifugacsövek.

A centrifugák forgási sebességét általában a percenként megtett fordulatok számával adjuk meg. Ennél azonban a kísérlet szempontjából sokkal informatívabb a relatív centrifugális gyorsulás megadása, ugyanis a mintában található, adott tömegű részecskékre ható erőt ez határozza meg. (Az erőt a gyorsulás és a tömeg szorzataként kapjuk.) A relatív centrifugális gyorsulást a Föld felszínén tapasztalható nehézségi gyorsuláshoz ($g \sim 9,8 \text{ m/s}^2$) viszonyítjuk. Állandó szögsebesség, vagyis fordulatszám mellett a centrifugális gyorsulás a forgástengelytől számított távolságtól (vagyis a sugártól) függ. A sugarat a centrifuga rotorjának geometriája határozza meg. Ha két különböző centrifugában ugyanolyan fordulatszámon pörgetjük mintáinkat, teljesen eltérő eredményre juthatunk, ugyanis a részecskékre ható erő jelentősen különbözhet, s ez más-más ülepedési sebességet eredményez. Éppen ezért nem a fordulatszámot, hanem a relatív centrifugális gyorsulást (azt, hogy hány „g”-vel centrifugálunk) szokás megadni a kísérletek leírásában. Az egyszerűbb centrifugák maximum néhány tízezer g relatív centrifugális gyorsulással jellemezhetőek, míg az ultracentrifugáknál (**1.17. ábra**) ez az érték már több százszázalékos nagyságrendbe is eshet. Az ehhez szükséges nagy fordulatszám könnyebb elérése érdekében a rotor körüli térben egy szivattyú segítségével vákuumot hozunk létre. Az ultracentrifugák preparatív felhasználásán túl (pl. sejtlizátumból membrántörmelékek eltávolítása valamilyen fehérje izolálása előtt) számos analitikai alkalmazás is ismert. Tanulmányozhatunk velük például fehérje-fehérje interakciókat, vagy fehérje-oligomerizációt. (A DNS szemikonzervatív replikációját is ultracentrifugával végzett, sűrűség-gradiens centrifugálásos kísérletekben sikerült megfigyelni először.)



1.17. ábra. A: Mikro ultracentrifuga (maximális fordulatszám: 100000 min⁻¹, maximális gyorsulás: 300000 g); B: A mikro ultracentrifugához tartozó rotorok; C: Szemipreparatív ultracentrifuga (maximális fordulatszám: 70000 min⁻¹, maximális gyorsulás: 350000 g); D: A szemipreparatív ultracentrifugához tartozó rotorok.

1.10. Egyéb, gyakori technikák: spektrofotométer, elektroforézis, kromatográfia

A biokémiai és molekuláris biológiai laboratóriumokban az eddig felsoroltakon kívül még számos eszközzel és mérőműszerrel találkozhatunk. Szinte biztos, hogy a laboratóriumok többségében találunk spektrofotométert (1.18. A ábra). A fotometria a mintán, például egy biomolekula oldatán átjutó fény intenzitásának mérését jelenti. Ha az oldat valamely komponense elnyeli a fényt, a mért intenzitás lecsökken. A spektrofotométer olyan készülék, mely a fény hullámhosszának függvényében vizsgálja a minta fényelnyelésének mértékét, vagyis abszorbanciáját (extinkcióját). Az abszorbancia mértéke függ a fényt elnyelő anyag koncentrációjától, így a spektrofotométereket számos anyag (pl. fehérjék, nukleinsavak, koenzimek) koncentrációjának meghatározása során használjuk. A mérésre szolgáló mintatartókat küvettának nevezzük (1.18.B ábra). Ezek csaknem kivétel nélkül négyzetalajú, leggyakrabban 1 cm vastag átlátszó oldallú hasábok. Anyagukat a mérés hullámhossz-tartománya szerint kell megválasztani úgy, hogy elnyelésük minimális legyen: átlátszó műanyagból, vagy üvegből készült küvettákat a látható fény tartományában, míg kvarcból készületeket az UV tartományban használunk. Gyakran előfordul, hogy sok minta abszorbanciáját kell meghatározni. Ez a hagyományos fotométerek és küvetták használatával sok időt venne igénybe. Az úgynevezett *plate-reader* vagy „lemez-leolvasó” egy olyan készülék, mely számos minta abszorbanciájának mérésére képes igen rövid idő alatt (1.18.C ábra). A mintatartó ez esetben egy műanyag tálca, melyen zsebeket alakítottak ki (pl. 96 lyukú tálca, melyen a zsebek 8 sorban és 12 oszlopban helyezkednek el). (A fotometriáról, spektrofotométerekről bővebben a 4. fejezetben lesz szó.)



1.18. ábra. A: Spektrofotométer; B: Üvegből, műanyagból, vagy kvarcból készült küvetták (mintatartók); C: Lemezolvasó (plate-reader), 96 lyukú tálcával és mintákkal.

A biokémiai laboratóriumokban szintén találunk valamilyen elválasztástechnikai berendezést (**1.19. ábra**). Az elválasztástechnikák két nagy családjába az elektroforetikus- és kromatográfiás eljárások tartoznak. Elektroforézis során az elektromos tér töltéssel rendelkező részecskékre (például a cukorfoszfát-gerinc miatt negatív töltéssel rendelkező DNS-re) gyakorolt mozgató hatását használjuk ki) (**1.19.A ábra**). A molekulák mozgását általában olyan közegben végezzük, ahol azok különböző sebességgel haladnak méret, alak, vagy töltésbeli különbségeik miatt. A közeg általában egy gél, azaz térhálós polimer, melyet vizes oldattal teli, különböző méretű járatok hálóznak be. A járatok mérete összemérhető a molekulák méretével, így a gél képes „molekuláris szűrőként” viselkedni. (Az elektroforetikus technikák a 7. fejezetben kerülnek ismertetésre.) A kromatográfiás technikák valamilyen anyagnak egy álló és egy mozgó fázis közötti megoszlását használják ki. A biokémiában az álló fázis általában egy üreges csőbe („oszlopba”) töltött polimer anyag szemcséit („gyöngyök”) jelenti, míg a mozgó fázis („eluent”) az ezek között áramló oldat. Az elválasztás a molekulák mérete, alakja, töltése, izoelektromos pontja, hidrofób jellege, vagy specifikus biológiai aktivitása szerint történhet; az álló- és mozgó fázist e szerint kell megválasztani. A kromatográfiás berendezések általában puffertartály(ok)ból, az eluent mozgató pumpából, a minta felvitelét lehetővé tevő injektorból, az álló fázist tartalmazó oszlopból, detektorból és frakciószedőből állnak (**1.19.B-C ábra**). A vezérlést és az adatgyűjtést gyakran egy csatlakoztatott számítógép végzi. (A kromatográfiás módszerek részletes ismertetésére a 6. fejezetben kerül sor.)



1.19. ábra. A: Gélelektroforézishez használt tápegység és a hozzá csatlakoztatott puffertartály (a puffertartályban található a gél, melyben az elválasztás zajlik); B: Kromatográfiai munkaállomás (HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography*, azaz nagy teljesítményű folyadékkromatográfia) C: Kromatográfiai munkaállomás (FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography*).

1.11. Biológiai minták tárolása

A biológiai minták feldolgozása sokszor időigényes feladat, így gyakran hosszabb-rövidebb ideig tárolnunk kell őket. Mivel a minták igen sokfélék (élő eukarióta sejtek, baktériumok, szövetminták, fehérje, DNS, vagy RNS preparátumok, stb.), továbbá fizikai és kémiai tényezőkkel szemben mutatott érzékenységük eltérő, tárolásuk optimális körülményeit gyakran kísérletes úton kell meghatározni. A tárolás során ideális esetben a minta összetétele, kémiai, fizikai tulajdonságai, vagy biológiai aktivitása egyáltalán nem változik meg. Ez a gyakorlatban sajnos minden esetben csak részlegesen valósul meg, így fontos a munkafolyamatok, kísérletek megtervezésén keresztül a tárolás idejét a minimálisra csökkenteni.

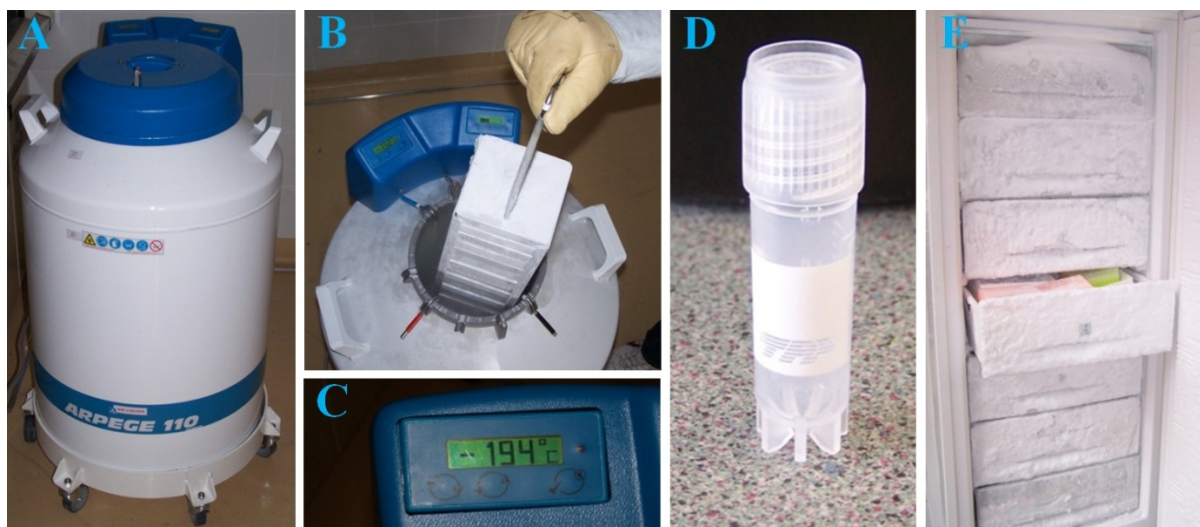
A biológiai mintákban különböző gyorsasággal, de folyamatosan zajlanak enzimek által katalizált és spontán kémiai átalakulások. Ahogy azt már említettük, az utóbbiak némelyike (pl. levegő oxigénje általi oxidáció) ellen védekezhetünk a minta külvilágtól történő elzárásával. Főként hosszú távú tárolás céljára a mintát kizárólag jól záródó csövekben, vagy edényekben szabad elhelyezni! Gyakran szükséges azonban a mintához olyan vegyületeket is hozzáadni, melyek bizonyos káros hatásoktól megvédik azt. Ilyen a 2-merkaptoetanol, mely redukálószerként véd az oxidációtól, de ilyenek a különböző proteáz inhibitorok, melyek a fehérjéket lebontó enzimek működését gátolják, vagy például a nátrium-azid (NaN_3), mely légzésgátló hatása miatt az esetlegesen a mintába került mikroorganizmusok növekedését gátolja.

Az is előfordul, hogy a minta tárolása előtt eltávolítunk belőle olyan komponenseket, melyek annak instabilitását okozhatják. Erre talán a legjobb példa a minták liofilizálása, mely igen gyakran használt technika. Mint tudjuk, a biokémiai folyamatok vizes közegben (oldatban) játszódnak le, ráadásul a víz számos reakcióban közvetlenül, reagensként is szerepel. Ilyen például a polinukleotidok foszfodiészter-kötéseinek hidrolízise. Ha tehát (közel) vízmentessé tesszük mintánkat, számos reakciót nagyon jelentősen lelassíthatunk. A liofilizáló készülék vákuumot állít elő (**1.20. ábra**). A mintánkat lefagyaszthatjuk a készülékre csatlakoztatható vákuumkamrák egyikébe történő behelyezés előtt. A fagyott mintából a víz lassan elszublimál, majd egy hűtött felszínen kristályosodik ki újra. Néhány óra leforgása alatt igen alacsony víztartalom érhető el. A módszert főként fehérje, vagy nukleinsav preparátumok esetén szokás alkalmazni. Habár a liofilizálás általában nem vezet denaturációhoz, bizonyos fehérjék denaturálódhatnak, így – amennyiben renaturációjuk nem megoldott – későbbi visszaoldásuk nem lehetséges.



1.20. ábra. A: Liofilizátor, tetején a vákuum kamrával; B: A vákuum kamra csövek segítségével kiterjeszthető, így több minta egyidejű kezelése is lehetséges; C: Liofilizálódó minta a vákuum kamrában, egy Falcon-cső belsejében.

A kémiai átalakulások sebességét nem csak a reagensek elvonásával, vagy a katalizátorok gátlásával lassíthatjuk; ennek egyik legegyszerűbb módja a hőmérséklet csökkentése. Tárolhatjuk mintáinkat $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on folyékony nitrogénben, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on speciális fagyasztószekrényben, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on egyszerű (háztartásban is használt) fagyasztóban, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on olvadó jégen (főként rövidtávon, a kísérlet, vagy munkafolyamat közben), illetve $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on hűtőszekrényben. A folyékony nitrogént egy hőszigetelt, de nyitott, tartályban tároljuk (**1.21. ábra**). A folyadék állandó forrásban van, ez endoterm folyamat, vagyis hőt von el környezetétől. Amíg a forrás tart (nem fogy el a folyadék), a hőmérséklet állandóan a forráspontnak megfelelő ($-192\text{ }^{\circ}\text{C}$) marad. Nem szabad a nitrogéntartályt lezárni, ugyanis ez a folyadék felmelegedését és a nyomás jelentős növekedését okozná, ami egy nem megfelelően erős tartály esetén akár robbanáshoz is vezethet, nem beszélve a szétfroccsenő és azonnal forrásnak induló nitrogén fagyasztó hatásáról. A tartályokban kivethető állványok szolgálnak mintáink elhelyezésére (**1.21.B ábra**). A mintákat speciális műanyagból készült csövekben („cryotube”) kell elhelyezni, ugyanis a hagyományos Eppendorf-csövek könnyen elrepednek ilyen hőmérsékleten (**1.21.D ábra**). Folyékony nitrogénben tárolhatunk fehérje és nukleinsav preparátumokon túl akár lefagyasztott eukarióta sejteket is, melyek felolvasztva visszanyerik életképességüket, hiszen a vizes oldatok ilyen hőmérsékletre helyezve rendkívül gyorsan, „üvegszerűen” fagnak meg, így nem képződnek hegyes jégkristályok, melyek a membránokat megromlíthatnák. (Általában szükséges valamilyen „krioprotektáns” anyag, pl. glicerol hozzáadása is a sejtekhez.) Fagyasztószekrényben is, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolhatunk hasonló módon gyorsfagyasztott, élő baktériumsejteket (**1.21.E ábra**). Szövetmintákat, fehérjeoldatokat, egyéb biológiai mintákat – érzékenységüktől és időtartamtól függően – tárolhatunk akár -80 , vagy $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztóban is. Hűtőszekrényben, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on főként pufferoldatokat, vegyszereket tárolunk; biológiai mintákat csak rövid ideig (valamilyen munkafolyamat közben).



1.21. ábra. A: Folyékony nitrogénnel töltött mintatároló; B: A tárolóban kiemelhető fém állványok szolgálnak a minták elhelyezésére; C: A belső hőmérsékletet egy digitális kijelzőn olvashatjuk le; D: A biológiai minták folyékony nitrogénben történő tárolásához használt „cryotube”; E: Mélyfagyasztó szekrény (-80 °C).

2. fejezet - Mértékegységek és oldatok

szerző: Venekei István

2.1. A mértékegységekről

A mennyiségek megadására mértékeket használunk. Minden mértéknek definícióval megadott egysége van. A tudományban használt mértékegységek pedig tudományosan megalapozott rendszert alkotnak. Ez az SI (System International) rendszer és az SI mértékegységek. Csak az ezek között szereplő mértékegységek a „hivatalosak”, noha néhány esetben hagyományos, az SI-be nem tartozó mértékegységek is használatban vannak (pl. kalória, Ångström, stb).

A mennyiségek között, és ezért a mértékegységek rendszerében is két típust különböztetünk meg. Az egyik, kisebb csoport az **alap mennyiségeké**, amelyek nem származtathatók más mennyiségekből. Ezek közül a biokémiában is használatos mennyiségek a tömeg és súly (gramm, g), a távolság (méter, m), az idő (szekundum, s), a hőmérséklet (Kelvin, K és a töltés (Coulomb, C) mérésére szolgálnak (zárójelben a mértékegység neve és szimbóluma szerepel). A másik, jóval nagyobb csoport a **származtatott mennyiségeké**. Ezek közül a biokémiában a térfogat, a koncentráció mértékegységei (oldatok és más elegyek anyag arányainak jellemzésére) a mól (anyagmennyiségek jellemzésére), valamint az energia mérésére szolgáló mértékegységek a használatosak.

Fontos tudni a tömeggel és a súllyal kapcsolatban, hogy noha ezeket gyakran „felváltva” (egymás alternatíváiként) használják, jelentésük különböző. A tömeg a valamely objektumban levő teljes anyagmennyiséget fejezi ki, amely a jelen levő összes proton és neutron tömegéből adódik, ha nem is egyszerű összegzéssel. A súly ezzel szemben a tömegvonzás (gravitációs erő) hatásának mértéke az objektumra. Míután a proton és neutron tömege egységnyi (tömegegység, a tömeg egysége), az általuk okozott tömeg (pl. egy molekula tömege, a móltömeg) is dimenziótlan szám (pl. a víz móltömege 18), viszonyszám, ami a protonok és neutronok tömegének egyszerű additivitása esetén meg tudná mutatni mennyi proton és/vagy neutron van jelen egy atomban, vagy molekulában. Mérhetővé úgy tesszük, hogy pl. grammban fejezzük ki, mivel ettől kezdve súlyként is kezelhetjük, az arra a célra kifejlesztett eszközzel (mérleggel) mérhetjük. Így tehát a súlymérés jelenti egy fizikai objektum (pl. 18 mL víz, tehát nem atom, vagy molekula) tömegének mérését, ami viszont függővé teszi a tömeg mérését a gravitációs erő hatásától, ezzel pedig a helytől is, ahol mérjük. (Pl. 18 gramm súlynyi H₂O nem ugyanaz a vízmennyiség (mL, illetve víztömeg) az egyenlítőnél, mint a pólusokon, bár az eltérést a hagyományos karos mérleggel nem lehet kimutatni, annak működési *elvé* miatt.) A tömeg és a súly viszonyának gyakorlati vonatkozásaként tehát nem csak azt mondhatjuk, hogy a tömeget csak súlyként tudjuk mérni, hanem azt is, hogy a súly nem más, mint a gravitáció hatása a tömegre. Ezért van az, hogy a súly nagyságát a tömeg és a gravitáció együtt határozza meg, és hogy egy objektum lehet súlytalan, de tömegtelen sosem.

Biokémiában a makromolekulák esetén használatos tömegegység a Dalton (Da), ami azt fejezi ki, hogy egy molekula tömege hányszorosa a hidrogén atom, pontosabban egy proton (vagy egy neutron) tömegének.

Specifikusan a kémiában használatos fontos mennyiség a **mól**. A grammokban kifejezett atom és molekula tömegek felelnek egy mólnak (pl. 18 g víz). Ezek a mennyiségek éppen az Avogadro állandónyi ($6,022 \times 10^{23}$) részecskét (atomot, iont vagy molekulát) tartalmazzák. A tömeg/súly mértékegysége (gramm), valamint a mól definíciója miatt az atom- és molekulatömegeket/súlyokat grammban fejezzük ki. A súlyegységekben kifejezett atom- és molekulatömegeket nevezzük atom- illetve molekulasúlynak (gramm-atomsúly és gramm-molekulasúly). A mólszámokat a jelen levő anyag és a móltömeg grammban kifejezett mennyiségeinek hányadosaként kapjuk (mólszám (m) = tömeg / móltömeg).

2.2. A mennyiségek számszerű kifejezési módjai

2.2.1. Az adatok pontossága – értékes (szignifikáns) számok

Leszámítva a számolással kapott adatokat (értsd darabszám) minden adat pontatlan, mert valamilyen bizonytalanság társul hozzá. Ennek forrása a mérőeszköz véges teljesítő képessége (a készítése, vagy kalibrációja pontosságának határai miatt), vagy a mérést végző személy képességei (mérési hiba). Csak saját mérés esetén tudhatjuk megbízhatóan a hiba mértékét. A probléma részletes tárgyalása nélkül a következőket célszerű tudni: az adatok pontosságának becsléséhez két egymással kapcsolatos információra van szükségünk, a nagyságrendre és a szignifikáns számok ismeretére.

A szignifikáns számokat a mérés elérhető pontossága határozza meg. Általában a mért adatok utolsó értékei hordoznak bizonytalanságot, azaz „becsültnek” tekinthetők: értékes számok = biztos számok + egy becsült szám. (Pl. egy század mL beosztású pipettán leolvasott 3,745 mL érték esetén az 5-ös és a 4-es szám.) Az adatokban előforduló 0-ák értéke (szignifikanciája) helyüktől függ. Az adatszám elején lévő nullák nem értékesek, ugyanúgy az adat végén levők sem, ha a számban nincs tizedes vessző (annak ellenére, hogy az ilyen 0-ák a nagyságrendi információt hordozhatják). Viszont a 0-ák szignifikánsak, ha számsor végén vannak egy tizedes pontot is tartalmazó számban (mert utalnak a mérés pontosságára), illetve ha a számsoron belül vannak.

Mindezeket és a mérés (elérhető) pontosságát is figyelembe kell venni mérési adataink kerekítéssel történő egyszerűsítésekor. Ilyesmire többnyire akkor van szükség, amikor mérési adatunkat valamely matematikai művelettel átszámoljuk, vagy számolással nyerjük. (Pl. adott tömegű anyagot 5,4786 mL számított értékű oldószerben kell feloldani. Ha a térfogatmérő eszközünk skálabeosztása tized mL-es a 6-os és a 8-as (tizedred és ezred) értékek mérhetetlenek, a század mL (a 7-es érték) becsült, a tized mL (a 4-es érték) pedig pontatlan. Ebben az esetben a mérendő térfogatot – a fenti bizonytalanságok mellett – 5,48 mL-el tudjuk megközelíteni.) Kerekítéseket számolások közben mindig célszerű végezni, mert az értelmetlenül hosszú számok feleslegesen nehezítik a számolást, és számolási hiba veszélyét rejtik magukban.

2.2.2. Nagy és kis mennyiségek kifejezési módjai: hatványkitevős és prefixum formák

Az esetek többségében a (mért) mennyiségek sok nagyságrendnyire eltérnek a mérték egységétől. Ilyenkor a kerekítés nem tudja jelentősen csökkenteni a szám hosszát. Azért, hogy ezekben az igen kicsi, vagy nagy számokban ne kelljen sok nullát írni, ami igen kényelmetlen és hibaforrás, két eljárás van használatban. Az egyik a nagy és kis számokat hatványkitevős formává alakítja, és közben megtartja a mérték *kifejezési* egységét (skáláját, nagyságrendjét). A másik eljárás a sok nullát prefixummal helyettesíti, azaz megváltoztatja a mérték *kifejezési* egységét (skáláját). Például, a 0,0000043 liter (L) mennyiséget az első eljárás szerint $4,3 \times 10^{-6}$ liternek (exponenciális forma), a második szerint 4,3 mikroliternek (μL , prefixum forma) írhatjuk. Az utóbbiban a „ μ ”-t (mikro) prefixumnak nevezzük, amely megmutatja a skála váltás mértékét a mérték egységéhez képest (a példában hat nagyságrend lefelé) ezáltal megtartva a nagyságrendi információt, ami az „eltüntetett” (lecsereált) nullák hordoztak.

A két eljárás közötti kapcsolatot a prefixumok definíciója írja le (**2.I. táblázat**). Az SI-ben hivatalos prefixumok az alap mértékegységtől számítva három nagyságrend egységenként vannak meghatározva, azaz felfelé a 10^3 (kilo), a 10^6 stb., lefelé a 10^{-3} (milli), a 10^{-6} (mikro) stb. hatványkitevőknél. Az ettől eltérők nem SI prefixumok (nem „hivatalosak”), pl. a deci (10^{-1}), a centi (10^{-2}), vagy a hektó (10^2), noha a hétköznapi életben (nem labor környezetben) ezek is használatosak. A prefixum és hatványkitevős formákat nem szabad keverni (pl. az $5,2 \times 10^{-4}$ μg helyesen 0,52 ng), hasonló képpen a számok normál és hatványkitevős formáihoz (azaz, hatványkitevős formába nem írunk 10-nél nagyobb 1-nél kisebb értékeket, pl. 3100×10^4 -t, vagy $0,12 \times 10^{-2}$, mert ezek helyesen $3,1 \times 10^7$ és $1,2 \times 10^{-3}$). A prefixumok és hatványkitevős formák használata azonban önmagában gyakran nem elegendő a túlságosan nagy „mértékű” (nagyon hosszú) számok egyszerűbbé tételére, s szükség lehet a fentebb leírt kerekítésre is.

nagyságrend	prefixum	szimbólum
10^{12}	Tera	T
10^9	Giga	G
10^6	Mega	M
10^3	kilo	k
$10^0 (=1, \text{ az egység})$	–	–
10^{-3}	milli	m
10^{-6}	mikro	μ
10^{-9}	nano	n
10^{-12}	piko	P
10^{-15}	femto	f
10^{-18}	atto	a

2.I. táblázat. Prefixum és nagyságrend skálák és kapcsolatuk.

2.3. Az oldatokról

2.3.1. Az oldatok meghatározása és főbb formái

A valódi oldatok két vagy több komponensű, homogén keverékek, amelyekben a legnagyobb mennyiségű komponenst nevezzük oldószernek, a többit oldott anyagnak. A homogén keverékek szabad szemmel egyfázisúak. (Nem tudunk pl. két folyadék fázist megkülönböztetni bennük, nem úgy, mint pl. az emulziókban, ami ezért nem valódi oldat.) Valódi oldatokban az oldott anyagnak atomjai, molekulái, vagy ionjai vannak diszpergálva az oldószerben. Speciális esetet képviselnek azok az oldatok, amelyekben az oldott anyag nem molekulárisan van diszpergálva, de szabad szemmel mégsem látható (pl. micellák). Ezek ugyan nem molekuláris diszperziók, de mégsem képeznek külön fázist. Az ilyen oldatokat kolloid oldatnak nevezzük. Más meghatározás szerint az oldat kolloid, ha az oldott anyag részecske mérete 1 és 1000 nm között van. A nagyobb fehérjék ebbe a kategóriába esnek, azaz kolloid oldatot képeznek, noha abban a fehérjék molekulárisan vannak diszpergálva.

A laborgyakorlatban oldatok alatt általában folyadék halmazállapotú keveréket értünk. A biokémiában az esetek többségében vizes oldatokat készítünk, tehát olyat, amelyben az oldószer a víz. Ennek fő oka az, hogy általában fehérjékkel dolgozunk, amelyeknek vizes környezetben stabil a natív szerkezete. Kisebb vegyületek (pl. enzim szubsztrátok) oldására, vagy HPLC-s elválasztásakor gyakran készítünk szerves oldószeres oldatokat. Az oldatokat félkvantitatívan jellemezve beszélhetünk telítetlen, telített és túltelített oldatról, amelyek, rendre, a maximális lehetségesnél kevesebb, azzal megegyező, vagy annál több oldott anyagot tartalmaznak. (Ezek a jellemzők az oldhatóság okán hőmérséklet függők.)

2.3.2. Az oldatok mennyiségi leírása – koncentráció egységek

Elegyek komponenseinek mennyiségét kvantitatívan azok arányaiként adjuk meg. Ezeknek pontos kifejezései a koncentráció egységek segítségével írjuk le. Folyadék halmazállapotú keverékek - azaz oldatok - esetén többnyire az oldat valamilyen mennyiségére vonatkoztatjuk a komponensek mennyiségét, a mértékegységtől függően. A **mólkonzentráció** (molaritás, M) esetén például, amely a kémiában használatos mértékegység, az oldat 1 literére vonatkoztatunk a következőképpen: egy liter oldatban levő mólok száma. (Pl. 0,2 M az 0,2 mólnyi anyagot jelent 1 liter oldatban.) A kémiában is használatos (noha nem SI) koncentráció mértékegységek a különböző **százalékok** (%), amikor valaminek 100 egységnyi mennyiségére vonatkoztatunk). A térfogat és a vegyes százalék 100 mL oldatra, míg a súlyszázalék 100 gr oldatra vonatkozik. (Pl. 15 vegyes %-os oldat 15 gramm oldott anyagot jelent 100 mL oldatban.) A súlyszázalékokra, vagy súlyszázalékról történő átszámítások esetén az oldat sűrűségét is figyelembe kell venni, amennyiben az nem egy g/mL. Híg (néhány %-os) vizes oldatok sűrűsége elhanyagolható mértékben különbözik egytől, ezért ezek esetében pl. a súly és a vegyes % gyakorlatilag azonosnak vehető (azaz

3 vegyes % ~ 3 súly %). Fontos tudni azt, hogy gyakorlati okok miatt a biokémiai kísérletekhez használt oldatok esetén a fentiekől eltérő, mg/mL, vagy µg/mL „biokémikus” koncentrációegység is használatos.

2.3.3. Oldatok készítése

Miután a *homogenitás alapvető kritérium*, oldatkészítéskor fontos tudnunk az oldani kívánt vegyület oldhatóságát, amely hőmérsékletfüggő tulajdonság. A vegyületek oldhatóságát táblázatokból (szervetlen vegyületek esetén), vagy a gyártótól (pl. katalógusokban megadva) tudhatjuk meg. Az oldhatóságot a hőmérsékleten kívül az oldószer kémhatása (pH-ja), azaz az oldandó anyag sav-bázis tulajdonsága is befolyásolja. Bázisok savas, savak lúgos oldatban hajlandók jól oldódni, ezért ennek megfelelően gyakran kell változtatnunk az oldat kémhatását. Ezt legegyszerűbben valamilyen szervetlen sav, vagy bázis (rendszerint HCl, NaOH, KOH) adásával, illetve valamilyen puffer rendszer alkalmazásával érjük el. Mindkét esetben tudatában kell lennünk annak, hogy a kapott oldat több komponensű, azaz az oldani kívánt anyagon kívül a pH-t befolyásoló anyagot is tartalmaz.

A pontos koncentrációk elérése érdekében mindig olyan mérőeszközöket (mérőhenger, pipetta, mérleg stb.) használunk, amelyeknek maximális méréstartományához közel esik a mérendő mennyiség. (Pl. 70 mL oldatot nem 250 mL maximális méréstérfogatú mérőhengerben készítünk, hanem 100 mL-esben.) Mivel a leggyakrabban használt koncentrációegységek (molaritás, vegyes és térfogat %) az oldott anyag mennyiségét az oldat térfogatára vonatkoztatják (lásd fent), mindig a kész *oldat* térfogatának kell a kívántnak (számított) lennie, azaz annak nem csak az oldószert, hanem az oldott anyagokat is tartalmaznia kell. Ha pl. egy liter 4 M-os CaCl₂ oldatot kell készítenünk, akkor a kimért CaCl₂-ot nem egy liter vízhez adjuk, hanem jóval kevesebbhez (pl. 500-600 mL-hez - akár feloldódott akár nem), majd ezután egészítjük ki a térfogatot egy literre. Csak így érhetjük el, hogy az oldat (teljes) térfogata, azaz a CaCl₂ és a víz együttesen lesz egy liter. Eszerint az eljárás szerint figyelembe vesszük azt a tényt, hogy az oldott anyagnak is van hozzájárulása az összes térfogathoz (a végtérfogathoz). Egy másik ok, ami miatt mindig a kívánt végtérfogatnál kisebb térfogatú oldószert teszünk az oldani kívánt anyagot az lehet, hogy állítanunk kell a pH-t az oldódás elősegítése, vagy egy kívánt érték elérése érdekében. A pH állításhoz sav vagy lúgos oldatot használunk, amelynek térfogata többnyire előre nem ismert, és nem elhanyagolható. Ha az oldani kívánt anyagot a végtérfogatnak megfelelő mennyiségű oldószertben oldanánk, akkor (még ha az oldott anyag térfogata elhanyagolható is) a pH állítása során ezt a térfogatot biztosan túllépnénk, így oldatunk nem a kívánt (hanem kisebb és többnyire ismeretlen) koncentrációjú lenne. A helyes eljárás szerint tehát figyelembe kell vennünk azt a tényt, hogy a pufferoló (adalék) anyag térfogatát is tartalmaznia kell a végtérfogatnak.

Összekeveréskor jó, ha tudjuk mit mihez célszerű, vagy biztonságos adni. A tömény kénsav hígítása jó példa a néha kötelező elővigyázatosságra: mindig a kénsavat adjuk a vízhez, mert fordított esetben a nagy oldáshő miatt felforró és szétfröcskölődő kénsavas forró víz súlyos balesetet okozhat. A célszerű sorrend fontosságára példa a szilárd anyagok oldása: jó, ha az oldószert adjuk az oldandó anyagot, és nem fordítva, az oldószert öntjük a szilárd anyagra. Ez különösen követendő eljárás fehérjék oldásakor, ellenkező esetben előfordulhat, hogy a lassan oldódó fehérje leragad az edény aljára, ami nagyon lelassítja az oldódást.

Az oldódás sebességét többféleképpen gyorsíthatjuk: keveréssel, hőmérséklet emeléssel, ultrahang alkalmazásával, vagy a komponensek megfelelő sorrendben történő oldásával (pl. az akrilamid gélek festéséhez használt Coomassie oldat készítése esetén). Az első szokásos és „veszélytelen” módszer. Az ultrahangos kezelés, de különösen a hőmérséklet emelés azonban körültekintést igényel: figyelemmel kell lenni az oldandó anyag (hő)stabilitására. Tipikusan érzékeny anyagok a fehérjék, akár csak számos egyszerűbb szerves vegyület. Ha oldáskor a pH-t is állítanunk kell, gyakran tekintetbe kell vennünk az oldandó anyag sav-bázis érzékenységét. A nem kívánt változásokat úgy előzhetjük meg, hogy kerüljük nagy mennyiségű illetve töménységű sav, vagy lúgos oldat adását. Inkább hígabb sav, vagy lúgos oldatot használunk, kis részletekben adagolva. Néha speciális követelményeknek kell megfelelni, mint pl. fény, vagy oxigén érzékenység, illetve sterilitás. Az utóbbi esetben, ha az oldandó anyag hőérzékeny, az elkészült oldatot nem lehet hővel sterilizálni. Ehelyett szűrést kell alkalmazni.

Az elkészített oldatnak tisztának kell lennie az oldandó anyag teljes feloldódása után. Ha ez nem teljesül, akkor a kész oldatot le kell szűrni. Ehhez hagyományos eszközöket (szűrőpapírt, zsugorított üvegszűrőt), vagy egyszerű használatos, eldobható, különböző anyagú és pórusméretű szűrőmembránokat használhatunk az oldat tisztaságával szemben állított követelményeknek megfelelően. Például az FPLC-hez és HPLC-hez, valamint az optikai mérőeszközökben (fotométer, fluoriméter) használt oldatoknak lebegő részecskét nem szabad tartalmaznia, mert az káros a berendezés számára (FPLC, HPLC), illetve zavarja, néha lehetetlenné teszi a pontos mérést.

Az elkészített oldatokat jól záró műanyag, vagy üveg edényben (cső, vagy üveg) tároljuk, mert csak így tudjuk megakadályozni azt, hogy az oldószer lassú párolgása következtében a koncentráció megváltozzon. (Ez különösen illékonyabb szerves oldószerek esetén fontos.) Ezért a főzőpoharak, Erlenmeyer és más lombikok, vagy mérőhengerek (amelyeket az oldat elkészítésekor használunk) teljesen alkalmatlanok oldatok tárolására, mert még vizes oldatok esetén sem teljesítik a biztonságos tárolással kapcsolatos fenti követelményt. A legtöbb szervetlen és szerves vegyület oldatát szobahőmérsékleten tárolhatjuk, de a biokémiában vannak oldatok, amelyeket hűtőszekrényben, vagy fagyasztva kell tárolni. Az utóbbi a kémiai és mikrobiológiai stabilitás érdekében szükséges. Amennyiben nem sterilizáltuk őket, a fehérjék oldata, de még olyan egyszerű szervetlen vegyület oldata is, mint a foszfát sóké igen kedvelt megtelepedési helye baktériumoknak és gombáknak. (Ezek megjelenését az oldat lassú megzavarosodása és gyakran kellemetlen szagúvá válása jelzi). Az is előfordulhat, hogy az enzimek (pl. proteázok) oldatban lassan aktivitásukat veszítik. A hűtés, amely esetükben többnyire 0 °C alá történő hűtést jelent, ha teljesen megakadályozni nem is tudja ezeket a folyamatokat, de jelentősen lassítani igen.

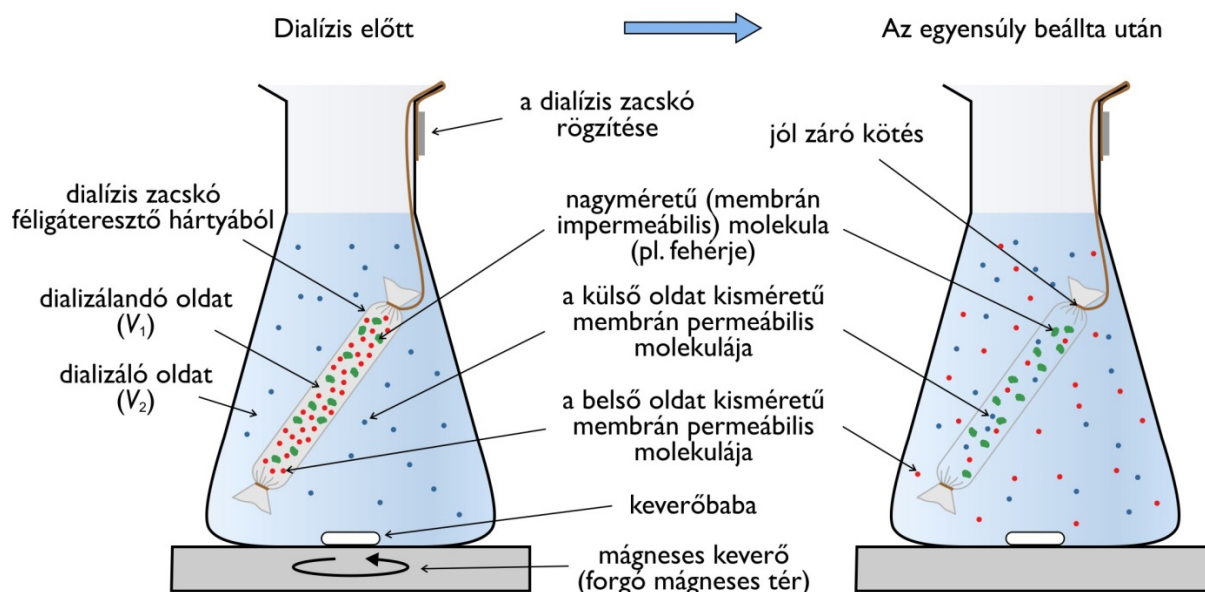
Az oldatokat tároló edényeket mindig felirattal kell ellátni, amelynek legalább addig kell olvashatónak maradnia, amíg az oldatra szükségünk van, vagy el nem fogy. Egy-egy oldott anyagot tartalmazó oldat esetén a koncentráció mellett az anyag nevét, szervetlen vegyület esetén képletét írjuk az üvegre. A legtöbb esetben azonban az oldat sokkomponensű. Ilyenkor csak akkor van módunkban minden komponens nevét és koncentrációját feltüntetni, ha azok egyszerűen (pl. képlettel) jelölhetők. A sokkomponensű oldatoknak többnyire saját, megkülönböztető nevük van, ami az adott laboron belül egyértelmű (pl. aktiváló oldat, szonikáló puffer, 10×reakciókeverék, stb.). Számos esetben ezek az oldatnevek „nemzetközi”, mert valamilyen széles körben alkalmazott eljáráshoz tartoznak. Tipikusan ilyenek a reagensek (pl. Bradford reagens, amelyet fehérjekoncentráció mérésre használunk), és a tápoldatok nevei (pl. LB, vagy 2YT stb., amelyeket baktériumok növesztésére használunk). Az oldat készítésének az időpontja is fontos lehet, ezért célszerű azt is feltüntetni.

2.4. Dialízis

2.4.1. A dialízis elve

A dialízis egy olyan eljárás, amit az élet számos területén alkalmaznak, ahol valamely oldat oldott anyag mennyiségét, vagy összetételét kívánják megváltoztatni. A biokémiai laborban a dialízist a fehérje oldatok só és más kismolekulájú vegyület-tartalmának megváltoztatására használjuk, ami többnyire utóbbiak koncentrációjának a csökkentését jelenti, de gyakran összetételüket is változtatjuk eközben.

A dialízis egy diffúzió alapuló eljárás, amelyben oldott anyagok két folyadéktér közötti mozgását korlátozzuk, többnyire méretük szerint. (Ritkábban használt esetben a diffúziót töltés alapján is korlátozhatjuk.) A méret szerinti korlátozást porózus anyaggal érjük el, ami többnyire féligáteresztő hártya, úgynevezett dialízis membrán. Ez csak egy bizonyos méretnél kisebb részecskék számára átjárható. A dialízis membrán a biokémiai laborban a leggyakrabban egy két végén szorosan bezárt (elkötött) cső, amit dialízis „zacskónak” is nevezünk (2.1. ábra). Ebbe a (V_1 térfogatú) zacskóba töltjük a dializálandó oldatot (belső oldat). Ezután a zacskót egy nagy (V_2 térfogatú, ún. dializáló oldatba (külső folyadék tér) helyezük, amit lassan kevertetünk a zacskóból kiáramló sók diffúziójának segítésére, azaz, hogy a sók koncentrációjának a két folyadéktér közötti kiegyenlítődése gyorsabban bekövetkezzen. Ha a két folyadéktér térfogata között nagy a különbség ($V_2 \gg V_1$, pl. 10L és 0,1L, 100-szoros különbség), akkor az egyensúly beállta után a belső oldatban lévő kis méretű molekulák koncentrációjának hígulása $V_1/(V_1+V_2)$ sokkal nagyobb lesz, mint a külső oldatban levő kis molekulák koncentrációjának hígulása, $V_2/(V_1+V_2)$. Jó közelítéssel tehát azt mondhatjuk, hogy a külső oldat koncentrációja (és összetétele) lényegében változatlan marad, és - a két folyadéktér között kialakult egyensúly miatt - a belső oldat kis molekuláinak koncentrációja (és összetétele) is ezzel lesz azonos.



2.1. ábra. Dialízis a biokémiai laborgyakorlatban.

2.4.2. A dialízis gyakorlati vonatkozásai és alkalmazása

Fontos kérdés a dialízis hatékonysága, azaz milyen mértékűnek tekinthető a belső oldat só koncentrációjának változása és só összetételének kicserélése. A dialízis fenti leírásából az következik, hogy ez a két folyadékter területének különbségétől függ. Ezért igyekszünk minél nagyobb (V_2) térfogatú dialízis oldatot használni. A dialízis hatékonyságát azonban még jobban fokozhatjuk úgy, hogy két-, vagy több-lépéses dialízist végzünk (az egyensúly beállta után a külső oldatot frissre cseréljük). Ekkor a belső oldat hígulása $[V_1/(V_1+V_2)]^n$ lesz, ahol n a lépések száma. Könnyű belátni, hogy kétlépéses dialízissel nagyobb hatékonyság érhető el 50-szeres térfogatkülönbség mellett is, mint egyetlen 100-szoros térfogatkülönbséggel végzett dialízissel.

A dialízist nem csak a külső oldat kevertetésével gyorsíthatjuk, hanem a belső oldat felület/térfogat arányának növelésével is, hiszen a diffúzió sebessége a keresztmetszettel egyenesen arányos. Praktikusabb tehát vékonyabb, hosszabb dialízis zacskót választani, mint rövidebbet és vastagabbat.

A féligáteresztő hátrtyán nem csak a sók és más kisméretű oldott molekulák tudnak átjutni, hanem az oldószer (esetünkben a víz) is. Az oldószer nettó áramlási irányát és mértékét a belső és a külső oldat oldott anyagának teljes koncentráció különbsége szabja meg úgy, hogy az oldószer mindig a hígabb oldat felől a töményebb felé áramlik. A belső oldat membránon átjutni nem tudó oldott anyagának egyensúlyi koncentrációját ezért az oldószer diffúziója is befolyásolhatja. Mivel a belső oldat összes oldott anyag koncentrációjába a dialízis zacskón kidiffundálni nem tudó nagyobb méretű molekulák is beleszámítanak, a gyakorlatban a nettó oldószer-áramlási irány szinte mindig a belső oldat felé mutat. Emiatt a belső oldat térfogata növekszik, ami csak a membránon átjutni nem tudó anyag(ok) koncentrációját csökkenti, az átjutni tudókat nem, még ha a relatív növekedés nagy is volna. Azonban a relatív térfogat növekedés csak korlátozott lesz, egyrészt mert a nagyméretű, impermeábilis molekulák koncentrációja kicsi (kisebb, mint a kicsi, permeábiliseké), másrészt, mert a dialízis zacskó számottevő térfogat növekedésre képtelen. A gyakorlatban néha mégis fellépő 5-20% térfogat növekedés oka az, hogy a zacskóba (a belső oldat felett) változó térfogatú levegőt is bezárunk, amit a bediffundáló oldószer össze tud nyomni. Mindent egybevetve a legtöbb esetben a nagyméretű molekulák (fehérjék) koncentrációjának csökkenése a dialízis során elhanyagolhatóan kevés. A belső folyadékter növekedése inkább technikai szempontból figyelemre méltó, mert ahhoz (gyakran jelentős) nyomásnövekedés is társul. Ezért ha a membrán anyagában valahol „rejtett” gyengeség van, akkor a nyomás növekedése következtében a zacskó kiszakadhat, ami a dializálható anyagunk (pl. fehérjepreparátumunk) teljes elvesztésével jár. Ennek elkerülésére használat előtt célszerű a zacskót vízzel megtöltve nyomáspróbának alávetni. A nyomásnövekedés másik veszélye a dialízis befejezésekor, a zacskó kinyitásakor van. Ha nem elég óvatosan járunk el, akkor a nyomás alatt levő belső oldat kispriccel anyagvesztést okozva.

A biokémiai gyakorlatban fehérje tartalmú oldatokat szoktunk dializálni leggyakrabban frakcionált ammónium szulfátos kicsapás után (lásd 5. fejezet) és ioncserélő kromatográfia előtt vagy után (lásd 6. fejezet). A használt

membránok méretszelektivitása (méretkizárása) különböző lehet. Egy 10 kDa-os membrán pórusai például 10 kDa-nál nagyobb méretű részecskékre átjárhatatlanok.

Az élettudományok területén, a dialízis biokémiai laborgyakorlaton kívüli alkalmazása a gyógyászati célú hemodialízis, azaz a művese kezelés során. Az elvi különbség a két alkalmazás között abban van, hogy az utóbbiban a dialízis a két folyadéktér folyamatos ellenáramoltatása mellett valósul meg: mind a belső oldatot (ami itt a beteg vére), mind a külsőt pumpák segítségével áramoltatják. Tehát egy ilyen elrendezésben a belső folyadéktér is „nyitott”, azaz nem „zacskóban” van, hanem csőben áramlik. Sőt, a diffúzió fluxusának növelése érdekében nagyszámú, kapilláris keresztmetszetű csőköteget alkalmaznak (ezt hívják művesének), amivel rendkívüli mértékben megnövelik a felület/tréfogat arányt. A külső, dializáló oldat összetétele igen speciális, különleges követelményeknek kell megfelelnie. A művese készülék pedig bonyolult műszer, mert folyamatosan biztosítani kell a megfelelő nyomásokat, hőmérsékletet, és azt, hogy a beteg felé távozó vérbe ne kerülhessen légbuborék, ami az halálos következményekkel járhat.

3. fejezet - Ionizációs egyensúlyok

szerző: Venekei István

3.1. Savak és bázisok ionizációs egyensúlya vizes oldatokban

Az oldott anyagoknak két fő csoportja van. Az egyik növeli a vezetőképességet az oldószeréhez képest, mert ionokat disszociál (bocsát ki) oldódáskor. Ezek az elektrolitok. A másik fő csoport a nem elektrolitoké, amelyek nem növelik a vezetőképességet (pl. ilyen a glükóz). Ezeknél disszociációról nem beszélhetünk. Az elektrolitoknak két csoportja van, az erős és a gyenge elektrolitoké. Az előbbieket lényegében teljesen (100 %-ban) disszociáltak. Ezek mindig ionos vegyületek (ionkötést tartalmaznak). Gyenge elektrolitok lehetnek ionosak és nem ionosak. Az utóbbiakból a disszociáció során ionok keletkeznek, ezért ezek disszociációját ionizációnak nevezzük. A gyenge elektrolitok disszociációjának egyensúlya többnyire a nem disszociált/ionizált vegyületforma irányában van eltolva. **Gyenge savak** ionizációjukkor protonokat bocsátanak az oldatba az alábbiak szerint:



ahol AH a gyenge savat, A⁻ pedig annak anionját szimbolizálja.

Híg oldatokban a kialakuló egyensúly a tömeghatás törvényével írható le:

$$\frac{[\text{A}^-] \times [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{AH}] \times [\text{H}_2\text{O}]} = K_{\text{eq}} \quad (3.2)$$

Egyszerűsítve:

$$\frac{[\text{A}^-] \times [\text{H}^+]}{[\text{AH}]} = K_a \quad (3.3)$$

ahol K_{eq} a reakció egyensúlyi állandója, $[\text{H}_3\text{O}^+] = [\text{H}^+]$, $K_a = K_{\text{eq}} \times [\text{H}_2\text{O}]$ a gyenge sav ionizációs állandója ($[\text{H}_2\text{O}] \sim 55,5 \text{ M}$, állandó).

Mivel a K_a értékek ismertek (**3.I. táblázat**) és $[\text{A}^-] = [\text{H}^+]$, tehát a $[\text{H}^+]$, s abból pedig a pH, számítható.

	K	pK
H ₂ CO ₃ /HCO ₃ ⁻	4,30×10 ⁻⁷	6,37
HCO ₃ ⁻ /CO ₃ ²⁻	5,60×10 ⁻¹¹	10,25
H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻	7,52×10 ⁻³	2,12
H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻	6,23×10 ⁻⁸	7,21
HPO ₄ ²⁻ /PO ₄ ³⁻	2,22×10 ⁻¹³	12,67
NH ₄ OH/NH ₄ ⁺	1,77×10 ⁻⁵	4,75
CH ₃ COOH/CH ₃ COO ⁻	1,76×10 ⁻⁵	4,75
R-NH ₃ ⁺ /R-NH ₂	1,58×10 ⁻¹¹	10,80

3.I. táblázat. Néhány gyenge sav és bázis ionizációs állandója (K_a , K_b) és pK-ja.

A **gyenge bázisok** ionizációjának egyik módja az, amikor OH⁻ ionokat bocsátanak az oldatba az alábbiak szerint:



ahol BOH a gyenge bázist, B⁺ pedig annak kationját szimbolizálja.

A kialakuló egyensúlyt a tömeghatás törvényével leírva:

$$\frac{[\text{B}^+] \times [\text{OH}^-]}{[\text{BOH}]} = K_b \quad (3.5)$$

ahol $K_b = K_{\text{eq}} \times [\text{H}_2\text{O}]$ a gyenge bázis ionizációs állandója.

Mivel a K_b értékek ismertek (**3.I. táblázat**), és $[\text{B}^+] = [\text{OH}^-]$, az $[\text{OH}^-]$, majd abból a pOH, számítható. A

$$14 = \text{pH} + \text{pOH} \quad (3.6)$$

összefüggés segítségével pedig a pOH-ból a pH-t számíthatjuk.

A gyenge bázisok ionizációjának másik módja az, amikor protonokat kötnek meg az oldatból, amelyek pl. a víz ionizációjából keletkeznek, s ezzel eltolják a víz ionizációs egyensúlyát. Ez a protonálódás jellemző a szerves bázisok ionizációjára, mint amilyenek az aminok és az iminek. Egy R-NH₂ általános képletű primer amin esetében:



Mint az látszik, ez a folyamat valójában hidrolízis, ezért az egyensúlyt a következő egyenlet írja le:

$$\frac{[\text{R-NH}_3^+] \times [\text{OH}^-]}{[\text{R-NH}_2]} = K_h \quad (3.8)$$

ahol $K_h = K_{\text{eq}} \times [\text{H}_2\text{O}]$, a hidrolízis állandó.

A savak és bázisok Broensted-Lowry elmélete szerint azonban a sav proton donor, a bázis proton akceptor, és a sav és anionja, valamint a bázis és kationja ún. konjugált párt alkot. Így példánk esetében az R-NH₂ forma a bázis (proton akceptor), míg az R-NH₃⁺ forma a sav (proton donor). Ennek alapján lehetőségünk van tehát a gyenge szerves bázisok viselkedését gyenge savként leírni, példánk esetében az alábbiak szerint:



A kialakuló egyensúlyt a tömeghatás törvényével leírva a (3.3) egyenlettel azonos egyenlethez jutunk:

$$\frac{[\text{R-NH}_2] \times [\text{H}^+]}{[\text{R-NH}_3^+]} = K_a \quad (3.10)$$

ahol K_a savi disszociációs állandó, amely a bázisforma hidrolízis állandójával a $K_a = 10^{-14} \times (K_h)^{-1}$ egyenlet szerinti összefüggésben van.

A (3.9) és (3.10) egyenlet alapján tehát az R-NH₃⁺ egy gyenge szerves sav. Azonban amint azt a **3.I. és 3.II. táblázat** mutatja egy szerves bázis protonált formája jóval gyengébb sav, mint a legtöbb gyenge sav. (Egy sav, vagy bázis annál gyengébb minél kisebb a disszociációs állandója.)

A tömeghatás érvényesülése következtében a gyenge savak és bázisok ionizációjának mértékét az oldat pH-jával (pl. erős sav vagy bázis hozzáadásával) befolyásolni tudjuk. Ha egy gyenge savhoz erős savat (pl. HCl-t) adunk, ionizációja visszaszorul. Megfelelő mennyiségű erős sav hozzáadásával el tudunk érni olyan pH-t, ahol a gyenge sav ionizációja elhanyagolhatóvá válik, azaz lényegében minden molekula AH formában lesz jelen az oldatban.

Ha erős bázist (pl. NaOH-t) adunk, akkor az ellenkezőjét, azaz teljes ionizációt is elérhetünk, ahol a gyenge savnak lényegében minden molekulája A^- formában lesz jelen az oldatban.

A fehérjék építőkövei az aminosavak, melyek legalább kettő, de oldalláncuk miatt némelyek további ionizációra hajlamos gyenge sav illetve gyenge bázis típusú csoportokat tartalmaznak (lásd 3.II. táblázat).

	$-\text{COOH}$ (pK_{a1})	$-\text{NH}_3^+$ (pK_{a2})	R (oldallánc)
glicin	2,34	9,60	–
metionin	2,28	9,21	–
lizin	2,18	8,95	10,53
arginin	2,17	9,04	12,48
aszparaginsav	1,88	9,60	3,65
glutaminsav	2,19	9,67	4,25
hisztidin	1,82	9,17	6,00

3.II. táblázat. A glicin és az oldalláncukban ionizálódó aminosavak pK_a értékei.

Erős sav vagy bázis adásakor tulajdonképpen titrálunk: sav adásakor az A^- formát, míg bázis adásakor az AH formát titráljuk. Eközben mindig be tudunk állítani egy olyan pH értéket, ahol a gyenge sav vagy bázis ionizációja éppen 50%. Az egyensúlyokat ezeknél a titrációs pontoknál a (3.3), (3.5), vagy a (3.10) egyenletek írják le aszerint, hogy gyenge savról, vagy gyenge bázisról van szó. Az AH gyenge sav esetében ilyenkor tehát $[\text{AH}] = [\text{A}^-]$. Ugyanakkor most $[\text{A}^-] \neq [\text{H}^+]$, mert a pH-t (a $[\text{H}^+]$ -t) jórészt az oldathoz adott erős sav, vagy erős bázis határozza meg (az AH sav disszociációjából származó protonok mennyisége most elhanyagolható az erős savból származókéhoz képest). Ezért a gyenge sav ionizációját leíró (3.3) egyenlet az $[\text{AH}]/[\text{A}^-] = 1$ miatt a következőre egyszerűsödik:

$$K_a = [\text{H}^+] \quad (3.11)$$

Az egyenlet logaritmusát képezve, és -1-gyel megszorozva a következőt kapjuk:

$$\text{pK}_a = \text{pH} \quad (3.12)$$

mivel $-\lg K_a = \text{pK}_a$, és $-\lg[\text{H}^+] = \text{pH}$. A (3.12) egyenletből adódik a pK_a (és a pK_b , általánosan a pK) értelmezése: a pK egy pH, illetve pOH érték, nevezetesen az a pH, illetve pOH ahol a gyenge sav, illetve bázis ionizációja éppen 50%. (Minél gyengébb egy sav, vagy bázis pK értéke annál nagyobb.)

Ha a gyenge sav, vagy bázis oldatához adott erős sav vagy bázis a pH-t olyan értékre állítja, ahol az AH ionizációja nem 50%, akkor, pl. egy gyenge sav esetét véve, a (3.3) egyenletet nem egyszerűsíthetjük, mert $[\text{AH}] \neq [\text{A}^-]$. Ha most az egyenletet logaritmálással és -1-gyel való szorzással transzformáljuk, majd kifejezzük belőle a pH-t, akkor a következőhöz jutunk:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \lg \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]} \quad (3.13)$$

Ez az összefüggés a pK_a és a pH között, amelyet **Henderson-Hasselbalch egyenletnek** hívjuk, egyszerűvé teszi minden olyan oldat pH-jának a számítását, amely nem egy komponensű sav-bázis rendszer, azaz amelyre $[\text{A}^-] \neq [\text{H}^+]$. (Tipikusan ilyenek a pufferek, lásd alább.) A savak és bázisok Broensted-Lowry elméletét alkalmazva a (3.13) egyenletre, annak egy még általánosabb formáját írhatjuk fel:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \lg \frac{[\text{bázis}]}{[\text{sav}]} \quad (3.14)$$

Példánkban a sav-bázis rendszer két komponense, az A^- a gyenge bázis és annak konjugált gyenge savja, az AH.

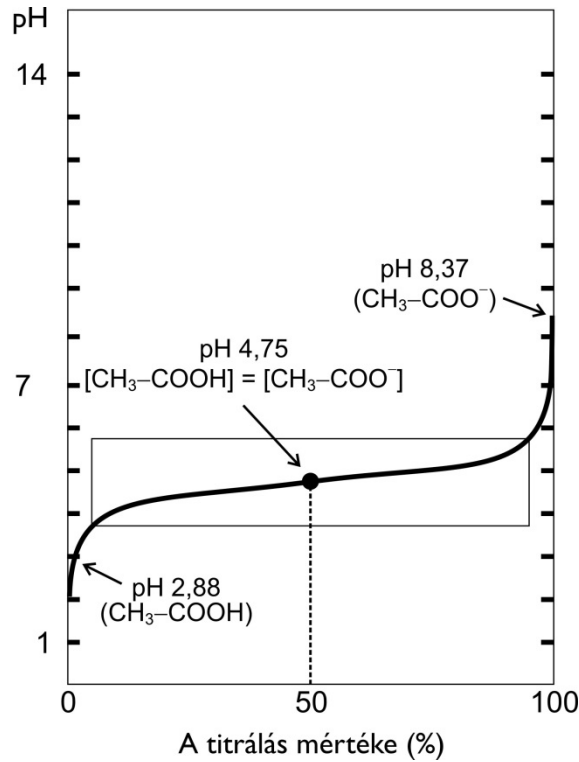
3.2. A pH-t stabilizáló sav bázis rendszerek (pufferek) és a pH hatása az ionizációra

A puffer (tompító) rendszereket összetételük és működésük alapján határozhatjuk meg:

Összetételük alapján olyan kétkomponensű rendszerek, amelyek egyszerre egy gyenge savat és egy gyenge bázist is tartalmaznak. (A fenti példák közül ilyen lehet az AH és az A^- , a BOH és a B^+ valamint az $R-NH_3^+$ és az $R-NH_2$.) Működésük alapján olyan sav-bázis rendszerek, amelyek képesek a pH-t nagyjából állandóan tartani, mert ha erős savat adunk hozzájuk, azt gyenge savvá alakítják, míg ha erős bázist adunk hozzájuk azt gyenge bázissá alakítják. Az utóbbi konjugált párt véve példának, a működés a (3.9) egyenlet alapján a következőképpen értelmezhető: Ha HCl-t adunk, akkor az az $R-NH_2$ formával (a gyenge bázissal) fog reagálni és azt $R-NH_3^+$ -má alakítja. A reakcióban lényegében felhasználódik a HCl (az erős sav), és vele azonos mennyiségű $R-NH_3^+$ képződik (a gyenge sav), vagyis az erős sav gyengévé „alakult”. Ha NaOH-t adunk, akkor az az $R-NH_3^+$ formával (a gyenge savval) fog reagálni és azt $R-NH_2$ -vé alakítja. A reakcióban lényegében felhasználódik az NaOH (az erős bázis), és vele azonos mennyiségű $R-NH_2$ képződik (a gyenge bázis), vagyis az erős bázis gyengévé „alakult”.

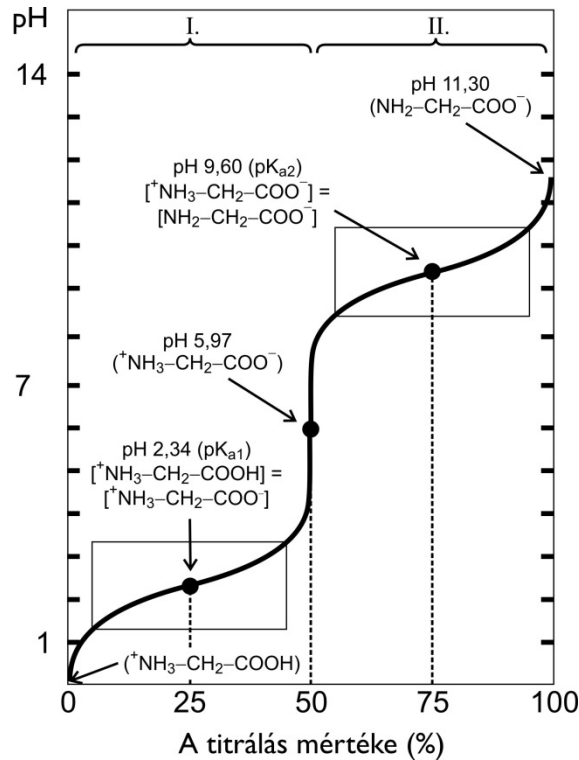
A pufferek pH-ját, és annak erős sav és erős bázis adására bekövetkező változását legegyszerűbben a Henderson-Hasselbalch egyenlettel (3.14) számíthatjuk ki. Az egyenletből kitűnik, hogy egy puffer-rendszer akkor képes a legnagyobb hatékonysággal stabilizálni az oldat pH-ját mind savas, mind lúgos eltolódással szemben, ha két komponensének az aránya egy, vagy ahhoz közeli. Azaz, egy puffer a pK érték körül (± 1 pH egység) igazán hatásos. A pufferhatás „kapacitását” természetesen a puffer koncentrációja is alapvetően meghatározza. Ez a két komponens koncentrációjának összege (Pl. $[BOH] = 0,5M$ és $[B^+] = 0,3 M$ esetén a puffer koncentrációja $0,8 M$.)

A pufferek működésének hátterében a sav-bázis ionizáció mértékének pH-függése áll. Az oldat pH-jának a gyenge sav vagy gyenge bázis ionizációjára gyakorolt hatását jól szemléltetik a titrálási görbék. A **3.1. ábra** a $0,1 M$ -os ecetsav oldat pH-jának változását mutatja erős bázissal történő titrálás hatására. A titrálási görbe egyfázisú, mert az ecetsavnak csak egy titrálható (ionizálható) csoportja van. A kezdeti, gyors pH emelkedés hamarosan nagyon lelassul, beáll egy pH plató nagyjából a pH 4,0-5,8 tartományban. Mivel itt a $[CH_3COOH]$ és a $[CH_3COO^-]$ összemérhető, azaz arányuk nagyjából 10-szeres koncentráció különbségen belül van, kétkomponensű a rendszer, együtt tartalmaz egy gyenge savat és egy gyenge bázist, tehát puffer. A plató közepe megfelel az 50%-os titrálásnak, ahol $[CH_3COOH] = [CH_3COO^-]$, és ezért a (3.13) és a (3.14) egyenletek szerint a pH éppen a pK_a . A pH plató után (a pufferkapacitás kimerítése után) a pH ismét gyorsan emelkedik, és hamar elérkezünk a titrálási lépcső tetejére, ahol a titrálás (az ecetsav semlegesítése) 100%-os.



3.1. ábra. 0,1 M-os ecetsav oldat titrálási görbéje. A téglalappal jelölt rész azt a tartományt mutatja ahol a puffer jól használható.

A **3.2. ábrán** a 0,1 M-os α -aminoecetsav ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, glicin) titrálási görbéjét látjuk. A titrálás kétfázisú, mert ebben a vegyületben két titrálható (ionizálható) csoport van, a karbonsav és az amino-csoport. (Ennek megfelelően a glicinnek két pK_a értéke van.) A karbonsav erősebb sav, mint az amino csoport (kisebb a pK_a -ja – lásd a 3-II. táblázatot), protonját ez adja le könnyebben, ezért először ez titrálódik, ha a titrálást a savas tartomány felől végezzük (I. fázis). Az első pH plató közepén (25%-os titrálás) a pH ennek a csoportnak a pK_a -jával ($\text{pK}_{a1} = 2,34$, lásd 3.II. táblázat) egyezik meg. Az első titrálási lépcső tetején a karbonsav csoport titrálása (semlegesítése) 100%-os, a vegyület titráltsága pedig 50%-os, mert az amino csoport még nincs megtitrálva. Folytatva az erős bázis adását, a II. fázisban újabb pH plató következik, most az amino csoport pufferoló hatása miatt. Ennek középpontjában (75%-os titrálás) a pH az amino csoport pK_a -jával ($\text{pK}_{a2} = 9,60$, lásd 3.II táblázat) egyezik meg. Azoknak az aminosavaknak, amelyek oldalláncukban is tartalmaznak ionizálható csoportot, szintén mutatnak egy harmadik titrálási lépcsőt is (mivel három pK_a értékük is van, lásd a 3.II táblázatot).



3.2. ábra. 0,1 M-os glicin oldat titrálási görbéje.

A glicin első titrálási lépcsőjének tetején a karbonsav csoport teljes disszociációja miatt a molekulán itt egy teljes negatív töltés lesz. Ugyanakkor az amino csoport még teljesen titrálatlan, teljesen ionizált (lásd a (3.9) egyenletet), ami a molekulának itt teljes pozitív töltést kölcsönöz. Az glicin tehát így fog kinézni 50%-os titráltságkor: $^+\text{H}_3\text{N-CH}_2\text{-COO}^-$. Ezt a formát ikerionosnak mondjuk (idegen szóval „zwitterion”). Mivel ebben az állapotában a glicin össztöltése nulla, és a nulla össztöltésű (lényegében töltetlen) molekulákra az elektromos erőter nem hat, a glicinnek ezt az állapotát izoelektromos állapotnak, azt a pH-t pedig ahol ez előáll izoelektromos pontnak (pI) nevezzük. Általánosságban izoelektromos pontról olyan molekulák esetében beszélhetünk, amelyek egyszerre tartalmaznak savasan és bázisosan ionizálódó csoportokat. Ilyen tulajdonsággal rendelkezik minden aminosav, peptid és fehérje. Az utóbbiak nagy számban tartalmaznak ilyen ionizálható, gyengén savas és bázisos csoportokat több aminosav oldalláncában is. Egy fehérje pI számításához a fehérje aminosav szekvenciájának az ismerete szükséges, mert ez ad információt a számítás során figyelembe veendő ionizálható csoportokról. Az izoelektromos pont kísérletesen is megállapítható izoelektromos fókuszálással (lásd a 7. fejezetet). Az izoelektromos pont ismerete nagy segítség a fehérjék ioncserés kromatográfiával történő tisztításánál (lásd a 6. fejezetet) és nélkülözhetetlen a fehérjék natív gélelektroforézisekor (lásd a 7. fejezetet), mert ennek birtokában tudhatjuk azt, hogy egy fehérje töltése egy adott pH-nál milyen előjelű. A $\text{pH} > \text{pI}$ esetén negatív, $\text{pH} < \text{pI}$ esetén pozitív az összes (nettó) töltés egy adott fehérjének. Ugyanis $\text{pH} > \text{pI}$ esetén a pozitívan ionizálódó csoportok ionizációja kezd visszaszorulni (kezdik protonjaikat jobban leadni) és kevésbé lesznek ionizáltak mint a negatívan ionizálódó csoportok. $\text{pH} < \text{pI}$ esetén ellenkezőleg: a negatívan ionizálódó csoportok ionizációja kezd visszaszorulni (kezdik protonjaikat jobban megtartani) és lesznek a pozitívan ionizált csoportoknál kevésbé ionizáltak.

A sav-bázis hatások tompításának, azaz a pH stabilizálásának roppan élettani jelentősége van, mert a fehérjék szerkezete, azon keresztül pedig működése igen érzékeny a bennük levő gyenge sav és gyenge bázis csoportok ionizációjának mértékére. Az élő szervezetek pH-jának szűk értéktartományban tartását két szervesetlen puffer rendszer és számos, puffer hatású szerves vegyület biztosítja. Az utóbbiak az aminosavak és fehérjék. Mivel ezekben igen nagyszámú ionizálható csoport van, puffer-kapacitásuk igen nagy. A szervesetlen puffer rendszerek közül az egyik a $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ rendszer, aminek előnye az, hogy pK_a értéke közel van a fiziológiás pH-hoz (pH 7,4), így a kapacitás maximumának közelében működhet. A másik a $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$ rendszer, aminek ugyan hátránya, hogy pK_a értéke messze esik a fiziológiás pH-tól, azonban koncentrációja meglehetősen magas, és – a többi rendszerrel ellentétben – pH-ja lélegzéssel állítható, legalábbis gerincesekben. Ennek a rendszernek a működése a szervezet savas terhelése esetén (acidózisban) kitüntetett jelentőséggel bír. Működése a szénsav instabil voltán,

annak vízre és széndioxidra történő disszociációján alapszik. Ez befolyásolja a puffer rendszer két komponensének arányát, így a puffer pH-ját, az alábbiak szerint:



Acidózis esetén a szervezetnek lehetősége van a légzés fokozásával (hiperventillációval) mindkét reakció egyensúlyát jobb felé eltolni, s így – fokozott CO₂ leadással – végső soron a proton koncentrációt csökkenteni.

Az oldatok pH-jának pontos beállítása és stabilizálása a biokémiai laborgyakorlatban is fontos a fehérjék natív állapotának, működő képességének megőrzése érdekében, valamint ioncserélő kromatográfia és sok más módszer esetén (lásd az 5-7. és a 9. fejezetet). A foszfát és acetát pufferok mellett főként - a különböző pH tartományok stabilizálására kifejlesztett - szintetikus szerves vegyületekből álló puffer rendszereket használjuk. Az egyik leggyakrabban használt pufferoló rendszer a TRIS / TRIS-HCl (trisz-hidroximetilamino-metán, N(CH₂OH)₃).

3.3. A pH mérése

A hagyományos, pH érzékeny festék rendszereket használó indikátor papírok csak hozzávetőleges pH becslésre alkalmasak. A pontos mérésre elektrokémiai alapon van lehetőség. A hidrogén (H/H⁺) elektróddal történő mérés azonban nem jön szóba annak körülményessége és veszélyessége miatt. A gyakorlatban az üveg felületek gyors és reverzibilis H⁺ adszorbeáló képességét, és az annak nyomán kialakuló, a [H⁺]-tól függő potenciált használjuk ki a pH mérésére. A pH elektródok tehát üvegből készülnek. Az elektród végén egy gömbszerűen kiképzett üveg membrán egy belső folyadékot zár körbe. Ennek a folyadéknak a pH-ja, így a belőle az üvegen membrán belső felületén adszorbeálódott H⁺ mennyisége is, állandó. Amikor az elektródnak ezt a gömbszerű végét a mérendő oldatba mártjuk, az üveg kívülről is adszorbeál (vagy lead) protonokat az oldat pH-jától függő mennyiségben. Az üvegelektrod potenciálja a két oldalon adszorbeálódott H⁺ mennyiségének különbségével arányos, ami viszont – a fentiek alapján – csak a külső oldat pH-jától függ. Ezt a potenciált egy referencia elektród potenciáljához viszonyítva (amely egy, az üvegelektrodba épített, nem polarizálódó, rendszerint kalomel, vagy ezüst elektród, az üvegelektrod megméri, és ha elektródunkat előzetesen ismert pH-jú oldatokkal már kalibráltuk, akkor pontosan megállapíthatjuk a pH-t.

3.4. Megértést tesztelő feladatok

1. Adjunk magyarázatot a (3.7) reakció egyensúlyi helyzetére, miért ellentétes a (3.1) és (3.4) ionizációs reakciókéval?
2. Bizonyítsuk be a K_a és a K_b közötti összefüggést, és annak eredményeképpen értelmezzük a konjugát sav és bázis erőssége között fennálló kapcsolatot!
3. Vezessük le a (3.13) egyenletet egy gyenge bázisból (BOH) képzett puffer esetében!
4. Hogyan változik a pufferok pH-ja a hígítással?
5. Magyarázzuk meg, hogy az ecetsav teljes semlegesítésekor (100%-os titráláskor) a pH miért nem 7,0!
6. Rajzoljuk fel egy BOH képletű, 0,1 M-os gyenge bázis titrálási görbét és adjuk meg ionizációs állapotait! (pK = 9,8)
7. Befolyásolja-e a titrálási plató közepét jellemző pH értéket az, hogy mi a titrált oldat koncentrációja?
8. Rajzoljuk fel a lizin, az arginin, a glutaminsav, az aszparginsav és a hisztidin titrálási görbéit a 3.II. táblázatban megadott pK_a értékek segítségével!
9. Állapítsuk meg a 8. feladatban felsorolt aminosavak izoelektromos pontját!
10. Számítsuk ki mekkora töltés van egy hisztidin oldalláncon pH 7,4-en és pH 7,6-on!
11. Becsüljük meg a következő peptid izoelektromos pontját:



12. Számítsuk ki a H₂CO₃/HCO₃⁻ puffer rendszer két komponensének arányát szöveti pH-n (7,4) és a tüdő pH-ján (7,6)!

3.5. pI és töltés számítási gyakorlatok

3.5.1. Bizonyítsuk be, hogy egy oldalláncában nem ionizálódó aminosav pI értéke az amino- és a karbonsavcsoport pK_a értékének átlaga.

A „sejtés” helyessége „intuitive” belátható a töltések és ionizáltsági állapotok összefüggésének pontos értelmezésével a következőképpen: Mivel a Henderson-Hasselbalch (3.14) egyenlet szerint egy csoport töltésének mennyisége arányos a pH és a pK_a távolságával, akkor lesz az össztöltés nulla, azaz ugyanolyan mértékig deprotonált a savcsoport, mint amennyire protonált az amino csoport, ha a pH egyforma távolságra van a két csoport pK_a értékétől.

Az intuitív belátást számítással úgy tudjuk igazolni, hogy megkeressük azt a pH-t ahol a karbonsav csoport és az amino-csoport azonos mennyiségű töltést hordoz, azaz ahol ionizációjuk foka azonos. A (3.14) egyenletből egy ionizálható csoport ionizált és a nem ionizált, tehát a töltéssel rendelkező és nem rendelkező formáinak koncentrációarányát számítani tudjuk ($[-\text{COO}^-]/[-\text{COOH}]$, illetve $[-\text{NH}_2]/[-\text{NH}_3^+]$). A mól törvény szerint ez az arány azonos a töltött és nem töltött állapotú csoportok számarányával, az pedig egy csoport töltött állapotú formájának hányadával, ami viszont azonos az ionizált csoportoknak a nem ionizáltakhoz viszonyított arányával. Ebből a hányadból egy csoport ionizációs foka, azaz a rajta levő töltés mennyisége számítható. (Egy ilyen számítás menetét lásd lejjebb, a pI érték ellenőrző számításánál.) Az itt vázolt egyértelmű megfelelés, ami egy ionizálódó csoporton lévő töltés és az illető csoport két formájának koncentráció aránya között fennáll, a továbbiakban egyszerűbbé teszi a töltés számolását, mivel a töltés helyett koncentráció arányokat használhatunk. Ennek megfelelően tehát keressük azt a pH-t, ahol:

$$\frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]} = \frac{[-\text{NH}_3^+]}{[-\text{NH}_2]} \quad (3.15)$$

Az egyenlet két oldalán lévő koncentráció arányokat a Henderson-Hasselbalch (3.14) egyenletnek a karbonsav- és az amino-csoportra való alkalmazásával kapjuk. Mivel a keresett pH lesz a pI, a következő egyenleteket írjuk:

$$pI = pK_a(\text{COOH}) + \lg \frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]} \quad (3.16) \quad \text{és} \quad pI = pK_a(\text{NH}_2) + \lg \frac{[-\text{NH}_2]}{[-\text{NH}_3^+]} \quad (3.17)$$

Ezekből:

$$10^{pI - pK_a(\text{COOH})} = \frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]} \quad 10^{pI - pK_a(\text{NH}_2)} = \frac{[-\text{NH}_2]}{[-\text{NH}_3^+]} \quad 10^{pK_a(\text{NH}_2) - pI} = \frac{[-\text{NH}_3^+]}{[-\text{NH}_2]}$$

Behelyettesítve a (3.15) egyenletbe:

$$10^{pI - pK_a(\text{COOH})} = 10^{pK_a(\text{NH}_2) - pI} \quad (3.18)$$

azaz:

$$pI - pK_a(\text{COOH}) = pK_a(\text{NH}_2) - pI$$

amiből:

$$pI = \frac{pK_a(\text{NH}_2) + pK_a(\text{COOH})}{2}$$

Valóban, a pI a két pK_a érték átlaga.

A glicin
esetében
ez:

$$\frac{9,60 + 2,34}{2} = 5,97$$

Ellenőrizzük számítással, hogy a két ionizálható csoporton a töltések száma megegyező. Most a (3.15) egyenlet a következő képpen fog kinézni:

$$5,97 = 2,34 + \lg \frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]} \quad \text{és} \quad 5,97 = 9,6 + \lg \frac{[-\text{NH}_2]}{[-\text{NH}_3^+]}$$

Ezekből:

$$\lg \frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]} = 5,97 - 2,34 = 3,63 \quad \text{és} \quad \lg \frac{[-\text{NH}_2]}{[-\text{NH}_3^+]} = 5,97 - 9,6 = -3,63$$

azaz

$$\frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]} = 10^{3,63} = 4,27 \times 10^3 \quad \text{és} \quad \frac{[-\text{NH}_2]}{[-\text{NH}_3^+]} = 10^{-3,63} = 2,34 \times 10^{-4}$$

Ez az eredmény azt jelenti, hogy karbonsav csoport esetén a töltött állapotú csoport hányada $4,27 \times 10^3$ -szoros a töltetlenéhez képes. Az amino csoport esetében pedig ez a hányad $1/2,34 \times 10^{-4} = 4,27 \times 10^3$, azaz ugyanakkora. Tehát pH 5,97-es oldatban a glicin össztöltése valóban nulla, ez az izoelektromos pontja. Ugyanakkor, ezek az ezret meghaladó hányadok azt jelentik, hogy mindkét ionizálódó csoport töltése csak elhanyagolhatóan kicsit tér el az 1-től, azaz a teljes ionizációt jelentő töltéstől. Ez természetes is, mivel a pI több mint három pH egységgel tér el a két pK_a értéktől, ami azt jelenti, hogy már elegendően lúgos a karbonsav csoportnak a teljes ionizációhoz, és ugyanakkor még túl savas az amino csoportnak a deprotonálódáshoz. Így a zéró össztöltés egy teljes negatív és egy teljes pozitív töltés mellett jön létre. A következő példában, ahol a pI sokkal közelebb van a pK_a értékekhez látni fogjuk, hogyan valósul meg a nulla össztöltés részleges töltések (részleges ionizációk) mellett.

3.5.2. Bizonyítsuk be, hogy az aszparaginsav pI értéke a benne levő két karbonsav csoport pK_a értékének átlaga

Mielőtt a bizonyítást elvégeznénk, érdemes elgondolkodni milyen eredményt várhatunk. Könnyű belátni a következőket: (1) Nem lehet mind a három ionizálható csoport (a két karbonsav és az amino) teljesen ionizált, mert az nulla helyett -1 töltést adna az aszparaginsavnak. (2) A két karbonsav csoport (az α-szénatomon és az oldalláncban levő, -COOH_(α), és -COOH_(R)) együttesen fogja az aminocsoport töltését semlegesíteni. (3) Ezért a két karbonsav töltése együttesen nem lehet több mint egy, ami olyan pI értéket tételez fel ahol mindkét karbonsav csoport töltése csak részleges. Ez azt jelenti, hogy a pI a karbonsav csoportok pK_a értékének közelébe fog esni. (4) Figyelembe véve a 3.II. táblázat adatait (pK_{a(α)}=1,88 és pK_{a(R)}=3,65) valamint a pK_a jelentését (lásd fentebb) ez olyan alacsony pH ahol az amino csoport teljesen protonálva van, így egy teljes pozitív töltést hordoz (lásd az előző pI számolás eredményének értelmezését.) A két karbonsav csoport együttes töltésének ezért tehát egynek kell lennie a pI-nek megfelelő pH-n. Ezt az elvárás a következőképpen írhatjuk le tömören:

$$\frac{[-\text{COO}^-_{\alpha}]}{[-\text{COOH}_{\alpha}]} + \frac{[-\text{COO}^-_{R}]}{[-\text{COOH}_{R}]} = 1 \quad (3.18)$$

(A (3.18) egyenlet írásánál ismét éltünk azzal az egyszerűsítéssel, amit egy ionizálódó csoporton lévő töltés és az illető csoport két formájának koncentráció aránya között fennálló egyértelmű megfelelés tesz lehetővé.)

Mivel itt mindkét csoport azonos típusú (anionná ionizálódik), eltérő pK_a értékük miatt nincs olyan pH, ahol ezek azonos töltésmennyiséget hordozhatnának úgy, hogy közben a töltésük összege egy. (Szemben a két, különböző (pozitív és negatív) töltésűvé ionizálódó csoport esetével, ahol mindig ez a helyzet – lásd az előbbi példát.) pH>3,65 esetén ugyanis (a (3.12) egyenlet szerint) mindkét karbonsav ionizációjának foka nagyobb lenne 50%-nál, ami egynél nagyobb össztöltést jelentene. Ugyanezért pH<1,88 estén egyik karbonsav csoport ionizációjának a foka sem érné el az 50%-ot, s ezért az össztöltés kisebb lenne egynél. Így a pI a két pK_a érték között kell legyen, mégpedig úgy, hogy amennyivel kevesebb töltést kap az egyik karbonsav csoport 0,5-nél, annyival többet kapjon a másik. (Úgy is mondhatjuk, hogy a töltések abszolút értékének egyenlő „távolságra” kell esnie a 0,5-től annak két „oldalán”.)

Ez a helyzet csak akkor valósul meg, ha két pK_a érték egyenlő távolságra van a pI -től, azaz a pI a két pK_a átlaga. Most ennek a gondolatmenetnek a helyességét bizonyítjuk be.

A (3.16) egyenlet mintájára mindkét karbonsav csoport esetében írhatjuk:

$$pI = pK_a + \lg \frac{[-COO^-]}{[-COOH]}$$

Ebből a töltés mértékével arányos koncentráció hányadosa az ionizált és nem ionizált formáknak:

$$10^{pI - pK_a} = \frac{[-COO^-]}{[-COOH]} \quad (3.19)$$

Ezért a (3.18) egyenletet a következő képpen alakíthatjuk át:

$$10^{pI - pK_{a(\alpha)}} + 10^{pI - pK_{a(\beta)}} = 1$$

Amiből:

$$pI - pK_{a(\alpha)} + pI - pK_{a(\beta)} = 0$$

Tehát valóban:

$$pI = \frac{pK_{a(\alpha)} + pK_{a(\beta)}}{2}$$

A pK_a értékek behelyettesítésével megkapjuk az aszparaginsav pI értékét:

$$pI = \frac{1,88 + 3,65}{2} = 2,765$$

Ellenőrzés képpen számítsuk ki a két karbonsav csoporton lévő töltéseket. A megfelelő értékeket behelyettesítve a (3.19) egyenletbe:

$$10^{2,765 - 1,88} = \frac{[-COO^-]_{(\alpha)}}{[-COOH]_{(\alpha)}} \quad \text{és} \quad 10^{2,765 - 3,65} = \frac{[-COO^-]_{(\beta)}}{[-COOH]_{(\beta)}}$$

ami

$$7,67 = \frac{[-COO^-]_{(\alpha)}}{[-COOH]_{(\alpha)}} \quad \text{és} \quad 0,13 = \frac{[-COO^-]_{(\beta)}}{[-COOH]_{(\beta)}}$$

A koncentráció arány és a töltött csoport/töltetlen csoport arány azonossága miatt tehát azt mondhatjuk, hogy α -karbonsav csoport esetén a töltött csoportok hányada 7,67-szerese a töltetlenekének, míg ez a hányad csak 0,13-szoros az oldalláncban levő karbonsav csoport esetén. Ebből az ionizáció fokát - ami megfelel annak a töltésnek, ami egy ionizálható csoporton van - a töltött csoportok számának az összes csoportok számával történő osztásával kapjuk meg. Az α -karbonsav esetében tehát 7,67 ionizált állapotú csoport jut egy ionizálatlanra, ezért:

$$\text{az ionizáció foka} = \frac{\text{ionizált csoportok száma}}{\text{összes csoportok száma}} = \frac{7,67}{7,67 + 1} = 0,885 \quad (3.20)$$

Az α -karbonsav csoportnak tehát -0,885 töltése van. Az oldalláncban levő karbonsav csoport esetén pont fordítva, $1/0,13 = 7,67$ nem ionizált csoport jut egy ionizáltra, ezért:

$$\text{az ionizáció foka} = \frac{\text{ionizált csoportok száma}}{\text{összes csoportok száma}} = \frac{1}{7,67+1} = 0,115$$

Az oldalláncban lévő karbonsav csoportnak tehát -0,115 töltése van. Valóban, a két savas csoport nem egyenlően osztozik az egy negatív töltésen, és tényleg amennyivel több az α -karbonsav részesezése 0,5 töltésnél ($0,885 - 0,5 = 0,385$), pontosan annyival kevesebb az oldalláncban levőé ($0,5 - 0,115 = 0,385$).

3.5.3 Számítsuk ki egy 152 aminosavból álló fehérje izoelektromos pontját aminek első és utolsó aminosava glicin, továbbá 2 arginin, 3 lizin, 2 tirozin, 1 cisztein, 5 hisztidin és 7 aszparaginsav ionizálható oldalláncú aminosavat tartalmaz.

Mivel egy ilyen óriásmolekulában számos ionizálható csoport van, a pI számolása érthetően jóval bonyolultabb, mint egy aminosavé. Ezért az eddig alkalmazott eljárások csak a pI hozzávetőleges becslésére alkalmasak. Néhány igen ritka esetben azonban a pontos számítás menete követheti az aszparaginsav pI számítását (3.4.2), és technikailag sem sokkal nehezebb annál. Ezekben az esetekben a várható pI-nek úgy kell esnie valamely pK_a közelébe, hogy egyúttal minden más pK_a -tól legalább két pH egységnyi távolságra legyen. Ennek eldöntésére, hogy teljesül-e ez az előfeltétel, becslést kell végezni a pI várható értékére vonatkozóan. Ehhez néhány pH-n ki kell számolnunk a fehérje összes töltését. A számítások könnyebb áttekinthetőségének érdekében töltésszámítási táblázatot (**3.III. táblázat**) készítünk, amely a példánkban szereplő fehérje esetében a következőképpen néz ki az ionizálódó csoportok növekvő pK_a értéke szerint:

aminosav/ csoport	pK_a^*	szorzó faktor**	a csoport(ok) összes töltése a pH függvényében		
			pH= 7,0	6,0	6,4
-COOH(α)	2,34	1	-1	-1	-1
Asp	3,65	7	-7	-7	-7
His	6,00	5	+0,455	+2,5	+2
Cys	8,30	1	-0,048	0	~0
-NH ₃ ⁺ (α)	9,60	1	+1	+1	+1
Tyr	10,10	2	0	0	0
Lys	10,53	3	+3	+3	+3
Arg	12,48	2	+2	+2	+2
összes töltés:			-1,593	+0,5	0

3.III. táblázat. Egy fehérje töltésének a számítása. * Az aminosav nevek mellett szereplő pK_a értékek az oldalláncban lévő ionizálódó csoportra vonatkoznak, míg az α -karbonsav- és az α -amino-csoportra (C-terminális és N-terminális) vonatkozó értékek a 3-II. táblázatban megadott értékek átlaga. ** A fehérjében lévő aminosavak (az ionizálódó csoport típusának) a száma. (Például C- és N-terminálisból mindig csak egy van.)

A cél gyorsabb elérése érdekében mielőtt a töltések számolását elkezdjük, érdemes elgondolkodni azon melyik pH tartományban várható a pI érték. Az aszparaginsav pI számolásánál (3.5.2) alkalmazott gondolatmenet tanulsága szerint, a keresett pI érték aszerint lesz a savas, vagy lúgos tartományban, hogy ionizáltak a negatív, vagy a pozitív csoportokból van több. Minél jobban eltolódik az arány valamelyik típusú javára, annál inkább ezen csoportok pK_a értékének megfelelő pH tartományba esik a pI. Fehérjénkben a kétféle csoport száma azonos, ezért célszerű a töltés számolását pH 7-nél kezdeni.

A fehérje töltésének számolása pH 7-en:

Az α -amino-csoport töltése:

A (3.17) egyenlet mintájára:

$$pH = pK_a(NH_2) + \lg \frac{[-NH_2]}{[-NH_3^+]}$$

Behelyettesítve:

$$7,0 = 9,6 + \lg \frac{[-\text{NH}_2]}{[-\text{NH}_3^+]}$$

Ebből a korábbi számítások szerint:

$$\frac{[-\text{NH}_2]}{[-\text{NH}_3^+]} = 10^{7,0-9,6} = 10^{-2,6} = 0,0025$$

A koncentrációarányok és töltéshányadok kapcsolatáról fentebb leírtak szerint 0,0025 töltetlen oldalláncra jut egy töltött. Ennek alapján az ionizáció foka, azaz a töltés mennyisége a (3.20) egyenlet mintájára:

$$\text{az ionizáció foka} = \frac{\text{ionizált csoportok száma}}{\text{összes csoportok száma}} = \frac{1}{1+0,0025} = 0,998$$

Ez az érték igen kis mértékben tér csak el az 1-től, ezért az α -amino csoportot egy teljes töltésűnek tekinthetjük. Megközelítő számítások esetén ilyen elhanyagolással élhetünk valahányszor a pH és a pK_a eltérése legalább két pH egységnyi. Ilyen esetekben ugyanis az ionizációs egyensúly annyira eltolódik az egyik forma irányában, hogy a töltés csak néhány ezrednyit tér el az egytől, vagy a nullától. Ezt az egyszerűsítést alkalmazva, részletes számolás nélkül egy teljes töltést tulajdoníthatunk az aszparaginsav oldalláncoknak, az α -karbonsav csoportnak, a lizin és az arginin oldalláncoknak, valamint nulla töltést a tirozin oldalláncoknak. Ezzel szemben a hisztidin és cisztein oldalláncokon töltések lesznek.

A cisztein oldallánc töltése, a fentiek mintájára:

$$\frac{[\text{Cys}^-]}{[\text{Cys}]} = 10^{7,0-8,3} = 10^{-1,3} = 0,05$$

Ebből a cisztein töltése:

$$\frac{0,05}{0,05+1} \sim 0,048$$

A hisztidin oldallánc töltése pedig:

$$\frac{[\text{His}]}{[\text{His}^+]} = 10^{7,0-6,0} = 10^{1,0} = 10$$

és:

$$\frac{1,0}{10,0+1} \sim 0,091$$

Az itt megállapított töltés értékek és az egyes csoportok számának figyelembe vételével kitölthetjük a 3.III. táblázat 7-es pH-ra vonatkozó oszlopát. A töltéseket összeadva láthatjuk, hogy a fehérjének -1,593 töltése lesz. A pI tehát bizonyosan kisebb, mint 7,0, amint az következik az össztöltés pH függéséből (lásd fentebb).

Folytatva a pI várható értékére vonatkozó becslést, most pH 6-on számítjuk ki a fehérje össztöltését. Miután ebben az esetben is teljesül a pH és a pK_a értékek minimum két pH egységnyi eltérése az Asp, Lys, Arg és Tyr oldalláncokra, valamint az α -karbonsav és az α -amino-csoportra nézve, ezek töltése ugyanakkorának vehető, mint pH 7,0-en. Változni fog ellenben a cisztein és a hisztidin oldalláncok töltése. Az előbbi lényegében nullára csökken (mivel most már több, mint két egység a távolsága a pH-nak a pK_a -tól), az utóbbi viszont +0,5-re nő, ugyanis most $\text{pH}=\text{p}K_a$, és a pK_a definíciója szerint ekkor az ionizáció foka 50%. Kitöltve a 3.III. táblázat 6-os pH-

ra vonatkozó oszlopát, és a töltéseket összeadva azt kapjuk, hogy a fehérje töltése +0,5. Tehát ez a pH már a pI alatt van, azaz a pI 6,0 és 7,0 között kell legyen.

Ha most (némi joggal) feltételezzük, hogy a pI közel lesz 6-hoz, akkor várhatjuk, hogy még ez az érték is két pH egységnyi távolságra lesz a cisztein oldallánc pK_a értékétől. Tehát teljesülni látszik az a feltétel, amit fentebb szabtuk, és aminek jelentőségét most pontosabban megérthetjük. Néhány tizeddel pH 6 felett ugyanis várhatóan minden csoport töltése, még a cisztein is, elhanyagolhatóan kis mértékben fog eltérni a pH 6-on lévő töltésétől. Ezért megkísérelhetjük a pI pontos kiszámolását, a következőképpen alkalmazva az aszparaginsav pI számolásánál használt logikát: pH=pI esetén a hisztidinek töltése nélkül a fehérje össztöltése -2 lesz. Ezért (3.18) egyenlet felírásakor alkalmazott gondolatmenet itt a következő: olyan pH-t keresünk, ahol az öt hisztidintöltése együttesen semlegesíteni tudja a többi ionizálódó csoporttól származó -2 töltést, azaz

$$5 \times \frac{[\text{His}^+]}{[\text{His}]} = 2 \quad \text{tehát} \quad \frac{[\text{His}]}{[\text{His}^+]} = 2,5$$

A (3.17) egyenlet mintájára felírva a pI kifejezését, és a behelyettesítéseket elvégezve kapjuk:

$$\text{pI} = \text{pK}_a + \lg \frac{[\text{His}]}{[\text{His}^+]} = 6 + \lg 2,5 = 6,4$$

A keresett izoelektromos pont tehát 6,4. Kiszámítva az egyes csoportok töltését ezen a pH-n, majd összegezve azt nullát kell kapjunk. Elvégezve ezt az ellenőrző számítást (3.III. táblázat pH=6,4 oszlop) valóban nullát kapunk az összes töltésre.

4. fejezet - Spektrofotometria, fehérjekoncentráció mérése

szerző: Málnási-Csizmadia András

4.1. Fotometria

A spektrofotometria az egyik leggyakrabban használt analitikai eljárás a biokémiában. A módszer igen alkalmas kis mennyiségű anyag gyors, egyszerű, rutinszerű mérésére. A mérés feltétele az, hogy a vizsgált anyagnak a színeként 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 szintelen anyagnak van ezen a területen (190-320 nm) intenzív elnyelési sávja.

A spektrofotometriás mennyiségi analízisek az oldatok fényelnyelésére vonatkozó Lambert-Beer-törvényen alapulnak. A minta által elnyelt fényt a beeső és az áteresztett fényintenzitás hányadosával jellemezzük (4.1. ábra).



4.1. ábra. A beeső és az áteresztett fény. A minta által elnyelt fényt a beeső és az áteresztett fényintenzitás hányadosával jellemezzük.

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:

$$E = \log(I / I_0) = \epsilon * c * L$$

A $\log I_0/I$ 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. ϵ 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:

$$c = E / \epsilon * L$$

Ha ϵ a moláris extinkciós koefficiens, akkor a „ c ” moláris koncentrációnak adódik. L a küvetta (plánparallel üvegből, műanyagból, vagy kvarcból készült mérőedény) optikai úthosszúsága cm egységben kifejezve.

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

Régebbi fotométerekben a transzmisszió (transzmittancia) értékét mérték:

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

A transzmittancia összefüggés az extinkcióval:

$$E = \log (100 / T\%) \text{ vagyis } E = 2 - \log T\%$$

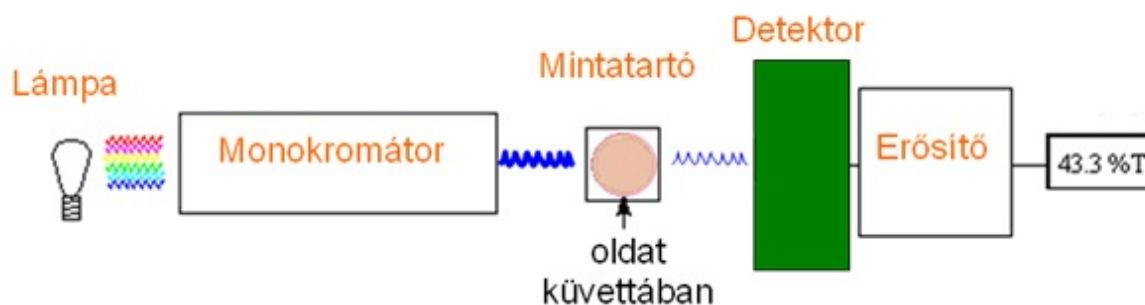
A v. E	T %
0,01	98%
0,1	79%
0,5	32%
1	10%
2	1%
3	0,1%

4.I. táblázat. Abszorbancia/extinkció és transzmittancia értékek összehasonlítása.

A **4.I. táblázat** bemutat néhány példát az abszorbancia és a transzmittancia összefüggésére. Vegyük észre, hogy $A=2$ abszorbancia értéknél a minta a beeső fény 99%-át elnyeli. Ilyen mértékű elnyelésnél a műszer detektorába csak nagyon kis intenzitású fény jut, ezért a mérés pontossága folyamatosan csökken erősen fényelnyelő minták esetében.

4.2. 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 kuvettában van), és megméri az átjutó fénysugár intenzitását. Mindehhez fényforrás, monokromátor, mintatartó, detektor és kijelző egység szükséges (**4.2. ábra**).



4.2. ábra. A fotométer vázlatos felépítése.

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 rácsos 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 (4.3. ábra). A műanyag és az üveg olcsó, de 280 illetve 320 nm hullámhossz alatt nem használhatók, mert itt túl nagy a fényelnyelésük. Rövidebb hullámhosszak esetén kvarc küvetát használunk. A küvetta 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.



4.3. ábra. Mintatartó küvetták. A küvetták leggyakrabban üvegből, műanyagból illetve kvarcból készülnek. Kvarc küvetát abban az esetben használunk, ha a fényelnyelést 320 nm-nél alacsonyabb hullámhosszon mérjük, mert ezeken a hullámhosszokon az üveg és a műanyag a fény jelentős részét elnyeli. A legtöbb küvetta belső úthossza 1 cm, térfogatuk körülbelül 1,5-3 ml. Vannak szűkített küvetták, amelyekben kisebb térfogatú oldatokat mérhetünk. Szűkített küvetták esetében célszerű sötétített falú küvetát használni az abszorbancia méréséhez. Ritkábbak a nagyobb optikai úthosszú küvetták.

Az olcsóbb készülékek általában egysugarasak, azaz egy küvetta befogadására alkalmasak. A jobb minőségű készülékek kétsugarasak, vagyis két küvettan 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.

4.3. A fotometria egyéb alkalmazási lehetőségei

A fotometriát számos más műszerrel kombinálva is alkalmazzuk. Leggyakrabban kromatográfias berendezésekkel kombinálják, amikor a kromatográfias oszlopról kifolyó mintát egy átfolyó küvettan keresztül engedik, és az átfolyó oldat fényelnyelését folyamatosan detektálják. A mérés időben változó abszorbancia görbét eredményez, amelyet kromatogramnak nevezünk. Ha a mérés során diódasoros detektort alkalmazunk, akkor egy időben több hullámhosszon egyszerre is tudjuk mérni az átfolyó minta abszorbanciáját, sőt ily módon fotometriás spektrumok sorozatát is felvehetjük.

Másik gyakori alkalmazás, amikor egyszerre nem egy minta fényelnyelését mérjük, hanem több tíz vagy több száz mintát is mérhetünk úgynevezett *plate-reader*-rel (4.4. ábra). Ezekbe a műszerekbe 6, 12, 24, 48, 96, 384 mintatartó tartalmazó lemezeket lehet behelyezni. A lemezektől függően egy-egy minta térfogata 10 μL - 10 mL lehet. Leggyakrabban a 96 lyukú lemezeket alkalmazzák, amelyek maximális térfogata 200 μL .



4.4. ábra. *Plate reader* 96 lyukú mintatartó lemezzel.

4.4. 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 kivetta legyen karcolásmentes és tiszta. A kivetta fényútba eső oldalait nem szabad megfogni.

4.5. 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. Érdemes megjegyezni, hogy bármelyik eljárást választjuk, mindegyiknél előfordulhat, hogy más-más fehérjék azonos mennyiségeire eltérő eredményt adnak. Továbbá 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 alkálikus körülmények között reagálnak 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 fehérje 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 (fénollal 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 (bovine serum albumin), 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. ammóniumsulfát, glicin, és merkaptánok) zavarja, és az inkubálási idő is kritikus. Mivel a különböző fehérjéknek más a tirozintartalma, a színképződés a különböző fehérjéknél eltérő. Ennek megfelelően a módszer azonos fehérjét tartalmazó oldatok koncentrációjának összevetésére inkább alkalmas, mint abszolút meghatározásra.

Bradford-módszer

Viszonylag 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.

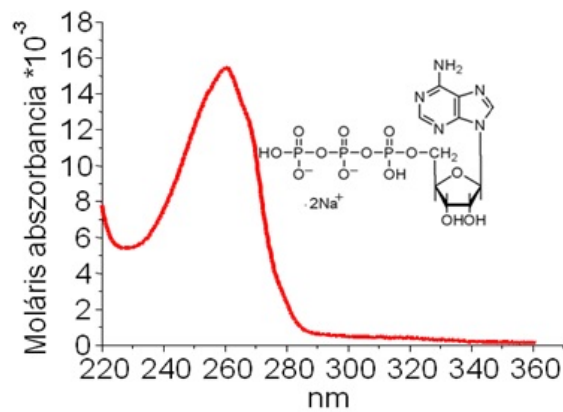
Előnye: nagyon érzékeny, a hasznos mérési tartomány 1-20 µg, és gyorsan kivitelezhető. Viszonylag kevés olyan anyag van, ami zavarja a mérést (urea és guanidin-hidroklorid jelenlétében is lehet mérni vele), de sajnos a detergenssek ilyenek. Nyomnyi mennyiségű mosogatószer is megamisíthatja a kapott eredményt.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

Spektrofotometriás módszer UV-elnyelés alapján

A módszer alapja, hogy az aromás aminosavak közül a triptofán és tirozin 280 nm környékén erős elnyelési csúcsot mutat. Előnye, hogy gyors és egyszerű. Mivel nem kell a méréshez a fehérjét kémiai reakcióba vinni, ezt az eljárást használják fehérjék ill. 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 A₂₈₀/A₂₆₀ értékét, majd egy táblázatból keressük ki a megfelelő fehérje és nukleinsav arányát. (A fehérjekoncentráció pedig 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 is nagy mértékben elnyel.

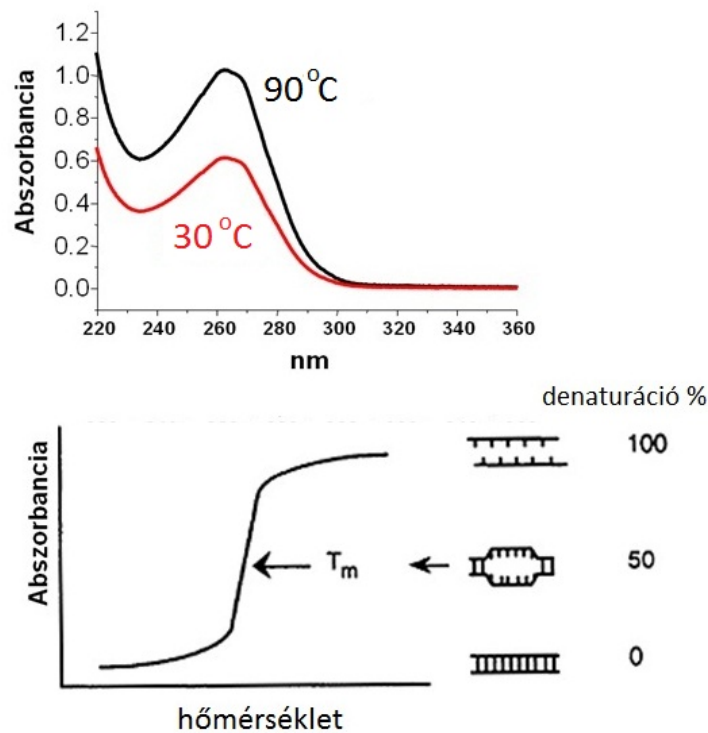
4.6. A spektrofotometria gyakorlata

4.6.1. Az ATP abszorpciós spektruma (4.5. ábra). Az elnyelési maximum 260 nm-en van, amelyért az aromás molekularészlet felelős. Ez a 260 nm-es abszorpciós csúcs a nukleinsavak spektrumában is megjelenik.



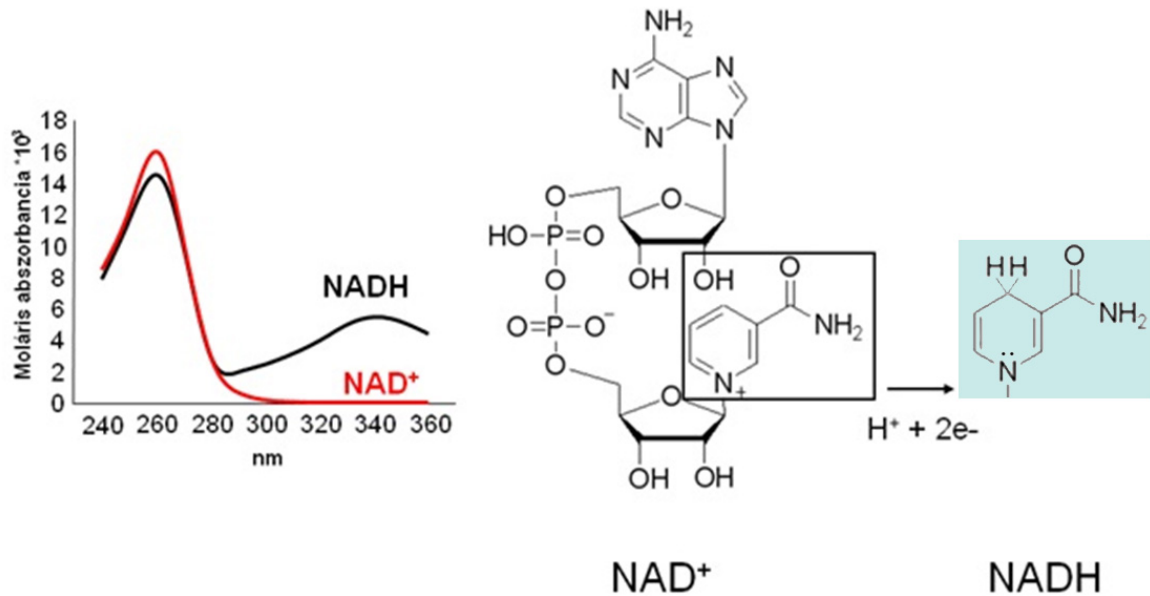
4.5. ábra. Az ATP abszorpciós spektruma.

4.6.2. A DNS hiperkróm effektus (4.6. ábra). A 260 nm-es elnyelési maximum a nukleotidok aromás csoportjainak köszönhető. A hőmérséklet hatására a DNS „megolvad”, felbomlanak a szemben levő bázisok között a hidrogén hidak, és 260 nm-en az abszorpció megnő. Ezt a jelenséget nevezzük hiperkróm effektusnak. Az átmeneti hőmérsékletet (T_m) „olvadási hőmérsékletnek” nevezzük.



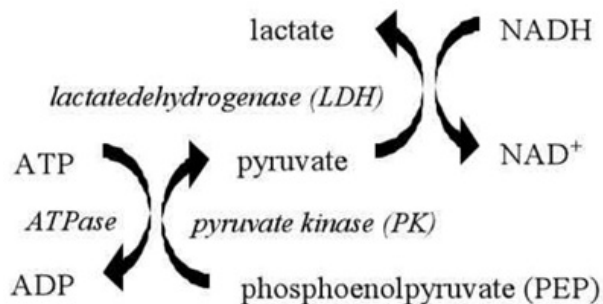
4.6. ábra. DNS hiperkróm effektus. A felső ábra a DNS spektruma 90 és 30 C^o-on, az alsó a 260 nm-es elnyelés változása a hőmérséklet függvényében.

4.6.3. A NAD és a NADH abszorpciós spektruma, molekulaszervezete (4.7. ábra).



4.7. ábra. A NAD és a NADH abszorpciós spektruma, molekulaszervezete.

A nikotinamid-adenin dinukleotidnak két aromás molekularészlete van. Az adenin rész felelős a 260 nm-es elnyelési csúcsért (ahogyan az ATP-ben, vagy a nukleinsavaknál az előző ábrákon is látható). A nikotinamid résznek csak protonált állapotban (NADH) van specifikus elnyelése 340 nm-en. Ezt a specifikus csúcsot jól lehet használni analitikai, enzimkinetikai, orvosi diagnosztikai mérésekben. Példa: ATPáz aktivitás méréskor az ATP-ből keletkező ADP mennyiséget szeretnénk kimutatni, de az ATP és ADP megkülönböztetése spektroszkópiailag nem lehetséges, 260 nm-en egyformán van elnyelésük. Ezért kapcsolt reakciót szokás használni (4.8. ábra): a vizsgált reakcióelegyhez olyan enzimeket (piruvát kináz és laktátdehidrogenáz) és szubsztrátokat (PEP, NADH) adunk, hogy az ATPáz reakció során fogyó ATP-vel arányosan oxidálódjon a NADH. Így a NADH fogyása 340 nm-en időben jól követhető. Természetesen a NADH oxidációjakor a 260 nm-es abszorpciós csúcs intenzitása nem változik, hiszen az adenin molekularészlet kémiai tulajdonsága nem változik a reakció alatt.

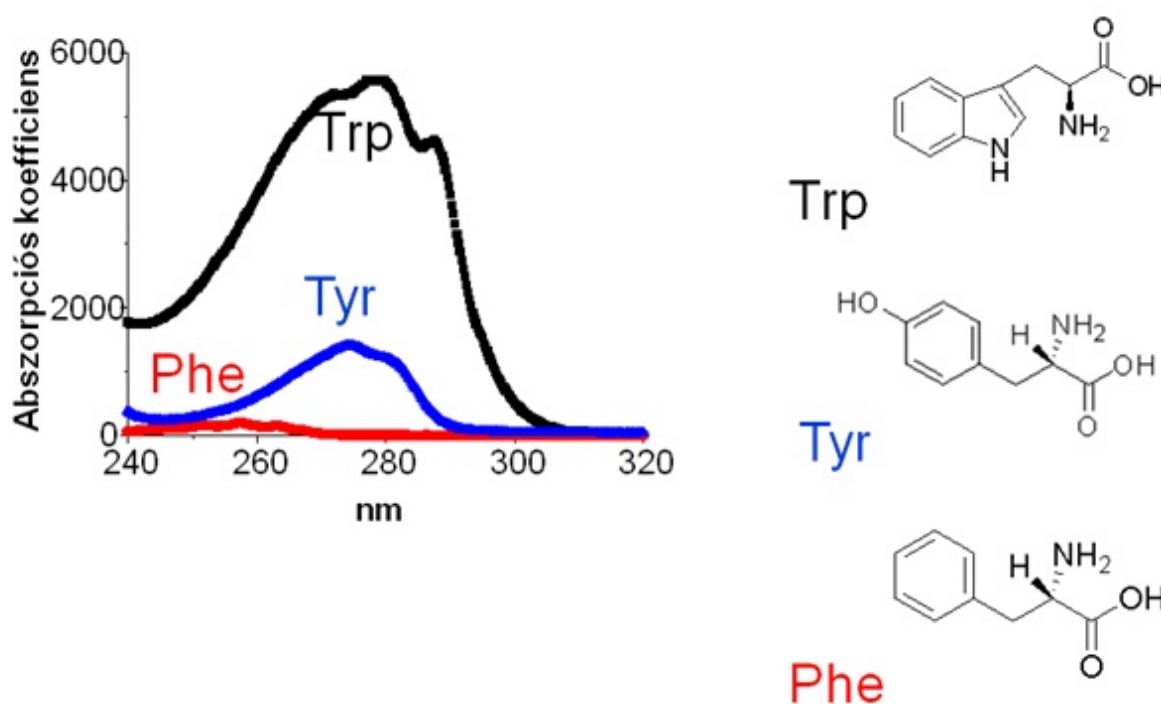


4.8. ábra. ATPáz aktivitás mérése kapcsolt reakcióban.

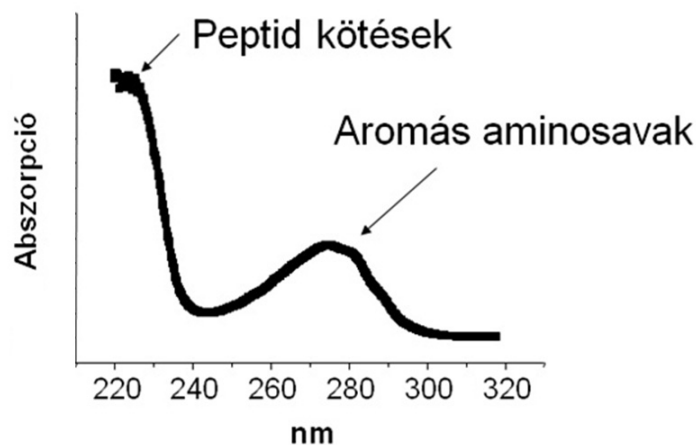
4.6.4. Fehérjék abszorpciós spektruma.

A fehérjékben található aromás aminosavaknak az aromás oldalláncnak köszönhetően 280 nm-en van abszorpciós csúcsuk (4.9. ábra). Az aminosavak abszorpciója additív, így a fehérjék moláris abszorpciós koefficiense 280 nm-en számítható az aminosav összetételük alapján. A nem-aromás aminosavak ezen a hullámhosszon nem nyelnek el, kivétel a cisztin (diszulfid hidakkal kapcsolódó cisztein pár), de ennek abszorpciója alacsony. Az aminosav összetétel alapján a fehérje abszorpciójára számított értékek jól közelítik a mért értékeket, fehérje koncentráció mérésre is használhatók. A Trp és kis mértékben a Tyr oldalláncok fluoreszkálnak. A Trp a 295 nm-en az abszorpciós spektromon látható vállnál szelektíven gerjeszhető.

Fehérjék spektrumában 220 nm környékén a peptidkötések nyelnek el, a 280 nm környékén levő csúcs az aromás aminosavak elnyelésének köszönhető (4.10. ábra). Koncentráció mérésre a 280 nm-es csúcs alkalmasabb, mert 220 nm-en sok más anyag is elnyel, így az kevésbé specifikus.



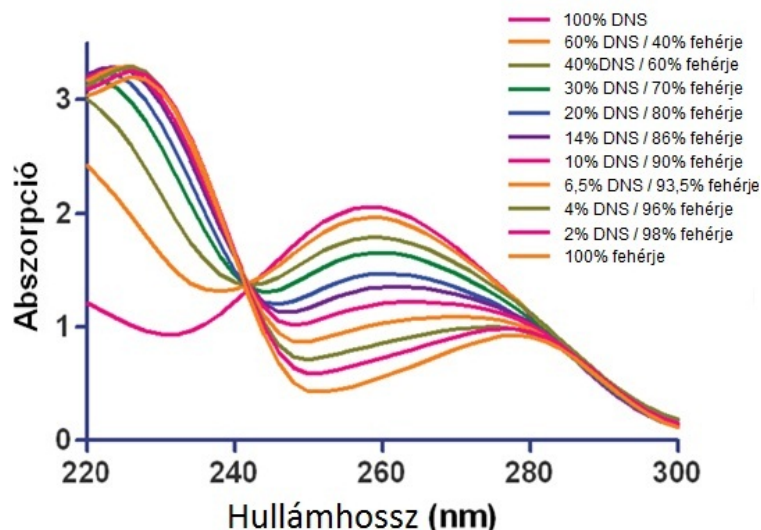
4.9. ábra. Aromás aminosavak abszorpciós spektrumai.



4.10. ábra. Egy fehérje spektruma.

4.6.5. DNS és fehérje tisztaságának meghatározása (4-11. ábra).

A biológiai minták DNS : fehérje arányát a minta 260 és 280 nm-es elnyeléséből becsülni lehet (a nukleotid bázisok illetve az aromás aminosavak nyelnek el ebben a régióban). A tiszta DNS minta esetén ez tipikusan $A_{260}/A_{280}=1,8$, hozzáadott fehérje esetében ez az arány csökken. Az ábrán különböző arányban összekevert DNS-fehérje oldatok abszorpciós spektrumai láthatók.



4.11. ábra. DNS és fehérje tisztaságának meghatározása.

4.7. Fluorimetria

A fluorimetria a fluoreszcens molekulák fluoreszcenciájának kvantitatív vizsgálata. A biomolekulák jelentős része fluoreszcens, illetve fluoreszcens molekulákkal kémiai úton jelölhető, ezért a fluorimetria széles körben alkalmazható mind analitikai eljárásként mind különböző képalkotó eljárásokban. Mivel a fotonok detektálására igen érzékeny eszközeink vannak – akár egyetlen foton detektálása is lehetséges - és egyetlen fluorofór molekula akár milliányi foton képes kibocsátani másodpercenként, ezért egyedi molekuláris vizsgálatokban is gyakran alkalmazott eljárás.

A fluoreszcencia jelenségét Sir John Fredrick William Herschel fedezte fel és publikálta a 19. század közepén. Azt tapasztalta, ha kinin oldatot fehér fénnyel átvilágított, akkor az átvilágításra merőlegesen szemlélve a mintát, az sejtelmes kékes fényt bocsátott ki annak ellenére, hogy az oldat teljesen színtelen volt, ha a mintát az átvilágítással szemben vizsgálta.

A fluoreszcencia érzékenységének demonstrálására igen jó példa, hogy a jelenség felhasználásával bizonyították, hogy a Duna és a Rajna felszín alatti vízfolyásokkal összeköttetésben van. 1877-ben a Dunába fluoreszcint (egy fluorofórt) öntöttek, ami körülbelül 60 órával később zöldes fluoreszcenciájával detektálható volt egy a Rajnába ömlő kisebb folyóban. Fluoreszcint a mai napig használnak jelzőfolyadékként azon célból, hogy könnyen megtalálják a tengerbe zuhanó visszatérő úrkabinokat.

4.7.1. A fluoreszcencia fizikai alapja.

A fluorofór molekula által elnyelt, megfelelő hullámhosszúságú foton a molekula egyes elektronjait gerjeszti. Ebben a gerjesztett állapotban néhány nanomásodpercig tartózkodik a rendszer majd újra alapállapotba relaxálódik (megjegyzendő, hogy 1 nanomásodperc alatt a fény 30 cm-nyi utat tesz meg). Amikor az elektron a gerjesztett állapotból az alacsonyabb energiájú alapállapotba ugrik, akkor fotonot bocsát ki. Ezt a foton kibocsátást nevezzük fluoreszcens emisszióknak. Mind elméleti, mind gyakorlati szempontból fontos tulajdonsága a fluoreszcenciának az úgynevezett Stokes eltolódás, ami azt jelenti, hogy az abszorbeált foton hullámhossza mindig alacsonyabb mint az emittált fotoné (tehát a kibocsátott fény energiája kisebb).

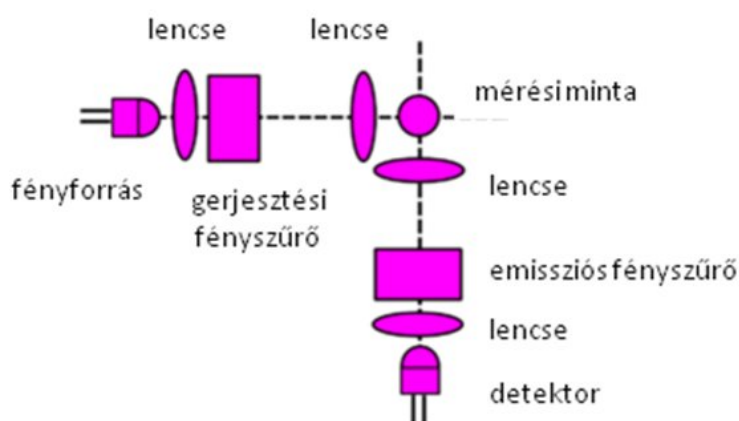
A fény hullámhossza (λ), frekvenciája (ν , ejtsd: nú) és energiája (E) közötti összefüggések, illetve ezen paraméterek mértékegységei az alábbiak:

$$\lambda = c / \nu, \text{ ahol } c \text{ a fénysebesség (hozzávetőlegesen } 300000\text{km/s)}$$

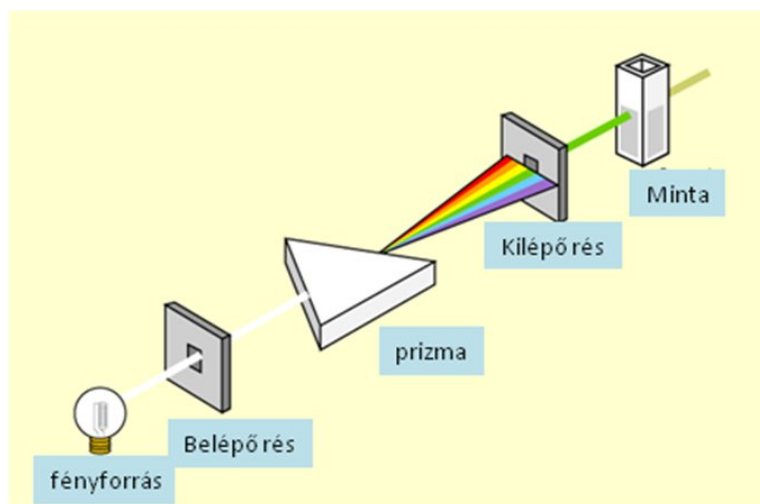
$$\nu = c / \lambda$$

$$E = h * \nu, \text{ ahol } h \text{ a Planck állandó (hozzávetőlegesen } 6,63 * 10^{-34} \text{ Js).}$$

A Stokes eltolódás jelenségének köszönhetően a fluoreszcencia nagyon érzékeny kimutatási módszerek kifejlesztését teszi lehetővé. Mivel a gerjesztő fény hullámhossza különbözik a detektált (emittált) fénytől, ezért megfelelő körülmények alkalmazásával a gerjesztő fény jelentette mérési háttér minimálisra csökkenthető. A gerjesztő fény detektorba jutását két módon akadályozhatjuk meg: 1. legtöbbször a fluoreszcencia mérését olyan geometriai elrendezésben végzik, hogy az emisszió detektálása a gerjesztő fénysugárra merőlegesen történik. Ennek a geometriai elrendezésnek következtében a gerjesztő fény nem jut a detektorba (4.12. ábra). 2. A fényforrás és a minta, illetve a minta és a detektor közé egy-egy, különböző hullámhossz tartományú fényt átengedő fényszűrőt helyeznek, amelyeknek köszönhetően a detektorba nem jut a gerjesztő fény fotonjaiból, mert azokat az emissziós fényszűrő elnyeli.



4.12. ábra. A fluoriméter felépítésének vázlatja. A mérési mintát a fényforrás és a detektor közé helyezük, melyek általában merőleges elrendezésben vannak. A megfelelő hullámhosszú fényt fényszűrőkkel választjuk ki. Sok esetben erre nem fényszűrőket, hanem úgynevezett monokromátorokat alkalmazunk (4.13. ábra). Ezeknek az az előnye, hogy tetszőleges hullámhosszú fényt kiszűrhetünk, míg a fényszűrők csak adott hullámhosszú tartományú fény szelektálására alkalmasak, a tartomány pedig nem változtatható csak a szűrő kicserélésével.

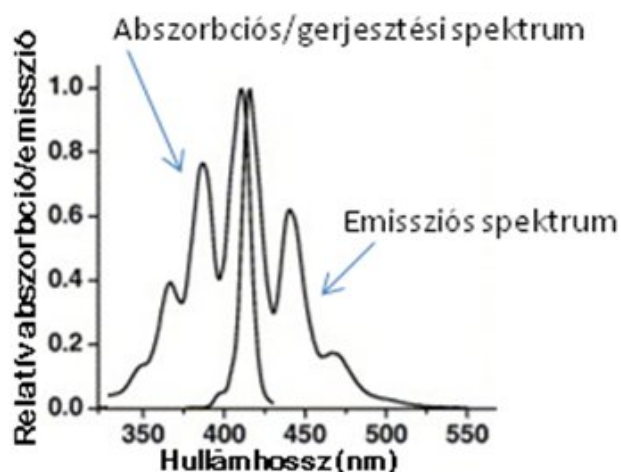


4.13. ábra. A monokromátor elve. A monokromátor a fehér (széles, kevert spektrumú) fényből tetszőleges kis hullámhossz tartományú fényt képes kiválasztani. A belépő fehér fény a monokromátorban található prizma vetül, amely a fehér fényt összetevőire bontja, maga mögött egy szivárványt hoz létre. A minta felé egy kis résen át engedjük a fényt, ezáltal a mintára csak egy kis tartományú, gyakorlatilag homogén hullámhosszú fény vetül. A mintára vetülő fény hullámhossza a prizma elfordításával változtatható, hiszen ebben az esetben a kilépő résen a szivárványból más tartomány fog keresztülhaladni.

A gerjesztő fény detektorba jutásának ilyen mértékű, kettős védelme azért fontos, mert a minták fluoreszcenciája általában két-három nagyságrenddel alacsonyabb, mint a gerjesztő fény intenzitása. Tehát, ha a gerjesztő fény csak 1-0,1%-a jutna a detektorba, akkor is a mért jelintenzitás fele a gerjesztő fényből származna és csak másik fele a

minta emissziójából. Vagyis a mérési háttér 50% lenne, hiszen a detektor minden becsapódó fotont gyakorlatilag egyenértékűen detektál függetlenül azok hullámhosszától.

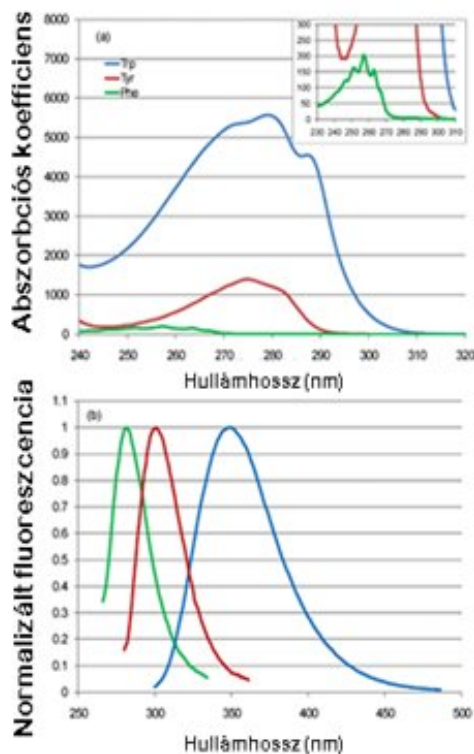
A fluorofórok specifikus fluoreszcencia spektrumokkal jellemezhetők. Megkülönböztetünk gerjesztési és emissziós fluoreszcencia spektrumokat. A gerjesztési spektrumot úgy állítjuk elő, hogy az emisszió fényintenzitását egyetlen hullámhosszon mérjük miközben a gerjesztési hullámhosszt folyamatosan változtatjuk. Az emissziós spektrumot úgy állítjuk elő, hogy az emittált fény intenzitását a hullámhossz függvényében mérjük, miközben a mintát egyetlen hullámhosszon gerjesztjük (4.14. ábra). A gerjesztési spektrum alakja megegyezik az abszorpciós spektrum alakjával. A Stokes eltolódásnak köszönhetően az emissziós spektrum a gerjesztési spektrumhoz képest a vörösebb tartomány felé tolódik, és általában a két spektrum alakja egymásra tükörszimmetrikus.



4.14. ábra. A pirén abszorpciós/gerjesztési és emissziós spektrumai.

4.7.2. A fluorimetria biokémiai és molekuláris biológiai alkalmazásai.

A fluoreszcencia intenzitása az anyagi minőségen túl a molekula környezetére is nagyon érzékeny. Az oldószer pH-jára, polaritására és a hőmérsékletre érzékenyen reagál az emissziós intenzitás. Általában az apoláros közeg illetve a hőmérséklet csökkentése az intenzitás növekedésével jár. Ugyancsak érzékeny a fluoreszcencia a fluorofór közvetlen környezetére is. Ha a fluorofór közelébe másik molekula vagy molekularészlet kerül, akkor a fluoreszcencia intenzitása megváltozhat. Ezen tulajdonságoknak köszönhetően a fluorimetria igen jól alkalmazható különböző kémiai folyamatok és/vagy konformációs átalakulások, aggregáció illetve disszociáció követésére is. A fehérjékben két aminosav oldalláncnak van jelentős fluoreszcenciája, a triptofánnak és a tirozinnak. A fehérjék triptofán és tirozin fluoreszcenciáját intrinsic (belső) fluoreszcenciájuknak nevezzük. A triptofán viszonylag ritka aminosav, a fehérjék többségében csak egy vagy néhány található belőle, míg a tirozin sokkal gyakoribb, általában öt-tíz-szer több van belőle, mint triptofánból. Ugyanakkor a triptofán fluoreszcenciája többszöröse a tirozinénak (4.15. ábra).



4.15. ábra. A Triptofán (kék), a tirozin (piros) és a fenilalanin (zöld) abszorpciós (felső ábra) és emissziós (alsó ábra) spektrumai.

A spektrumokból jól látszik, hogy a triptofán fluoreszcenciája vizsgálható specifikusan a tirozinok jelenléte mellett is, hiszen 295 nm-nél történő gerjesztés és 350 nm-nél történő detektálás esetén a tirozin fluoreszcenciája elhanyagolható. Mivel a triptofán fluoreszcencia intenzitása és az emissziós spektrum alakja is érzékeny az oldallánc környezetére, ami például a fehérje konformációjának megváltozásakor megváltozhat, ezért triptofán fluorimetriával sokszor jól követhetők enzimek, illetve fehérjék konformációs átalakulásai. Ugyancsak sokszor alkalmas a triptofán fluoreszcencia vizsgálata fehérjék ligandum kötésének, di- vagy multimerizációjának követésére, ha a triptofán oldallánc molekuláris környezete megváltozik az adott folyamatban.

A fehérjéket fluoreszcens módszerekkel nem csak triptofán és tirozin fluoreszcenciájukon keresztül tudjuk detektálni. Léteznek fehérjék, melyek a transláció után érési folyamaton mennek keresztül, amelynek során 3 aminosav kovalens izomerizációja révén fluoreszcenssé válnak. Az elsőként felfedezett fluoreszcens fehérje a zöld fluoreszcens fehérje (GFP), amely természetes formában az *Aequorea victoria* medúzából izolálható. Azóta számos más fajtából is izoláltak fluoreszcens fehérjéket. A GFP-nek több száz rekombináns formáját állították elő az utóbbi húsz évben, amelyek különböző fluoreszcencia tulajdonságokkal rendelkeznek és különböző színűek. A GFP intrinszc fluoreszcenciáját jól ki lehet használni fehérjék fluoreszcens jelölésére. Ha a GFP és az adott fehérje génjéből kiméra gént állítunk elő, vagyis a fehérje génjének 5' vagy 3' végére illesztjük a GFP génjét, akkor az így konstruált gén fehérjeterméke egy kiméra lesz, amiben a GFP az adott fehérje N- vagy C-terminálisán helyezkedik el. Vagyis, ha megfelelő vektor rendszer segítségével a gént bejuttatjuk egy organizmusba, akkor a termelődő fehérje a hozzákapcsolt GFP miatt zölden fog fluoreszkálni gerjesztés hatására. Ennek segítségével könnyen lokalizálhatjuk a fehérjéket szöveti, celluláris illetve szubcelluláris szinteken. Mivel ma már sokféle színű fluoreszcens fehérjét ismerünk, így különböző fluoreszcens fehérjékkel jelölt fehérjék kolokalizációja is meghatározható *in vivo*. A fluoreszcens fehérjék felhasználása a biológiában technológiai forradalmat hozott, amit 2008-ban Nobel-díjjal honoráltak.

A fehérjéket és más biológiai anyagokat extrinsic módosítással is fluoreszcenssé tehetjük. Egyrésztől kovalens kötéssel, másrésztől másodlagos kötésekön keresztül a molekulákat megjelölhetjük fluorofórokkal. A fehérjéket kovalens módosítás révén leggyakrabban reaktív cisztein oldalláncokon keresztül jelölik fluorofórokkal. Ebben az esetben olyan fluorofór molekulákat használunk, amelyeken jódcetamido vagy maleimido csoport található, amelyek megfelelő körülmények között specifikusan reagálnak a cisztein oldallánc szulfhidril csoportjával.

Másodlagos kötések segítségével például fluoreszcens szubsztrátokkal vagy inhibitorokkal komplexálhatjuk a fehérjéket. Ugyancsak léteznek olyan fluorofórok, amelyek nagy affinitással kötődnek fehérjék speciális tulajdonságú régióihoz. Például a 8-anilónaftalén 1-szulfonsav (ANS) a fehérjék hidrofób felszíneire kötődik specifikusan, és a kötődéskor válik erősen fluoreszcenssé. Ez a tulajdonsága kihasználható olyan kísérletekben, amikor pl. ligandum kötődéskor a hidrofób felszín aránya csökken, és az enzimhez adott ligandum leszorítja az ANS-t, ezáltal a ligandum kötődés folyamata az ANS fluoreszcencia intenzitás csökkenés által közvetlenül követhető. Ilyen módon a ligandum-fehérje kötési állandó illetve a kötődés kinetikája egyszerű, kvantitatív módon vizsgálható.

A kettős szálú DNS jelölése *in vitro* kísérletekben például etídium bromiddal történhet. A DNS bázisai közé interkalálódva (ékelődve) az etídium bromid fluoreszcenciája sokszorosára nő. A DNS láthatóvá tétele agaróz gélelektroforéziskor korábban etídium bromidos festéssel történt. Az agaróz gélbe etídium bromidot keverünk, és a gélben vándorló DNS a festéket komplexálja. A DNS-ben felgyülemelő fluoreszcens etídium bromid UV fényrel történő megvilágításra a fluoreszcencia révén láthatóvá válik. Mivel az etídium bromid karcinogén, ezért a laboratóriumban ma már nem karcinogén fluoreszcens DNS-festékeket használunk (pl. SYBR Safe).

A nukleinsavak kovalens kötés révén is jelölhetők fluoreszcens festékekkel. A nukleinsav 5' illetve 3' hidroxil csoportjára köthető fluorofór. Leggyakrabban a DNS-t oly módon jelöljük 5' végükön, hogy a PCR reakcióban felszaporítandó DNS szakaszt 5' végen jelölt primer felhasználásával szintetizáljuk (lásd 10. fejezet).

A kereskedelemben igen nagy számban kaphatók különböző fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkező fluorofórok. Egyrészt kiválaszthatjuk a felhasználandó fluorofórt azon az alapon, hogy mely hullámhosszon gerjeszhető illetve mely hullámhosszon emittál. Például, az egyik elsőként alkalmazott fluorofór, a fluoreszcein abszorpciós maximuma 494 nm-en, míg emissziós maximuma 521 nm-en van. A fluorofórok abszorpciós koefficiense és emissziós hatékonysága (egy abszorbeált foton milyen valószínűséggel emittálódik fluoreszcens jelként) határozza meg a fluorofór fluoreszcencia intenzitását. Ezen az alapon is optimalizálhatjuk kísérleteinket a fluorofór kiválasztásával. Ugyancsak fontos szempont, hogy a Stokes eltolódás milyen mértékű. A fluoriméter beállítása szempontjából a nagyobb Stokes eltolódású fluorofórok jobban felhasználhatók. Minél nagyobb a különbség a gerjesztő fény és a detektálás hullámhossza között, annál könnyebben megakadályozható (fényszűrőkkel vagy monokromátorokkal), hogy a mérés háttérét jelentős mértékben meghatározó gerjesztő fény kerülhessen a detektorba.

5. fejezet - Sejtek feltárása és fehérjék izolálása

szerző: Pál Gábor

Ebben a fejezetben azzal foglalkozunk, hogyan lehet biológiai mintából izolálni egy-egy vizsgálni kívánt fehérjét. Magától értetődik, hogy minél több információval rendelkezünk az adott fehérjéről, annál könnyebb kidolgozni a rá vonatkozó hatékony izolálási módszert.

Az elsőként figyelembe veendő kérdés, hogy hol, milyen szövetben fordul elő legnagyobb mennyiségben az adott fehérje. Természetesen ez dönti el, hogy milyen szövetből induljunk ki. A következő kérdés, hogy extracelluláris, intracelluláris, vagy membránfehérjéről van-e szó. Ha intracelluláris a fehérje, akkor fontos tudnunk, hogy melyik sejtalkotóban van jelen legnagyobb mennyiségben, hiszen akkor érdemes először ezt a sejtalkotót izolálnunk. Azt a folyamatot, melynek során az eukarióta sejt egyes alkotóegységeit (pl. plazmamembrán, sejtmag, mitokondriumok) izolálják, sejtfrakcionálásnak nevezzük. Ennek során a sejteket feltárjuk, és az egyes fő sejtalkotókat egymástól különböző frakciókba különítjük.

5.1. A sejtek feltárása

A sejtek feltárásának konkrét módja a részletek tekintetében természetesen nagyban függ attól, hogy milyen mintából indulunk ki, milyen sejtekről van szó. Többsejtűek esetén a cél az, hogy a szövetet alkotó sejtek közötti kapcsolatok megszűnjenek, és az egyes sejtek sejtmembránja esetleg sejtfa (lásd növények, gombák) felszakadjon, a sejtek feltáródjanak.

Az eljárás során rendszerint olyan puffert oldatokat használunk, amelyek hasonlítanak a feltárandó mintában uralkodó natív körülményekhez. A mintát általában folyamatosan hűtjük, hogy lassítsuk a káros kémiai reakciókat, például a proteázok általi fehérjebontást, a spontán oxidációt. A proteázok gátlására proteáz-inhibitorokat, az oxidáció kivédésére redukáló szereket is alkalmazhatunk. A mintában nehézfém ionok is lehetnek, amelyek komplexet képezhetnek egyes aminosav oldalláncokkal. Ennek kivédésére például etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) alkalmaznak, amely a nehézfémionokkal komplexet képezve megköti azokat.

A két leggyakrabban alkalmazott sejtfeltáró módszer a késes homogenizálás, és az ultrahangos feltárás. Késes homogenizátor egy a célra optimalizált „botmixer” jellegű készülék. Ezzel a készülékkel erős szerkezetű szöveteket is szét lehet roncsolni. Az ultrahangos sejtfeltárást inkább már többé-kevésbé szétválasztott sejtek szuszpenziója esetén használják. Az ultrahangot egy „szonikátor”-nak nevezett készülék állítja elő, melyet egy fém alkatrész segítségével vezet a sejt-szuszpenzióba. Az ultrahangot rövid pulzusokban adagoljuk. A sejteket a hirtelen jelentkező, nagy nyomáskülönbségekből adódó nyíróerők tártják fel.

A nyíróerőkön alapulnak mindazok az eljárások is, amelyeknél a sejt-szuszpenziót egy szűk keresztmetszetű térrészen keresztül préselik át nagy nyomást alkalmazva. Ennél a módszernél az alacsony-nyomású térrészbe jutó sejtek a hirtelen nyomásesés miatt mintegy felrobbannak. Szintén a nyíróerőket alkalmazzák azok a sejtfeltárók, amelyeknél a sejt szuszpenziót egy olyan hengerbe teszik, amelyben egy, a henger átmérőjénél éppen csak kisebb átmérőjű dugattyút mozgatnak. A henger és a dugattyú fala közötti, a sejteknél csak alig nagyobb térrészben a nyíróerők miatt a sejtek feltáródnak.

Különösen ellenálló, például sejtfallal rendelkező növényi sejtek esetében kvarcsezemcsék segítségével, ill. folyékony nitrogénban való lefagyasztás utáni dörzsmozsaras feltárást is alkalmaznak. Ezzel szemben a rendkívül sérülékeny vérésejtek esetében a feltáráshoz elegendő az is, hogy a sejteket hipozmotikus oldatba helyezzük. Sejtfa hiányában ezek az egyedi sejtek a hirtelen beáramló víz miatt kipukkadnak.

5.2. Sejtfrakcionálás

A sejtfrakcionálás fő célja az, hogy a feltárt sejtek egyes alkotóit egymástól elkülönítsük, izoláljuk. A frakcionálást megelőző sejtfeltárás módszerének intenzitását optimalizálni kell. Kellően intenzívnek kell lennie, hogy a sejtek

jelentős része feltáródjon, de ugyanakkor fontos, hogy a sejtalkotók zöme épp állapotban maradjon. A sejtek feltárása során a plazmamembrán szétesik, és kis membrán határolt részecskék, vezikulák, keletkeznek. Ezek, és a többi sejten belüli organellum, illetve a citoszól oldott fehérjéi és egyéb anyagai alkotják azt a homogenátumot, amelyből az egyes frakciókat majd izoláljuk. Az egyes frakciók elválasztásának fő módszere a centrifugálás, ezért a következőkben ennek alapelvét és fő eljárásait ismertetjük.

5.3. A centrifugálás

Ha egy testet egy fonálon tartva pörgetünk, húznunk kell a fonalat ahhoz, hogy a test körpályán maradjon, megakadályozva, hogy a test egy érintő egyenes mentén, egyenes vonalú egyenletes mozgást végezzen. Az az erő, amivel a tengely felé húzzuk fonalat, a centripetális erő. Az ezzel éppen ellentétes irányú, a test tehetetlenségéből fakadó fiktív erő, amellyel a test a fonálon keresztül húzza a kezünket, a centrifugális erő (F_c).

Az egyszerűség kedvéért az oldatok centrifugálása során lezajló folyamatokat az F_c erővel szokták leírni.

Az ismert Newton-féle alapegyenlet szerint:

$$F = m \times a \quad (5.1)$$

Centrifugálás során a gyorsulás a szögsebesség négyzetének és a sugárnak a szorzata:

$$a = \omega^2 \times r \quad (5.2)$$

A fiktív centrifugális gyorsító erő, F_c vákuumban tehát:

$$F_c = m \times \omega^2 \times r \quad (5.3)$$

A sugár és a szögsebesség-négyzet szorzata nem más, mint a centrifugálás során jelentkező gyorsító potenciál. Ezt hagyományosan (és talán kissé megtévesztő módon) a földi gravitációs térerőből fakadó nehézségi gyorsulás (g) arányában adják meg. Tehát a centrifugában ébredő gyorsulási potenciál mértékét úgy adják meg, hogy az hányszorosa a g értéknek. Ennek az oka egyszerű. A részecskék a földi gravitáció miatt is ülepednek. A centrifugálás során is üleptjük a részecskéket, de ekkor a gravitációból eredő gyorsító potenciálnak sokszorosát, akár több százszorosát is el tudjuk érni.

Amikor oldatokat centrifugálunk, akkor az oldatban lévő részecskék vákuum helyett egy adott sűrűségű közegben vannak, és természetesen erre a közegre is hat a centrifugális erő. Amennyiben a részecske sűrűsége éppen megegyezik a közeg sűrűségével, úgy a részecske a közeghez képes nem mozog, vagyis a sugárirányú elmozdulása nulla lesz. Ha a részecske sűrűsége nagyobb, mint a közegé, akkor sugár irányban elindul kifelé (miközben az általa kiszorított közeg a sugár felé halad), ha pedig a sűrűsége kisebb a közegénél, akkor elindul sugárirányban a tengely felé (miközben az általa kiszorított közeg kifelé halad).

Ennek a jelenségnek a leírását szolgálja a lebegési faktor bevezetése:

$$\left(1 - \frac{\rho}{\rho_r}\right) \quad (5.4)$$

ahol a tört számlálójában a közeg, a nevezőjében pedig a részecske sűrűsége szerepel.

A lebegési faktorról, mint szorzótényezővel kombinált egyenlet a következő:

$$F_c = m \times \left(1 - \frac{\rho}{\rho_r}\right) \times \omega^2 \times r \quad (5.5)$$

Ebből az egyenletből jól látható, hogy a centrifugálás során az adott részecskére ható erő függ a részecske tömegétől, közeghez viszonyított sűrűségétől, a szögsebességtől, és a tengelytől való távolságtól.

Ezek közül magára a részecskére jellemző tényezők, amelyek eltérő részecskék elválasztására adnak lehetőséget, a részecske tömege, és a sűrűsége. Mint látni fogjuk, két alapvető centrifugáláson alapuló elválasztás létezik. Az egyik esetben a tömeg és a sűrűség egyfajta kombinációja alapján zajlik az elválasztás, míg a másik esetben kizárólag a sűrűség alapján.

Amint a részecskéket a centrifugálás során elkezdjük gyorsítani, és azok elkezdnek sugár irányban mozogni, a mozgó részecskére a vándorlásával ellentétes irányú, a sebességével (az itt jellemző alacsony sebességek esetében) egyenesen arányos mértékű közegellenállási erő (F_k) lép fel. Az arányossági tényező nem más, mint a közegellenállási együttható, f , amelynek értéke Stokes törvénye szerint függ a közeg viszkozitásától, és a részecske méretétől, illetve alakjától az alábbiak szerint:

$$f = 6 \times r \times \pi \times \mu \quad (5.6)$$

Ahol gömb alakú részecskék esetében r a részecske sugara, nem gömb alakú részecskék esetében a Stokes sugár, amely egy olyan gömb alakú részecske sugara, amely azonos diffúziós viselkedésű, mint a vizsgált nem gömb alakú részecske, és μ a közegre jellemző viszkozitás. Érdeemes észrevenni, hogy a részecskét mozgásában akadályozó közegellenállási tényező egyenesen arányos a részecske sugarával.

A centrifugálás folyamata során a részecske sebessége csak addig nőhet, amíg a mozgással ellentétes irányú, a részecskét lassító F_k erő értéke éppen eléri a részecskét gyorsító F_c erő értékét. Egy igen rövid idő elteltével a két ellentétes irányba ható erő értéke tehát megegyezik.

$$F_c = F_k = f \times v \quad (5.7)$$

A részecske emiatt adott, rá jellemző, állandó sebességgel vándorol. (Egyébként egy másfajta gyorsító erő, de azonos jellegű közegellenállási erő hatására kialakuló analóg jelenséget láthatunk a 7. fejezetben az elektroforézis esetében is.) Az előző egyenletbe behelyettesítve az F_c erőt leíró összefüggést fogjuk kapni az alábbi egyenletet:

$$f \times v = m \times \left(1 - \frac{\rho}{\rho_r}\right) \times \omega^2 \times r \quad (5.8)$$

Ha a fenti egyenletet úgy rendezzük át, hogy a részecske sebességét elosztjuk a centrifuga által létrehozott gyorsító potenciállal, akkor egy, a részecske ülepedettségére vonatkozó hasznos adatot kapunk. Ez az $1/s$ (reciprok másodperc) mértékegységű adat jellemzi, hogy egységnyi gyorsító potenciálra a részecske mekkora ülepedési sebességgel reagál. A részecske ülepedettségét a szedimentációs koefficienssel lehet jellemezni, mely Theodor Svedberg nyomán a Svedberg elnevezést kapta:

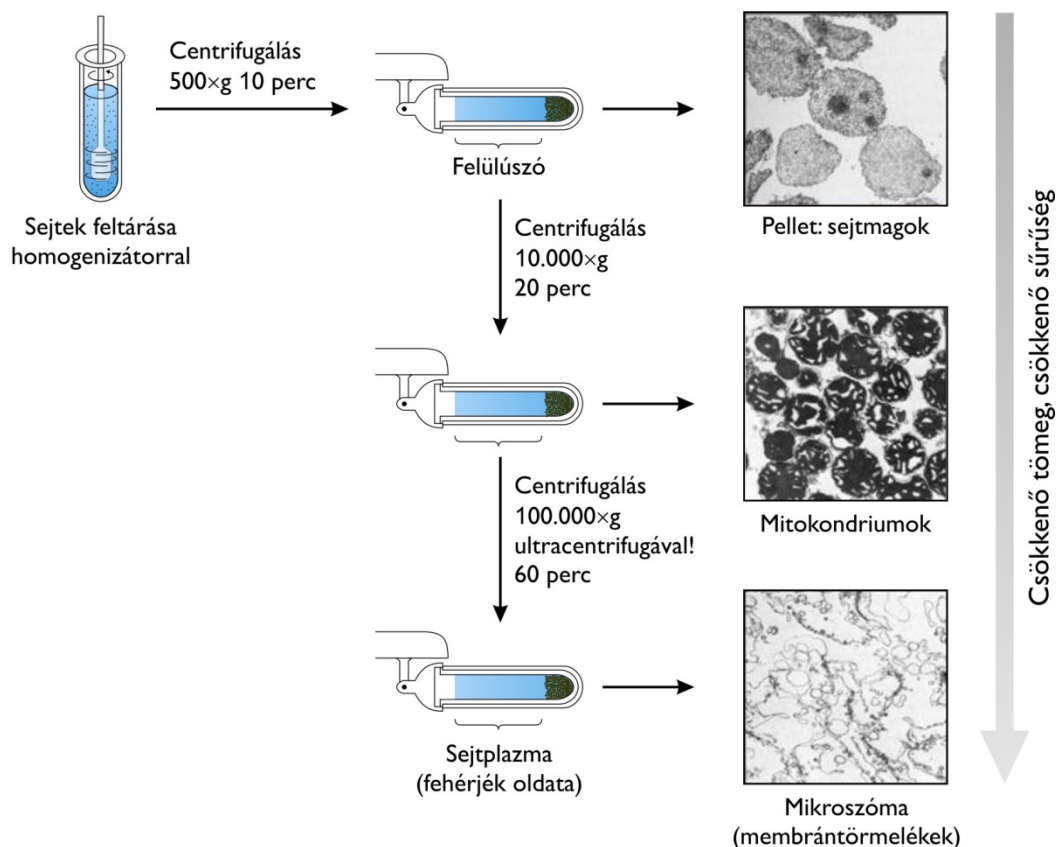
$$S = \frac{v}{\omega^2 \times r} = \frac{m \times \left(1 - \frac{\rho}{\rho_r}\right)}{f} = \frac{M \times \left(1 - \frac{\rho}{\rho_r}\right)}{Nf} \quad (5.9)$$

Az egyenlet számlálójában szerepelnek mindazon tényezők, amelyek pozitív értelemben befolyásolják az ülepedetőséget. Minél nagyobb a részecske tömege, és minél nagyobb a részecske sűrűsége a közegnél, annál nagyobb sebességgel ülepedik egységnyi gyorsító potenciálra vonatkoztatva. Egy adott sűrűségű részecske tömege természetesen egyenesen arányos a részecske térfogatával, más szóval egyenesen arányos a részecske sugarának a harmadik hatványával. A nevezőben szerepel az a tényező, amely negatív értelemben befolyásolja az ülepedetőséget. Minél nagyobb a közegre és részecskére közösen jellemző közegellenállási együttható, annál kisebb sebességgel reagál a részecske egységnyi gyorsító potenciálra. Mint láttuk, a közegellenállási együttható egyenesen arányos a részecske sugarával. Mivel a gyorsító erő a részecske sugarának harmadik hatványával, míg a lassító erő a részecske sugarának csak az első hatványával arányos, így végső soron a részecske sebessége a sugár négyzetével lesz egyenesen arányos. Azonos sűrűségű részecskék esetében tehát minél nagyobb egy részecske tömege, annál gyorsabban ülepedik, mégpedig egy négyzetes összefüggés alapján. Ezt használjuk ki a differenciál centrifugálás eljárás során.

5.3.1. Differenciál centrifugálás - sejtfractionálás döntően részecske méret alapján

Az egyes sejtalkotók sűrűsége csak kis mértékben, míg méretük nagymértékben eltér. Így, bár a fent bemutatott esetben méret és sűrűség szerint is történik elválasztás, a méret szerinti elválás dominál.

A differenciál centrifugálásnak elnevezett eljárás során az egyes sejtalkotókat Svedberg értékeik szerint választjuk el egymástól, szeparálási lépésenként egyre nagyobb gyorsító potenciált alkalmazva. Egy-egy szeparálási lépésben azt használjuk ki tehát, hogy azonos gyorsító potenciálra az egyes sejtalkotók eltérő sebességgel ülepednek. Adott gyorsító potenciál esetén adott időtartam alatt egyes alkotóknak szinte száz százaléka, míg más sejtalkotóknak csak töredéke ülepedik ki (5.1. ábra).



5.1. ábra. Differenciál centrifugálás. Differenciál centrifugálás során egymást követő centrifugálási lépéseket alkalmazunk. Az egymást követő centrifugálások rendre egyre nagyobb fordulatszámot zajlanak. Az első centrifugálásnál csak a legnagyobb tömegű, illetve legnagyobb sűrűségű sejtalkotók ülepednek ki az adott centrifugálási idő alatt. Az első lépésből származó felülúszót a második lépésben tovább centrifugáljuk, immár magasabb fordulatszámon. Ezt a sémát követve az egymást követő centrifugálásokban rendre az egyre kisebb tömegű, illetve kisebb sűrűségű sejtalkotókat ülepítjük ki.

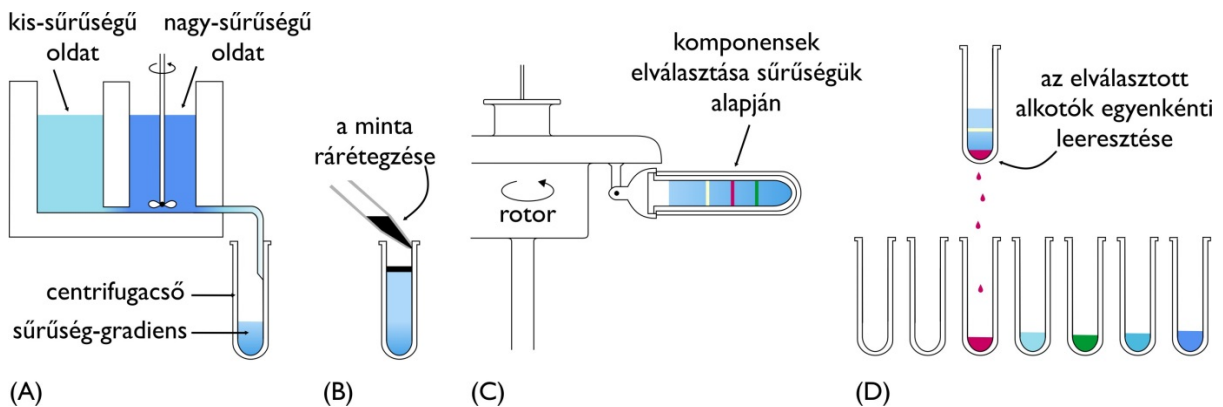
A feltárt sejt homogenátumot először viszonylag alacsonynak számító, 500 g gyorsító potenciállal centrifugáljuk 10 percig. Ilyen körülmények esetén, és ilyen rövid idő alatt a centrifugációs csőben csak a legnagyobb Svedberg értékű részecskék, a feltáratlan sejtek, és a sejtmagok ülepednek le. Az összes többi sejtalkotó jóval lassabban ülepedik, ezért legnagyobb hányaduk még a szuszpenzióban marad. A felülúszót áttöltjük egy másik centrifuga csőbe, és újra centrifugálunk 20 percig, de most már nagyobb sebességű centrifugában 10,000 g gyorsító potenciállal. Ilyen körülmények között, és ennyi idő alatt már kiülepednek a sejtagnál kisebb Svedberg értékű mitokondriumok, lizoszómák és peroxiszómák, de számos komponens továbbra is a szuszpenzióban marad. A felülúszót egy újabb csőbe áttöltve ultracentrifugában folytatjuk az ülepítést, ahol 100,000 g gyorsító potenciál alkalmazásával 1 óra alatt kiülepedik az úgynevezett mikroszóma frakció. Ez döntően a sejteltárás során az endoplazmatikus retikulumból lefűződő 50-150 nanométer átmérőjű vezikulákat, és egyéb ebbe a mérettartományba eső sejtalkotókat tartalmazza.

A szuszpenzióban jellemzően makromolekulák, és egyes szupramolekuláris komplexek maradnak. Még ennél is nagyobb, több százezer g gyorsító potenciál esetén kiülepedhetnek a riboszómák, illetve a nagyméretű fehérjék is.

5.3.2. Sűrűség-gradiens centrifugálás - sejtfractionálás részecske sűrűség alapján

A fent említett eljárás során -első megközelítésben- homogén sűrűségű közegben zajlik a centrifugálás. Fontos hangsúlyozni, hogy itt a sűrűség kifejezés a tömeg per térfogat értelemben vett sűrűséget jelenti, és nem valamely nem szaknyelvi viszkozitás jellemzőt. Mielőtt a sűrűség gradiens centrifugálás elvét ismertetnénk, érdemes megemlíteni, hogy a fent tárgyalt differenciál centrifugálásnál is alkalmazhatunk változó sűrűségű közeg, de ezekben az esetekben a sűrűség gradiens alacsony mértékű, és csak arra szolgál, hogy az egymástól elváló sejtalkotók rétegei kevésbé tudjanak folyadékáramlás által összekeveredni.

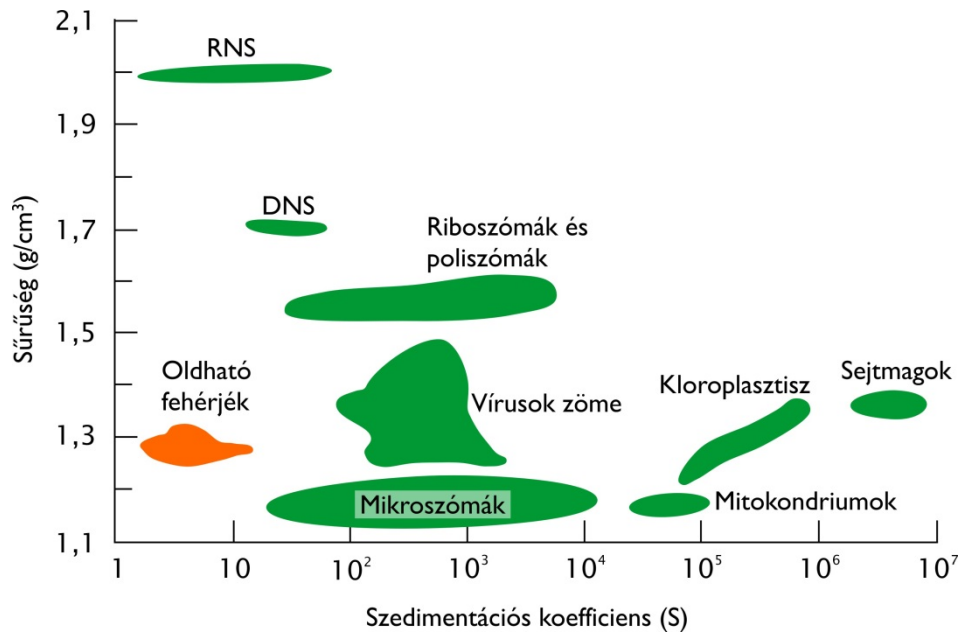
A sűrűség gradiens centrifugálás során a centrifugacsőben létrehozunk egy olyan közeg, amelynek a sűrűsége a centrifugacső alja felé haladva meredeken növekszik. Ezt valamilyen nagy sűrűségű anyag, például cézium klorid (CsCl) használatával érik el. A csőbe úgy töltünk CsCl tartalmú oldatot, hogy a betöltést magas CsCl koncentrációjú oldattal kezdjük, de a betöltött oldat CsCl koncentrációja a betöltött térfogat függvényében egyenletesen csökken. Az így kialakított közeg tetejére rétegezzük az elválasztandó részecskéket tartalmazó oldatot (5.2. ábra).



5.2. ábra. Sűrűség-gradiens centrifugálás. Sűrűség-gradiens centrifugálás során valamilyen a biológiai mintával reakcióba nem lépő, nagy sűrűségű anyagból, például cézium-kloridból gradienst hozunk létre a centrifugacsőben. Az alacsony sűrűségű felszínre rétegezzük a mintát. A centrifugálás során minden komponens csak addig a térrészig ülepedik, amelynek sűrűségével a saját sűrűsége éppen megegyezik. Ekkor az adott komponensre nem hat eredő erő, így „lebegni” fog. Ezen az elven tehát az egyes komponensek elválaszthatók a méretüktől függetlenül, kizárólag a sűrűségük alapján.

A centrifugálás során a részecskék ülepedni kezdenek. A cső alja felé haladva egyre nagyobb sűrűségű közegbe kerülnek. Minden részecske csak addig ülepedhet, amíg éppen eléri azt a közeg réteget, amelynek a sűrűsége éppen megegyezik a saját sűrűségével. Ekkor a részecske nem ülepedik tovább, hiszen a lebegési faktor értéke ekkor nulla, a részecskére nem hat eredő erő. Amint elmozdulna a nála nagyobb sűrűségű közeg felé, úgy a rotor tengelye (a centrifugacső teteje) felé ható erő visszafordítaná. Amint nála alacsonyabb sűrűségű közegbe kerülne, újra ülepedni kezdene. Ez a módszer tehát kizárólag sűrűség alapján választja el egymástól a részecskéket. Egyensúlyi módszerről van szó, amelynél az elválasztás során kialakul egy állandósult állapot. (Ebben a tekintetben ez a módszer érdekes analógiája az elektroforézis fejezetben ismertetett izoelektromos fókuszálásnak (IEF), amely ugyan teljesen más fizikai paraméter, a fehérjék izoelektromos pontja szerint, de szintén egyensúlyra vezető módon választja el térben az egyes komponenseket. Az IEF módszerben is gradienst alkalmaznak a közegben, csak ott éppenséggel a közeg pH értéke változik egy gradiens mentén.)

Érdeemes megjegyezni, hogy a két fent említett centrifugálási eljárást, mivel azok némileg eltérő tulajdonságok szerint szeparálják az egyes részecskéket, a hatékonyabb izolálás érdekében kombinálni is lehet. Differenciál centrifugálást követően az egyes frakciókat tovább lehet komponenseikre választani sűrűség gradiens centrifugálással (5.3. ábra).



5.3. ábra. Differenciál-centrifugálás és sűrűség-gradiens centrifugálás kombinálása. Differenciál-centrifugálásnál elsősorban méret, sűrűség-gradiens centrifugálásnál pedig kizárólag sűrűség alapján válnak el egymástól az egyes komponensek. A differenciál centrifugálás során együtt ülepedő, de sűrűségükben egymástól eltérő komponensek egy második, immár sűrűség-gradiens centrifugálás során egymástól elválaszthatók. A két eljárás egymás után végrehajtva nagyobb elválasztó képességet biztosít, mint az egyes eljárások önmagukban.

5.4. Fehérjék durva frakcionálása

Miután az egyes sejtalkotókat frakciónként elválasztottuk, elkezdődhet a vizsgálni kívánt fehérje tisztításának folyamata, amelynek végén a vizsgálni kívánt fehérjét homogén formában izoláljuk. A homogén formában történő előállításához rendszerint számos, egymást követő tisztítási lépésre van szükség. Egy korábban még nem izolált fehérje esetében próba-szerencse alapú kísérletezgetés alapján születik meg az adott fehérjére optimalizált izolálási „recept”.

Az egymásra épülő tisztítási lépéseknél rendszerint a kisebb hatékonyságú, de olcsó, és nagy mintatérfogatok illetve fehérjemennyiségek kezelésére alkalmas eljárásokkal kezdünk. Ezeket durva frakcionálási módszereknek is szokták nevezni. Az ilyen, elsősorban oldhatóságon, centrifugáláson, szűrésen alapuló eljárásokkal már előtisztított mintát szokták különböző kromatográfiás módszerekkel tovább tisztítani. A kromatográfiás eljárásokkal a 6. fejezet foglalkozik.

Az egyes fehérjéket egymástól eltérő fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján választjuk el egymástól. A fehérje saját tulajdonságai tekintetében leginkább a következő kérdések a fontosak. Milyen hőmérséklet és pH tartományban őrzi meg natív állapotát? Hol van az izoelektromos pontja? Mekkora a molekulatömege? Egy, vagy több alegységes? Ha több alegységes, akkor milyen az alegység szerkezete, mekkora a natív molekulatömege, és mekkora az egyes alegységek molekulatömege?

A hatékony izolálási eljárás kidolgozásához, a tisztítási lépések folyamatos követéséhez az is alapvető fontosságú, hogy az izolálni kívánt fehérjét más „szennyező” fehérjék jelenlétében is ki tudjuk mutatni, lehetőleg úgy, hogy egyben a mennyiségét is mérni tudjuk. Amennyiben enzimről van szó, úgy erre az enzimaktivitás mérése a legkézenfekvőbb, feltéve hogy van olyan kémiai reakció, amit az adott kiindulási mintában kizárólag az izolálni kívánt enzim katalizál. Bizonyos feltételek teljesülése esetén (lásd később) a mért enzimaktivitás arányos lesz az esszébe bemért enzim mennyiségével. Ezáltal minden egyes tisztítási lépést követően meg tudjuk határozni, hogy a kiindulási mennyiségnek mekkora hányadát sikerült megőriznünk. A megőrzött mennyiséget elosztva a kiindulási mennyiséggel megkapjuk a kitermelés értékét. Ha a megőrzött enzim (általánosságban célfehérje) mennyisége mellett megmérjük a minta összes fehérje tartalmát is, akkor az enzim mennyiség / összes fehérje mennyiség arányból azt is megállapíthatjuk, hogy milyen mértékben dúsult a mintánk az izolálendő fehérje tekintetében.

Amennyiben a további tisztítási eljárások már nem növelik a dúsulás mértékét, az arra utalhat, hogy a mintánk már homogén, csak az izolálni kívánt enzimet tartalmazza.

Amennyiben az izolálni kívánt fehérje nem enzim, illetve olyan enzim, amelyre nincs szelektív aktivitásmérő módszerünk, úgy a szelektív kimutatás alapja lehet egy, az adott fehérjére specifikus anyag (pl. receptor esetében a ligandum) kötődése is. Célszerű valamilyen spektroszkópiai módszerrel detektálható, például fluoreszcens csoporttal jelölt ligandumot használni.

Amennyiben specifikus ligandum sem áll rendelkezésre, úgy egyfajta általános megoldásként a ligandum helyett az izolálni kívánt fehérje ellen előállított, arra specifikus ellenanyag is használható (lásd 7. fejezet, Western blot eljárás). Végül, ha ilyennel sem rendelkezünk, de ismerjük az izolálandó fehérje molekulatömegét, akkor egy kevésbé specifikus, de általános módszerrel, SDS-PAGE eljárással (lásd 7. fejezet) követhetjük a tisztítás folyamatát.

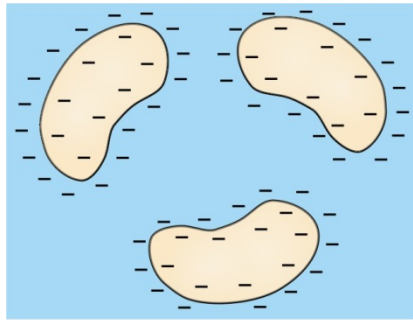
A durva frakcionálási módszerek elsősorban oldhatósági és méret szerinti különbségeken alapulnak.

5.4.1. Oldhatóságon alapuló módszerek

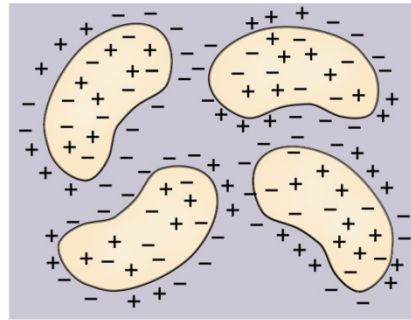
A fehérjék oldhatósága alatt azt értjük, hogy az adott fehérjéből milyen mennyiséget képes az adott oldószer egységnyi térfogata oldatban tartani. Ezt leggyakrabban mg/ml mértékegységben szokták kifejezni. Az oldhatóság nagyban függ az oldószer összetételétől. Mielőtt ennek a részleteit tárgyalnánk, az oldhatóság kérdésénél fontos tisztázni, hogy natív, vagy denaturált fehérjék oldásáról van-e szó. A megértést zavaró durva leegyszerűsítés az a hibás szemlélet, ami szerint a natív állapotú fehérje mindenképpen oldatban van, míg a denaturált fehérje mindenképpen kicsapódik az oldatból. Az alábbi ismertetésben elsőként a natív állapotú fehérjék oldhatóságáról lesz szó, később foglalkozunk a denaturálás témakörével is.

Az oldhatóság pH-függése

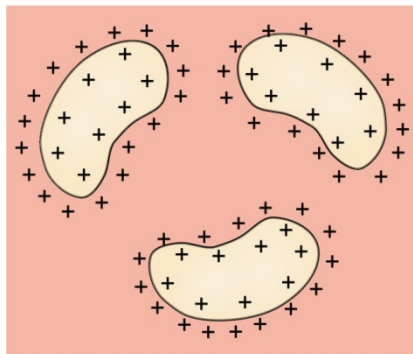
Leginkább az oldat pH-értéke és ionkoncentrációja befolyásolja a natív fehérje oldhatóságát. Az oldhatóság pH-függésével kapcsolatban ismert tény, hogy a fehérjék oldhatósága izoelektromos pontjuknak (IEP) megfelelő pH értéken minimális. Ez annak tulajdonítható, hogy ezen a pH értéken, a fehérjén éppen annyi negatív töltés van jelen, mint amennyi pozitív töltés. Emiatt az egyes fehérjemolekulák a lehető legkisebb mértékben taszítják egymást, miközben az azonos számú, ellentétes töltésű molekularészletek között létrejöhethető inter-molekuláris elektrosztatikus kölcsönhatások száma maximális (5.4 ábra).



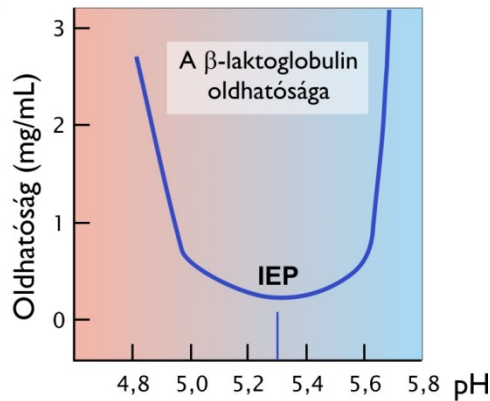
a) Az izoelektromos pont feletti pH-n a fehérje negatív



b) pH=IEP, negatív és pozitív töltések száma azonos



c) Az izoelektromos pont alatti pH-n a fehérje pozitív



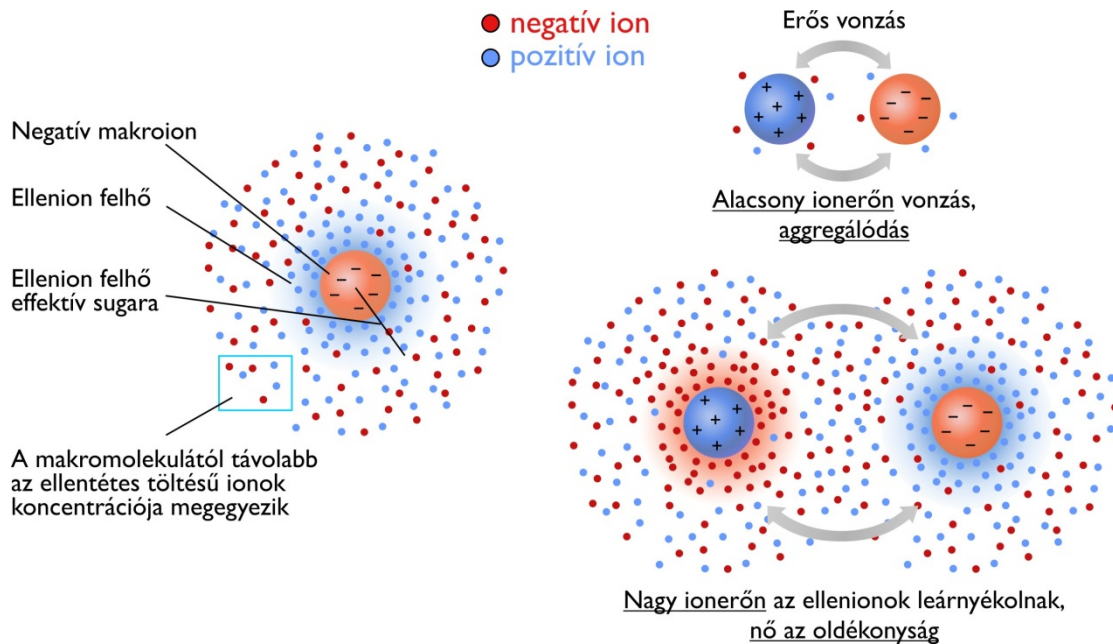
d) A β -laktoglobulin fehérje oldékonyságának pH-függése

5.4. ábra. A fehérjék oldhatóságának függése a közeg pH értékétől. A fehérjék oldhatósága minimum értéket mutat a fehérjére jellemző izoelektromos pontnak megfelelő pH értéken. Ezen a kémhatáson az adott fehérjén a negatív és a pozitív töltések száma éppen megegyezik. Az elektrosztatikus vonzó kölcsönhatások lehetősége ezen a pH értéken a legnagyobb, ami aggregátumok képződéséhez vezethet. Az izoelektromos pont alatt a fehérjének nettó pozitív, a felett nettó negatív töltése van, az adott fehérje egyes molekulái tehát az izoelektromos ponttól eltérő pH értéken inkább taszítják egymást.

A minimális oldhatósági érték természetesen nem azt jelenti, hogy egy adott fehérje összes molekulája feltétlenül kicsapódik az IEP értékkel megegyező pH értéken. Az oldhatóság értékénél alacsonyabb fehérjekoncentráción a fehérjemolekulák mind oldatban lesznek, míg a feletti koncentráción egy egyensúly alakul ki, ahol az oldhatóságon felüli hányad reverzibilisen kicsapódik az oldatból. Ez a kicsapódás nem jelent denaturációt, a nem oldható hányad is natív konformációban van. Mindenesetre amennyiben natív állapotú fehérjéket szeretnénk kicsapni az oldatból, úgy érdemes a pH értéket a kicsapni kívánt fehérje IEP értékére állítani.

Az oldhatóság függése az ionkoncentrációtól

A fehérjék oldhatósága desztillált vízben alacsonyabb, mint olyan oldószerben, amely ionokat is tartalmaz. Amennyiben egy olyan ionmentes oldathoz, amelyben oldhatóság feletti mennyiségben vannak natív fehérjék, kis koncentrációban ionokat (sót) adagolunk, azt fogjuk tapasztalni, hogy a kicsapódott natív fehérjék is oldatba kerülnek. Ezt a jelenséget „beszósásnak” (angolul salting-in) nevezik (5.5. ábra). A kismennyiségben bevitt ionok tehát növelik a fehérjék oldhatóságát. Amint azt az oldhatóság pH-függésénél is láthattuk, a fehérjék oldhatóságát csökkenti, ha a fehérjemolekulák a felszínükön lévő töltéssel rendelkező csoportokon keresztül vonzó ionos kölcsönhatásokat létesíthetnek egymással. Az oldatba kerülő kisméretű ionok ellenionként működve képesek leárnycolni a fehérjék felszínén lévő töltéseket, és ezáltal csökkenteni a fehérjék között kialakuló ionos kölcsönhatásokat. Ez magyarázza a „beszósás” jelenségét.



5.5. ábra. A „besózás” (salting-in) jelensége. A fehérjék oldhatósága desztillált vízben viszonylag alacsony, az ionerő növelésével egy határig növekedik. Amint azt az ábra szemlélteti, az oldhatóság növelése, tehát a fehérjék oldatba vitele, vagyis „besózása” annak köszönhető, hogy az ionok képesek leárnnyékolni a fehérjék saját töltését.

Ezzel megakadályozzák azt, hogy az egyes fehérjemolekulák ellentétes töltései között inter-molekuláris kölcsönhatások jöjjenek létre, és így aggregálódjanak.

Amennyiben az ionok koncentrációját egy bizonyos – az adott fehérjére jellemző – érték fölé emeljük, a fehérje oldhatósága a növekvő ionkoncentráció függvényében csökkenni fog. A csökkenő oldhatóság miatt megfelelően magas fehérjekoncentráció esetén a natív fehérjemolekulák egy része csapadékba kerül. Ezt a jelenséget „kiszóznak” (angolul salting-out) nevezik. A jelenség oka elsősorban az, hogy az oldatba vitt ionok körül hidrátburok alakul ki. A tiszta vízben a vízmolekulák koncentrációja ~55,6 M. Amennyiben az oldott ionok koncentrációja már a mólos koncentrációtartományban van, az eredetileg szabad vízmolekuláknak tetemes része kerül az ionok körül létrejövő hidrátburokba. A vízmolekuláknak ez a hányada már nem vesz részt a fehérjemolekulák oldatban tartásában. Más szóval a fehérjemolekulákat eredetileg körülvevő hidrátburok elvékonyodik, így a fehérjék közötti apoláros kölcsönhatások felerősödnek.

Kiszózásra elsősorban egyértékű kationok sóit használják. Az egyik legelterjedtebb kiszózásra használt só az ammóniumsulfát. Mivel a különböző fehérjék oldhatósága eltérő mértékben függ az ionkoncentrációtól, a kiszózás módszerével egy fehérjekeverék frakciókra bontható. Jó példa erre az ammóniumsulfátos frakcionálás. Amennyiben egy izolálendő fehérje oldhatósága „átlagos mértékben” függ az ammóniumsulfát koncentrációjától a következő módon lehet részlegesen izolálni. A fehérjekeverék oldatához az ionkoncentrációt lassan növelve ammóniumsulfátot adagolunk egy olyan koncentráció értékig, amelyen az izolálendő fehérjénk még éppen oldatban van, míg számos egyéb „szennyező” fehérje már kicsapódik. (Az ammóniumsulfátkoncentráció növelését célszerű nem szilárd anyag, hanem telített ammóniumsulfát oldat hozzáadásával kivitelezni.) A kicsapódott fehérjéket centrifugálással ülepítjük. (Az összecsapódó fehérjékből képződő aggregátumok „részcskemérete” hatalmas, így a kicsapódott fehérjék rendkívül gyorsan ülepednek). A felülúszót megőrizzük, és tovább adagoljuk az ammóniumsulfátot, egy olyan koncentrációértékig, amelyen az izolálendő fehérjénk már - természetesen számos egyéb fehérjeféleséggel együttesen - kicsapódik. A csapadékot centrifugálással ülepítjük, a felülúszót leöntjük. Ezáltal megszabadulunk a felülúszóban maradó „szennyező” fehérjéktől. A további izolálási lépéseket a csapadék visszaoldását követően végezzük el.

Irreverzibilis kicsapási módszerek

Mint már említettük, a denaturálódás és az oldhatóság kapcsolata összetettebb annál, mint ahogy az a köztudatban elterjedt. Natív állapotú globuláris fehérjék esetében az apoláros oldalláncok zöme a fehérje hidrofób magjában található, bár a fehérje zömmel poláros csoportokat tartalmazó felszínén is előfordulhatnak kisebb-nagyobb apoláros részletek. Amikor egy globuláris fehérje valamilyen hatásra letekeredik, az apoláros oldalláncok felszínre kerülnek.

Az apoláros csoportok körül a víz alacsony entrópiájú klatrát szerkezetet hoz létre. A rendszer alacsonyabb szabadentalpia szintet érhet el, ha a klatrát szerkezet megszűnik, hiszen ezáltal a rendszer entrópiája növekedhet. Amennyiben a felszínre került apoláros csoportok egymással lépnek gyenge másodlagos kölcsönhatásba, a klatrát szerkezetek száma lecsökken, a rendszer entrópiája megnő. Ez a hidrofób hatásnak elnevezett termodinamikai jelenség áll annak háttérében, hogy a letekeredett fehérjék az esetek túlnyomó részében kicsapódnak az oldatból. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy számos közkedvelt fehérje denaturáló szer éppenséggel ragyogó oldószere is a denaturált fehérjéknek. Ilyen az urea, vagy a nátrium dodecil szulfát (SDS). Ezek használatakor tehát a denaturálódást nem kíséri kicsapódás.

A globuláris fehérjék denaturálása kiváltható például magas hőmérséklet (hődenaturálás), vagy extrém pH alkalmazásával. Amennyiben az izolálendő fehérjénk valamilyen kicsapódást okozó, denaturáló hatásnak az átlagosnál jobban ellenáll, például hőstabil, vagy savtűrő, úgy ez a tulajdonsága kiaknázható az izolálás során. Megfelelően magas hőmérséklet, vagy extrém pH érték alkalmazásával a „szennyező” fehérjék jó része denaturálódott állapotban kicsapódik, centrifugálással eltávolítható, míg az izolálendő fehérjénk (rendszerint más fehérjékkel együtt) oldatban marad.

5.4.2. Részecskeméreten alapuló módszerek

Egyes durva fracionálási eljárások részecskeméret alapján képesek egymástól elválasztani az egyes molekulákat. Az alább ismertetett két eljárás félígáteresztő membránokon alapul. Ezek a membránok olyan „sziták” amelyekben a lyukak mérete a molekuláris mérettartományba esik. A lyukak, illetve pórusok méreténél kisebb molekulákat a membrán átengedi, míg az annál nagyobbakat visszatartja.

A **dialízis** eljárása során (lásd 2. fejezet) egy félígáteresztő membránból készült, csőalakú zacskóba töltik a mintát. Az oldatot tartalmazó „zacskót” ezután egy puffer oldatba merítik. A félígáteresztő membránon keresztül megindul mindazoknak a molekuláknak az átdiffundálása, amelyek átférnek a membrán pórusain. Ezeknek az anyagoknak a koncentrációja a membrán két oldalán kiegyenlítődik, tehát a membránnal határolt belső térben csökken. A puffer oldat keverésével az egyensúly beállításához szükséges idő lerövidíthető. A külső puffer oldatot néhányszor új oldatra cserélve könnyen elérhető, hogy a póruson átjutni képes oldott molekulákat vagy ionokat tökéletesen eltávolítsuk a dialízis zacskóból. Ezt az eljárást elsősorban arra használjuk, hogy megváltoztassuk egy fehérjeoldat ion, vagy kismolekula összetételét. Például a korábban említett ammóniumszulfátos kicsapás után a csapadékból visszaoldott fehérjék mellől dialízissel is eltávolíthatjuk a maradék ammónium és szulfát ionokat.

Az **ultraszűrés** során is félígáteresztő membránt használunk. A dialízissel ellentétben ennél az eljárásnál valamilyen erőhatással kényszerítjük át az oldatot ezen a membránon. A víz, és a pórusoknál kisebb oldott komponensek átjutnak, míg a pórusoknál nagyobb komponensek visszatartódnak. Megfelelő méretű pórus alkalmazásával a fehérjék két frakcióra oszthatók, az egyikbe a pórusoknál kisebbek, a másikba a pórusoknál nagyobbak kerülnek. Az említett erőhatást biztosíthatja centrifugálás (Centricon csövek), vagy valamilyen nagynyomású inert gáz (Amicon berendezések). A dialízishez képest a fő különbség abban áll, hogy a pórusoknál nagyobb, visszatartott komponensekre nézve az oldat egyben töményebbé is válik. Az ultraszűrés tehát egyben koncentrálna is a visszatartott fehérjéket.

Liofilizálás

Fehérjeoldatokat az ultraszűrésen kívül úgy is töményíthetünk, hogy az oldatból a vizet, és egyéb illékony komponenseket elpárologtatjuk. Bár elvileg a bepárlást az oldat melegítésével is gyorsíthatnánk, a fehérjék natív állapotban tartása szempontjából ennél kíméletesebb eljárást szoktak alkalmazni. Ilyen eljárás a fagyasztva szárítás, vagy más néven liofilizálás. Ennek során az oldatot lefagyasztjuk, és nagyon alacsony nyomású, légritka térbe helyezzük, amelyben egy folyamatosan hűtött spirál is elhelyeznek. Az illékony anyagok a mintából szublimálnak, és ráfagynak a hűtött spirálra. A szublimálás hőt von el, és folyamatosan hűti a kifagyasztott mintát. Amennyiben kellően nagy felületen fagyasztottuk ki az oldatot, úgy elegendően intenzív ez a hűtés ahhoz, hogy a minta fagyott állapotban maradjon mindaddig, amíg az összes illékony komponens eltávozik. A folyamat végére a fehérje szilárd halmazállapotban marad hátra az egyéb nem illékony komponensekkel együtt. Liofilizálás során figyelembe kell venni, hogy milyen nem-illékony komponensek vannak a kiindulási oldatban. Nem illékony savak vagy lúgok szélsőséges kémhatást okozhatnak a visszaoldott mintában. A liofilizálás nem csak fehérje oldatok töményítésére szolgál, de egyben kiváló módja lehet annak is, hogy egy már homogén állapotúra tisztított fehérjét szárított állapotban hosszú időkre stabilan tárolhassunk.

6. fejezet - Kromatográfiás módszerek

szerző: Hegyi György

Kromatográfia néven foglalhatjuk össze mindazokat az elválasztás technikai módszereket, amelyekben két fázis közötti megoszlás eredményeként válik szét valamilyen elegy komponenseire. A két fázis közötti anyagátadás alapulhat adszorpción, ionos kölcsönhatáson, diffúzión, oldékonyságon, affinitás-kromatográfia esetén pedig különleges, specifikus kölcsönhatásokon.

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 réteg kromatográfiás 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 alkalmazzuk a gélszűrési (size exclusion: méret szerinti kizárás) kromatográfiát. Eltérő töltésük (ami a közeg pH-jának változtatásával szabályozható) alapján jól alkalmazható az ioncserélő kromatográfia. Affinitás kromatográfia segítségével pedig valamilyen biológiai specificitás pl. enzim-szubsztrát, enzim-inhibitor, receptor-ligandum, antigén-antitest, stb. használható fel úgy, hogy a specifikusan kölcsönható pár egyik komponensét szilárd fázishoz rögzítjük, ami képes kikötni egy elegyből a kölcsönható partnert. Az elegy egyéb komponensei ezután mosással eltávolíthatók, majd a mozgó fázis paramétereinek változtatásával a specifikus kölcsönhatást megszüntetve az elválasztandó anyag tisztán lemosható az oszlopról.

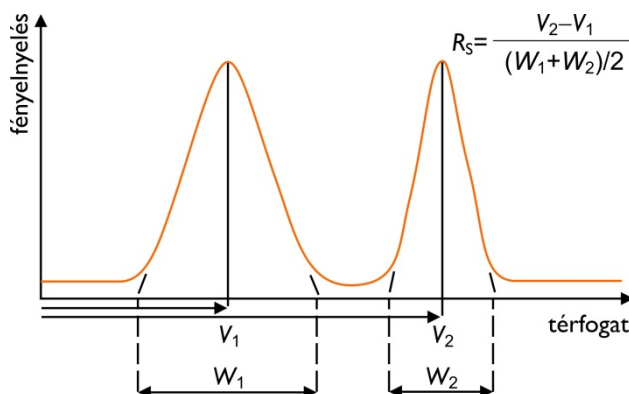
Az analitikai felhasználások végtelen sorából fontosságuknál fogva az aminosav analízist, vagy a fehérje szekvenálás során az Edman lebontáskor keletkező aminosav származékok analízisét említjük meg. Mindkettő kromatográfiás módszerekkel történik.

Különösen nagy jelentősége van a kromatográfiás módszereknek on-line tömegspektrometriával kapcsolva a proteomikai kutatásokban.

A szeparálás kvantitatív jellemzése:

Felbontás (Resolution, R_s):

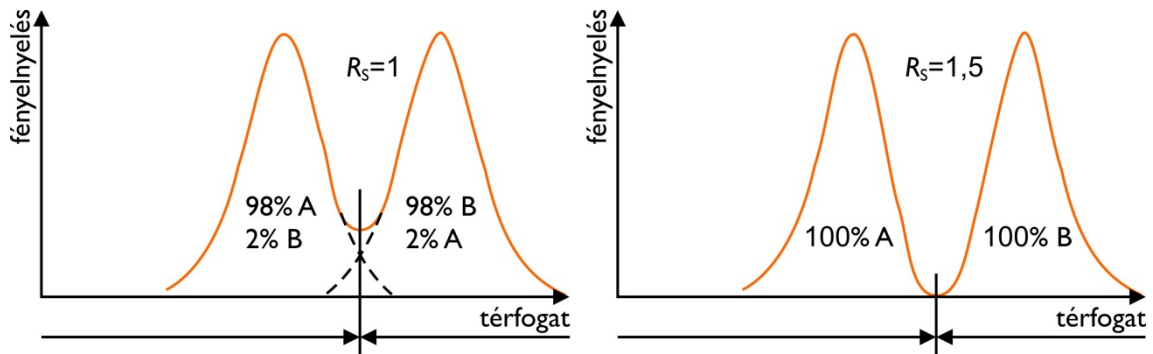
A csúcsok szétválására jellemző szám. Definíció szerint a csúcsok maximuma (elúciós térfogat) közötti távolság osztva a csúcsok szélességének átlagával. **(6.1. ábra)**. Az elúciós térfogatot és a csúcs szélességet (vagy a térfogatok helyett kényelmesebben mérhető időt t_R) azonos egységekben kell mérni, R_s dimenzió nélküli szám.



6.1. ábra. A felbontás meghatározása. R_s = felbontás (resolution); V_1 = az első csúcs maximumának elúciós térfogata;

W_1 = az első csúcs alapvonalnál mért szélessége V_2 = a második csúcs maximumának elúciós térfogata; W_2 = a második csúcs alapvonalnál mért szélessége. Konstans folyadék áramlás esetén kényelmesebb a térfogatok helyett, az azokkal arányos, hozzájuk tartozó időket mérni, így az $R_s = 2(t_2 - t_1 / W_2 + W_1)$.

A felbontás R_s határozza meg a szeparálás mértékét. Minél nagyobb két csúcs között a felbontás annál tökéletesebb az elválasztás (6.2. ábra). Megjegyzés: a teljesen szeparált csúcs sem jelenti mindig azt, hogy teljesen tiszta anyagot kapunk. Sokszor előfordul az, hogy az adott kromatográfias körülmények között két vagy több anyag együtt eluálódik.



6.2. ábra. A felbontás és a szeparáció kapcsolata. 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 $R_s > 1.5$.

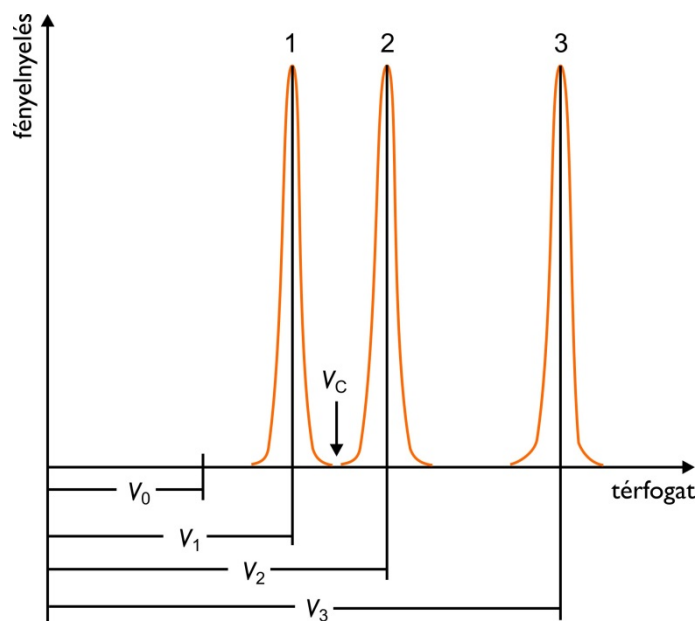
A kromatográfias szétválasztást, az egyes csúcsok viselkedését, illetve a kromatográfias oszlop hatékonyságát további három paraméterrel is jellemezhetjük.

Retenció

A retenció faktor, más néven kapacitás faktor egy anyag visszatartottságának mértéke. A retenció faktor minden egyes csúcsra ki lehet számolni.

$$k'_n = (V_n - V_0) / V_0 \text{ vagy } k'_n = (t_R - t_0) / t_0$$

ahol V_n az n-edik anyag elúciós térfogata, V_0 az oszlopon kölcsönhatás nélkül áthaladó anyag elúciós térfogata, illetve az ezekhez tartozó idők (6.3. ábra). A retenció faktor egy adott anyag jellemzője egy adott összetételű mobil fázis, adott oszlop típus és adott hőmérséklet esetén, ami független az oszlop méretétől és a mozgó fázis áramlási sebességétől.



6.3. ábra. Idealizált kromatogram a retenciós faktor kiszámításának bemutatására. V_0 : az oszlopon kölcsönhatás nélkül áthaladó anyag elúciós térfogata; V_C : az oszlop teljes térfogata; V_1 - V_3 : az egyes csúcsokhoz tartozó elúciós térfogatok. Gélszűrés esetén a V_0 egyenlő az oszlop kizárási térfogatával, és a szeparálás a V_0 és V_C közötti tartományban zajlik le. Más esetekben, amikor a vizsgált anyagok, ionsere, adszorpció, affinitás stb. alapján kötődnek az álló fázishoz, az elúciós térfogatok az oszlop teljes térfogatának (V_C) többszörösei lehetnek.

Hatékonyság (N)

A hatékonyság, vagy más néven elméleti tányérszám az oszlopról eluált anyag szétterültségének mértéke, az alábbi kifejezéssel számolható:

$$N = (V_e/\sigma)^2 = 16 (V_e/w)^2 = 5,54 * (V_e/w_{1/2})^2$$

vagy

$$N = (t_R/\sigma)^2 = 16 (t_R/w)^2 = 5,54 * (t_R/w_{1/2})^2$$

ahol V_e a csúcs elúciós térfogata, illetve az ehhez tartozó idő t_R

σ = zónaszélesedés (ezt a csúcs szélesség mérésével határozzuk meg $W = 4 \sigma$)

W = a csúcs szélessége az alapvonalon

$W_{1/2}$ a csúcs szélessége a csúcsmagasság 50%-ánál. (* szabályos Gauss eloszlás esetén, W és $W_{1/2}$ arányából számolt együttható)

Az N értéket egy adott kromatográfias oszlop jellemzésére használjuk. Mivel N értéke nagymértékben függ a kísérleti körülményektől, mint pl. a puffer áramlási sebessége, a felvitt minta minősége és mennyisége, N értékének meghatározását standardizált körülmények között végzik.

Az anyagok szétterülésének, a kromatográfias zónák kiszélesedésének legfontosabb oka az oldott molekulák longitudinális (az oszlop hosszának irányában történő) diffúziója. A diffúzió hatását csökkenthetjük a kromatográfias mátrix szemcséi méretének csökkentésével, valamint a méret homogenitás fokozásával.

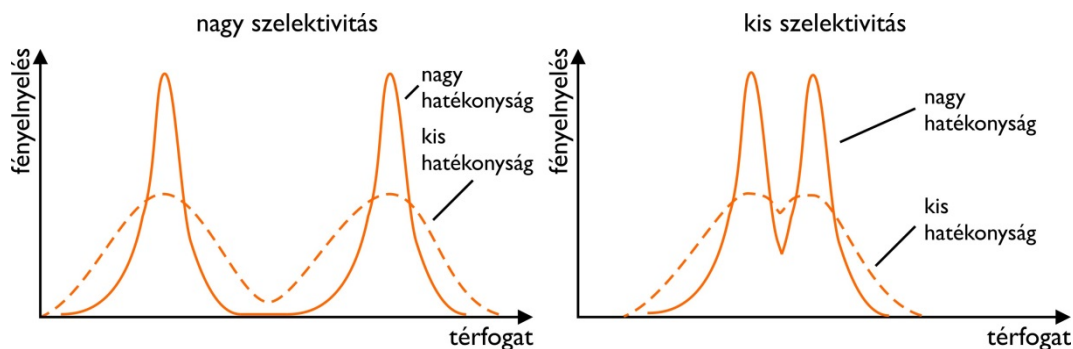
A szemcse méret mellett a hatékonyságot jelentősen befolyásolja, különösen házi készítésű oszlopok esetében, az oszlop töltet ülepítésének módja. Az inhomogén töltet, melyben levegő buborékok, csatornák vannak, rossz hatékonyságot, és ennek következtében tökéletlen elválasztást eredményez.

Szelektivitás (α)

A szelektivitást (α), két szomszédos V_1 és V_2 elúciós térfogatú anyagokra nézve a retenciós faktoruk hányadosával jellemezhetjük:

$$\alpha = k'_2 / k'_1$$

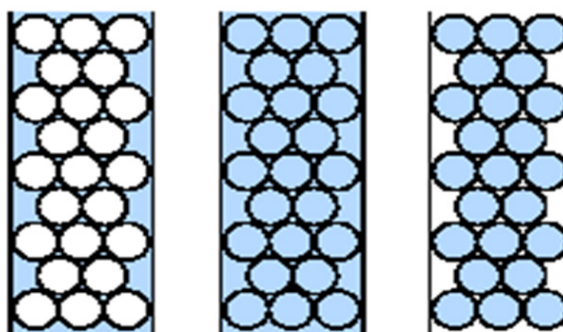
A szétválasztás minőségét mind a szelektivitás mind a hatékonyság befolyásolja, de a szelektivitás mértéke a meghatározó (6.4. ábra).



6.4. ábra. A hatékonyság és a szelektivitás hatása az elválasztásra. Egy kromatográfias oszlop hatékonysága (N) az a minőségi jellemző, ami azt jelzi, hogy mennyire kapunk keskeny szimmetrikus csúcsokat az elúció során. Két anyag elválását a felbontás mértéke határozza meg. Nagy felbontás mellett kisebb hatékonyság is megfelelő szeparálást biztosít. Ideális eset, ha a nagy felbontáshoz nagy hatékonyság párosul.

6.1. Gélszűréses kromatográfia

Gélszűrés során a kromatográfias oszlop töltete egy finom szemcsés, 10-300 μm átmérőjű gömbökből álló porózus, hidrofil gél. Ennek segítségével a kromatográfias oszlopban két folyadéktér alakul ki. Az egyik a gélszemcséken kívüli szabadon mozgó mobil fázis, a másik a gélszemcsék belsejében levő korlátozott mozgású folyadéktér (6.5. ábra).



Kizárási térfogat V_0 Teljes oszlop térfogata V_t $V_t - V_0$

6.5. ábra. Folyadék terek egy porózus gél szemcsékkel töltött kromatográfias oszlopban. Az egyes folyadéktereket a kék területek ábrázolják. V_0 : kizárási térfogat; V_t : az oszlop teljes térfogata; $V_t - V_0$: a gélszemcséken belüli folyadék és a gél anyagának együttes térfogata. (Az ábra a GE Life Science Protein Purification kézikönyv sorozat ábra anyagából származik.)

Ha oldat halad keresztül egy ilyen kromatográfias oszlopon, az oldott molekulák mozgása alapvetően két tényezőtől függ, egyrészt a mozgó folyadék fázis áramlási sebességétől, másrészt a diffúziótól, ami lehetővé teszi, hogy az oldott molekulák, ha méretük engedi, átjárják a gélszemcsék belsejét.

Egy molekulakeverék szétválasztása azon alapul, hogy egy adott porus mérettartománnyal rendelkező gél oszlop esetén egyes molekulák méretüknél fogva nem férnek be a gélszemcsék belsejébe, ezek számára csak a mobil

fázis, vagyis csak a gélszemcsék közötti tér áll rendelkezésre, ezért ezek gyorsan keresztül folynak az oszlopon. A kisebb molekulák viszont méretüknek megfelelően több-kevesebb időt az álló fázis, a gélszemcsék belsejében levő folyadék térben töltenek, ezért lassabban jutnak keresztül a kromatográfias oszlopon (**6.6. ábra**).



6.6. ábra. Különböző méretű molekulák áthaladása a porózus gélen. A gélszűréses (méretkizárásos) kromatográfia során a különböző méretű molekulák a diffúzió révén töltik ki a rendelkezésükre álló folyadék tereket. Az ábrán látható legnagyobb molekula méreténél fogva egyáltalán nem fér be a mátrix pórusaiba, a közepes méretű molekula bejutása csak a nagyobb pórusokra korlátozódik. (Világos szürke részek a sötétszürke mátrixban lévő pórusokat mutatják.) A legkisebb molekula minden pórusba befér. Ezért a legnagyobb molekula az oszlopon való áthaladás során, rövidebb utat megtéve egyre nagyobb előnyre tesz szert, a kisebb molekulák lemaradnak. (Az ábra a GE Life Science Protein Purification kézikönyv sorozat ábra anyagából származik.)

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

$$K_d = (V_e - V_0) / V_s$$

Az egyenletben V_0 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 gélszemcséken belüli folyadék térfogatával, ami teljes egészében csak olyan kis molekulaméretű komponensek számára hozzáférhető melyek szabadon, akadály nélkül közlekednek ki és be a gél legkisebb pórusain is. Maga a V_s értéke nem könnyen meghatározható, ezért a gyakorlatban $V_t - V_0$ értékkel helyettesítik, amiben benne van a gél anyagának nem elhanyagolható térfogata is. Ezért a megoszlási konstans K_d helyett, ami csak a valódi folyadék terekre lenne igaz, egy látszólagos térfogatra (apparent volume) vonatkozó konstans:

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

értéket használunk, ahol K_{av} a gél térfogat 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 gélszűréses elválasztás tervezése

a) A gél típusának kiválasztása

Az elválasztandó anyag tulajdonságainak megfelelően számos különböző gélszűrő anyag áll rendelkezésre. Ezek a gélmátrix kémiai tulajdonságaiban, a pórusok méretében, a gélszemcsék méretében, kémiai és fizikai stabilitásukban térnek el egymástól. Az elsőként kifejlesztett és ma is széles körben használt gél anyaga térhálósított dextrans. 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, a kizárt molekulák tömegét kDa-ban adják meg, pl. a G-25 jelzésű Sephadex kisebb, 1000-5000 Da molekulatömegű anyagok, pl. peptidek szeparálására vagy nagyobb fehérjék só mentesítésére 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 dextrán 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 só mentesítése esetén, célszerű olyan gél választani, ahol a nagy molekulatömegű komponens a kizárási térfogatban (V_0) 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 szélesedéssel és hígulással jelenik meg a lehető legrövidebb idő alatt.

Makromolekulák frakcionálása esetén, ha a keresett komponens molekulatömege ismert, olyan gél válasszunk, ahol az adott komponens körülbelül a frakcionálási tartomány felénél eluálható. Tehát például ha egy fehérje keverékből 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 kromatográfias 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 μm szemcseméret alatt speciális pumpákat kell alkalmazni, és természetesen rigid, nem összenyomható gél típust lehet csak használni.

A legtöbb feladatra a Fine és Medium jelzésű (20-150 μm) szemcseméret jól használható. Preparatív munkánál, illetve só mentesítésnél, 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 gél szűrés során az oszlop hosszának négyzetgyökével arányosan növekszik. Hosszú oszlopokat (100 cm felett) használunk, ha nagy felbontóképességre van szükség, só mentesítésre 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 mintatérfogot 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 oszlop töltet térfogatának 1-5%-a legyen. Ennél kisebb mintatérfogot már nem javít a felbontáson, viszont a hígulás mértéke nagyobb lesz. Jól szeparálódó komponensek esetén, (pl. fehérjék sómentesítésénél) különösen preparatív munka során a minta térfogatát akár az oszloptérfogat 15-20%-ra is emelhetjük.

e) Az eluens kiválasztása

Az eluens összetétele közvetlenül nem befolyásolja a gél szűrés felbontóképességét, de minden olyan komponens, ami a szeparálódó molekulákra hat, befolyásolhatja az elválasztást. Az oldószer pH-ja, ionerőssége, esetleg detergens jelenléte befolyásolhatja az oldott molekulák állapotát, pl. alakváltozás vagy több alegységes fehérjék vagy enzim-inhibitor komplexek disszociációja következhet be, ami természetesen megváltoztatja az anyag kromatográfias viselkedését. Általában híg, néhány század mólós neutrális puffereket használnak, melyek a szeparálódó anyag szerkezetét nem befolyásolják, visszaszorítják ellenben a szeparálódó molekulák és a gélmátrix közötti nem kívánatos adszorpciós kölcsönhatásokat.

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

f) Az eluens folyási sebességének kiválasztása

Gélszűrés során a növekvő áramlási sebesség rontja a felbontóképességet, mivel nem alakul ki egyensúly az álló és mozgó fázis között. Optimális áramlási sebességnek 5-10 ml/cm²x 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 kromatográfias oszlop teljes dugulásához vezethet.

6.2. Ioncserés kromatográfia

A töltéssel rendelkező molekulák elválasztására az egyik leghatékonyabb módszer az ioncserés kromatográfia. Az ioncserés kromatográfiát leggyakrabban oszlop kromatográfia formájában hajtják végre, bár ismeretesek olyan vékony-réteg kromatográfias módszerek is, melyek elsősorban az ioncsere elvén működnek. A továbbiakban kizárólag az oszlop kromatográfiával foglalkozunk.

Az ioncserés kromatográfiához használt oszloptöltetek egy oldhatatlan hordozó (mátrix) felszínéhez kovalens kötéssel kötött töltött csoportokat tartalmaznak. A vizes oldatban szuszpendált mátrix töltött csoportjai körül az ellentétes töltésű 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 anioncserélőnek nevezzük. A kationcserélő mátrixok töltése negatív.

Az ioncserélő mátrixok felépítése szerint megkülönböztetünk hidrofób és hidrofil mátrixú ioncserélőket. A hidrofób mátrixú ioncserélők leggyakrabban nagymértékben szubsztituált polisztirol gyanták. Szervetlen ionok megkötésére, pl. vízlágyításra kiválóan alkalmasak. Mátrixuk hidrofóbicitása és nagy felületi töltéssűrűségük miatt a fehérjéket gyakran denaturálják. A hidrofil mátrixú ioncserélőket először módosított cellulózból állították elő. A cellulóz mechanikai tulajdonságai azonban nem kedvezőek, a cellulóz szálak törnek, nehéz jó minőségű oszlopot készíteni. Ezeket a hátrányokat részben kiküszöböli a Sephadex (dextrán) alapú ioncserélő 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 ioncserélő mátrix.

Az ioncserélő mátrixokhoz kapcsolt töltött csoportokat az alábbi táblázatban foglaltuk össze (6.I. táblázat):

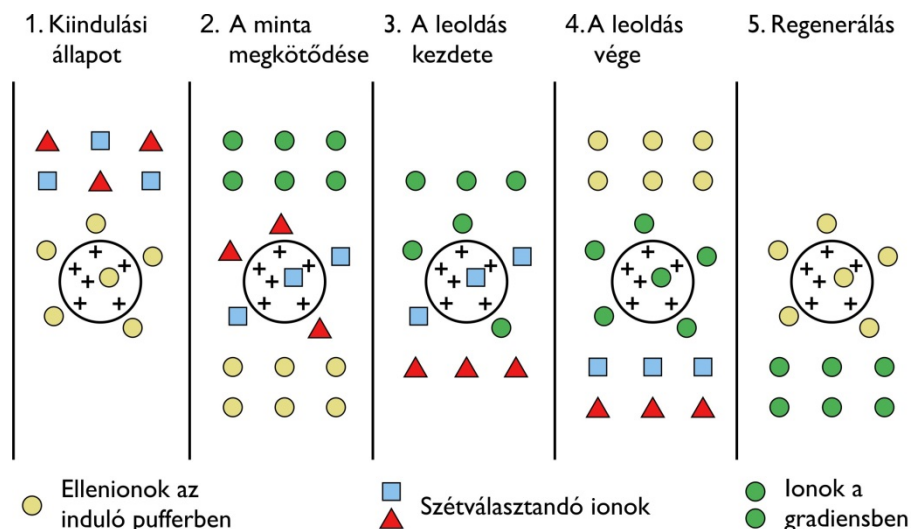
Az ioncserélők funkciós csoportjai	
Anion cserélők	funciós csoport
dietil-aminoetil (DEAE)	-OCH ₂ CH ₂ N ⁺ H(CH ₂ CH ₃) ₂
quaterner-aminoetil (QAE)	-OCH ₂ CH ₂ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH(OH)CH ₃
quaterner-ammónium (Q)	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃
Kation cserélők	funciós csoport
karboximetil (CM)	-OCH ₂ COO ⁻
szulfopropil (SP)	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
metilszulfonát (S)	-CH ₂ SO ₃ ⁻

6.I. táblázat. A Sephadex ioncserélők tulajdonságai

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 ioncsere kísérletet öt fő fázisra lehet osztani (6.7. ábra). Az első fázis az ioncsereelő oszlopnak az ún. induló pufferrel történő egyensúlyba hozása, a kísérlet kezdeti körülményeinek (pH és ionerő) beállítása. Az ioncsereelő 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 szennyező anyagok egy része nem kötődik az oszlophoz, ezeket az induló pufferrel történő mosással eltávolítjuk. A harmadik és negyedik fázis az elúció, a kötött molekulák deszorpciója, amit az eluáló puffer összetételének megváltoztatásával érünk el. Az elúció legegyszerűbb formája az ionerő, azaz a jelenlévő ellenionok koncentrációjának növelése. A deszorpció másik módja az eluáló puffer pH-jának változtatása. A leghatékonyabb módszer az ionerő vagy a pH folyamatos változtatása, az ún. gradiens elúció. Ennek során az oszlopról először a kisebb nettó töltésű, gyengébben kötődő molekulák válnak le.



6.7. ábra. Az ioncsere kromatográfia fázisai (só gradiens elúció). Az ábrán egy pozitív töltésű anion cserelő részecske látható, kiindulási állapotban ellenionokkal a felszínén. A második fázisban történik a szétválasztandó töltéssel rendelkező molekulák megkötése, a leoldás kezdetén (3. fázis), a gyengébben kötődő molekulák szorulnak le, a leoldás végén, pedig az erősebben kötődő molekulák is leválnak (4. fázis). Regenerálás során az induló pufferrel történő mosással a kiindulási állapot állítható vissza.

Egy ioncsereelő oszloptöltet fontos jellemzője az ioncsereelő kapacitása, amely megadja azt, hogy mennyi elleniont képes megkötni. A kapacitásnak három formáját különböztetjük meg:

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

Szabad kapacitás: makromolekulák (fehérjék, nukleinsavak) 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 áramlás közben vizsgáljuk, az ún. dinamikus kapacitást kapjuk.

A szabad és a dinamikus kapacitás függ:

- az elválasztandó anyag tulajdonságaitól
- az ioncsereelő tulajdonságaitól
- az adott kísérleti körülményektől
- Az elválasztandó anyagoknak az ioncsere szeparálás szempontjából fontos tulajdonságai: a molekula méretük és töltésük pH függése. Ebből következik, hogy az ioncsereelő kapacitása a különböző fehérjékre különböző.

Gyakran használt Sephadex alapú ioncsereelő

A Sephadex G-25 és G-50 gélszűrő mátrixok négy különböző csoporttal történő módosításával nyolc különböző ioncserélőt állítottak elő (**6.II. 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.

Ioncserélő	Teljes kapacitás μmol/mg	Teljes kapacitás μmol/ml	Funkcionális csoport	Ellenion
DEAE Sephadex A-25	3.5±0.5	500	dietilaminoetil	klorid
DEAE Sephadex A-50		175	dietilaminoetil	klorid
QAE Sephadex A-25	3.0±0.4	500	dietil-(2hidroxipropil)aminoetil	klorid
QAE Sephadex A-50		100	dietil-(2hidroxipropil)aminoetil	klorid
CM Sephadex C-25	4.5±0.5	550	karboximetil	nátrium
CM Sephadex C-50		170	karboximetil	nátrium
SP Sephadex C-25	2.3±0.3	300	szulfopropil	nátrium
SP Sephadex C-50		90	szulfopropil	nátrium

6.II. táblázat. A Sephadex ioncserélők tulajdonságai

Különlegesen kezelt poliszacharid és szintetikus polimerekből készült, a Sephadexnél nyomásállóbb rigid matrixok felhasználásával olyan finom szemcsés szabályos gyöngy polimereket sikerült kifejleszteni ioncserélő töltetek készítésére, amelyek hatékonysága jelentősen megnövekedett. Ilyenek pl. a 10 μm szemcseméretű monodiszperz MonoBeads vagy a 3 μm szemcseméretű MiniBeads töltetek. Az ilyen ioncserélőket az FPLC technikákban (lásd később) alkalmazzák.

Az ioncserélő kromatográfias szeparálás tervezése

Meghatározó paraméterek:

1. A szeparálandó mintában található komponensek töltése, ez fehérjék esetén az izoelektromos ponttól függ; a fehérjék izoelektromos pont alatt kationok izoelektromos pont felett anionok. A minta és az alkalmazott kromatográfias puffert úgy válasszuk meg, hogy az izolálni kívánt fehérjék kötődjenek az adott anion vagy kation cserélő oszlopon, amelyről a nem kötődő komponensek lemosása után eluálthatók. Ritkábban fordul elő, hogy a nem kívánt szennyezéseket kötjük meg, és az izolálni kívánt komponens folyik át szabadon az oszlopon.
2. A minta mennyisége. Az oszlop méretét úgy válasszuk meg, hogy a töltet dinamikus kapacitása valamivel nagyobb legyen a minta mennyiségénél, túl kis oszlopon az oszlop telítődik és minta egy része már nem kötődik az oszlophoz, túl nagy oszlop esetén pedig az elúció során lép fel nagyobb veszteség.
3. Az izolálni kívánt fehérje molekulásúlya. Az ioncserélő mátrix pórus méretét úgy válasszuk meg, hogy az ioncsere során lehetőleg ne lépjen fel egyidejűleg gélszűrés, vagyis méret szerinti szeparálás.

6.3. Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia

A hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfias módszer (**hydrophobic interaction chromatography, HIC**) azon megfigyelésen alapul, hogy fehérje molekulák kölcsönhatásba léphetnek teljesen hidrofób adszorbensekkel és ez a kölcsönhatás függ az oldat só koncentrációjától. Hasonlóan a fehérjék kisózásához, amikor is a növekvő só koncentráció a makromolekula körüli hidrátburok átrendezése révén vezet a fehérje molekulák összetapadásához, kicsapódásához, a HIC kromatográfia során is nagy só koncentráció (1-1,5 M neutrális só) segíti elő a hidrofób kromatográfias töltet és a fehérje felszínének kisebb nagyobb hidrofób „foltjai” közötti kölcsönhatást. A szeparálás során a só koncentráció csökkentése vezet a megkötött molekulák elúciójához.

Ezen megfigyelések alapján készítettek kromatográfias célra alkalmas gyöngy polimereket, melyeknek felszínét hidrofób alkil vagy aril csoportokkal módosították. Ilyenek a fehérjék kromatográfias szeparálása során jól bevált poliszacharid alapú polimerekből készített Butyl-Sepharose, Octyl-Sepharose, Phenyl-Sepharose.

Itt hívjuk fel a figyelmet, hogy a HIC kromatográfiához elvileg nagyon közel áll az ún. reverz fázisú kromatográfia (RPC). Mindkét esetben hidrofób felszínek között kialakuló kölcsönhatás erősségén alapul a szeparálás. A fő különbség az, hogy a HIC kromatográfia során alkalmazott töltetek esetén a szilárd mátrixhoz kapcsolt hidrofób ligandum koncentrációja 10-20 $\mu\text{mol/ml}$ töltet, a RPC kromatográfia során több 100 μmol a hidrofób ligandum koncentráció a mátrix felszínén. Ezért a reverz fázisú kromatográfia esetén az adszorbens és a szeparálódó molekulák között a kötődés nagyon erős, az elúcióhoz a víznél kevésbé poláros oldószerek (metanol, acetonitril, stb.) alkalmazása szükséges. Ezért a RPC során nem mindig biztosítható natív fehérjék izolálása, mert az oszlopon a fehérjék denaturálódhatnak (mivel a hidrofób magjukat alkotó aminosavak is kötődhetnek az erősen hidrofób mátrixhoz.) Komplex fehérje vagy peptid keverékek minőségi analizisére viszont nagy felbontóképessége miatt utolérhetetlen az RPC kromatográfias technika. A HIC esetén a felviteltől az elúcióig végig vizes, nem denaturáló közegben, dolgozhatunk.

A HIC kromatográfiát befolyásoló tényezők:

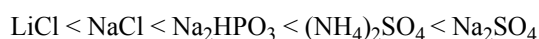
A hidrofób ligandum típusa és sűrűsége a mátrix felszínén.

Az immobilizált hidrofób ligandumok határozzák meg elsődlegesen a HIC adszorbens szelektivitását. Az alkil láncok tisztán hidrofób kölcsönhatást mutatnak, az aromás ligandumok esetén, a hidrofób hatáson túl, aromás csoportok közötti kölcsönhatás is létrejön. Az, hogy alkil vagy aromás ligandumot tartalmazó mátrixot válasszunk-e döntően empirikus, előzetes kötési kísérletek alapján dönthető el.

Alkil láncok esetén a HIC adszorbens fehérje kötő kapacitása nő a hosszabb alkil láncok alkalmazásával. A kötő kapacitás az alkil láncok hosszán kívül természetesen a mátrix felszínén levő koncentrációjuktól is függ. Az optimális hidrofób ligandum koncentráció HIC esetén 20 $\mu\text{mol/ml}$ töltet körül van. A töltet viselkedését valamilyen mértékben befolyásolja a polimer mátrix hidrofóbicitása is. Azonos hidrofób ligandumok esetén sem kapunk pontosan azonos szelektivitást pl. agaróz vagy szintetikus polimer mátrix esetén.

Az alkalmazott só minősége és koncentrációja.

A HIC során alkalmazott sók hatása hasonlít az adott só fehérje kiszóó hatékonyságához. Mindkét hatás összefüggésbe hozható az adott sónak a víz felületi feszültségére való hatásával, ami az alábbi sorba rendezhető:



Leggyakrabban az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot használják ennek kiszóó hatékonysága mintegy négyszerese a NaCl-nak. Az induló só koncentrációt úgy válasszuk ki, hogy az izolálni kívánt fehérjénk kellő hatékonysággal kötődjön az oszloptöltetkez. A só koncentráció meghatározása szintén empirikus, a kipróbáláshoz jó közelítés lehet az 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oldat alkalmazása. Ügyelnünk kell arra, hogy az alkalmazott induló só koncentrációnál ne történjen fehérje kiszóás következtében kicsapódás.

A pH hatása.

Tekintve, hogy a közeg pH-ja megváltoztatja a fehérje molekula ionizálható csoportjainak töltését, ez nyilvánvalóan befolyásolja a hidrofób kölcsönhatáson alapuló elválasztást. Az a tapasztalat, hogy általában a fehérje minták retenciója drasztikusan változik pH 5 alatt és pH 8,5 felett, vagyis az ikerionos töltés állapothoz közeli töltésállapotok kedvezőek a HIC-hez. Ezért a só koncentráció kiválasztásához hasonlóan optimalizáljuk a szolvens pH-ját is.

A hőmérséklet hatása.

A hidrofób kölcsönhatás hőmérséklet függő. A hőmérséklet növelésével a legtöbb esetben növekszik a kölcsönhatás erőssége, de a hatás összetett, mert ezzel ellentétes hatást is megfigyeltek. Gyakorlati szempontból annyi mindenképpen figyelembe veendő, hogy a szobahőmérsékleten kidolgozott módszer eredménye nem biztos, hogy hidegszobában (4 °C) reprodukálható.

Adalékok hatása.

Vízzel keveredő szerves oldószerek (alkoholok, acetonitril, dimetilformamid stb.), hozzáadott detergensnek már kis koncentrációban is csökkentik a szeparálódó fehérjék kötődését, mintegy vetélkednek a fehérjével a mátrix felszínén található adszorpciós helyekért. Ezért ezeket kis koncentrációban adva növelhetjük az elúció hatékonyságát abban az esetben, ha magában a só koncentráció csökkentése nem vezet kellő eredményre. Ügyeljünk arra viszont,

hogy az alkalmazott adalék ne denaturálja az izolálandó fehérjét. A HIC oszlopok tisztítására, regenerálására viszont kiválóan alkalmazhatók nagyobb koncentrációban is.

6.4. Affinitás kromatográfia

Affinitás kromatográfiával nagy szelektivitással szeparálhatók biomolekulák specifikus kölcsönhatásaik alapján. Ez a szeparálási technika azért különleges, mert vagy a biomolekula biológiai funkcióján, vagy egyedi kémiai szerkezetén alapul. A technika során a biomolekula kölcsönható partnerét immobilizálják a kromatográfias töltetbe. Ez az álló fázishoz rögzített ligandum reverzibilisen megköti az akár sok komponensből álló keveréket tartalmazó mozgó fázisból a keresett biomolekulát, amit a mozgó fázis összetételének megváltoztatásával eluálhatunk az oszlopról.

A technika nagy szelektivitást, nagy felbontóképességet és rendszerint nagy kapacitást biztosít a keresett fehérjére nézve. A tisztítás mértéke akár több ezerszeres is lehet és a kitermelés is általában nagyon jó. Az affinitás kromatográfia egyedülálló abból a szempontból, hogy a biomolekula egyedi biológiai funkcióján alapul. Ez a sajátossága arra is alkalmassá teszi az affinitás kromatográfiát, hogy lehetővé válik kizárólag az aktív molekulák elválasztása az inaktív denaturált formáktól is. Nagy előnye a módszernek, hogy sok esetben egy lépésben elérhető a keresett biomolekula izolálása, de azon túlmenően, hogy a szétválasztandó mintának alakos elemektől mentes tiszta oldatnak kell lennie, tanácsos a mintát valamilyen részleges szeparálással előkészíteni. Ha például vérszérumból kívánunk valamilyen igen kis mennyiségben előforduló komponenst izolálni, tanácsos a több mint 50%-ban jelenlevő szérumalbumintól valamilyen előszeparálással megszabadulni.

Különösen nagy jelentősége van az affinitás kromatográfiának rekombináns fehérjék tisztítása során. Gyakori ugyanis, hogy a termeltetett rekombináns fehérjét az N vagy C terminálisán egy fúziós „címkével” látják el géntechnológiai módszerekkel, aminek segítségével a rekombináns fehérje affinitás kromatográfiával egyszerűen „kihalászható”.

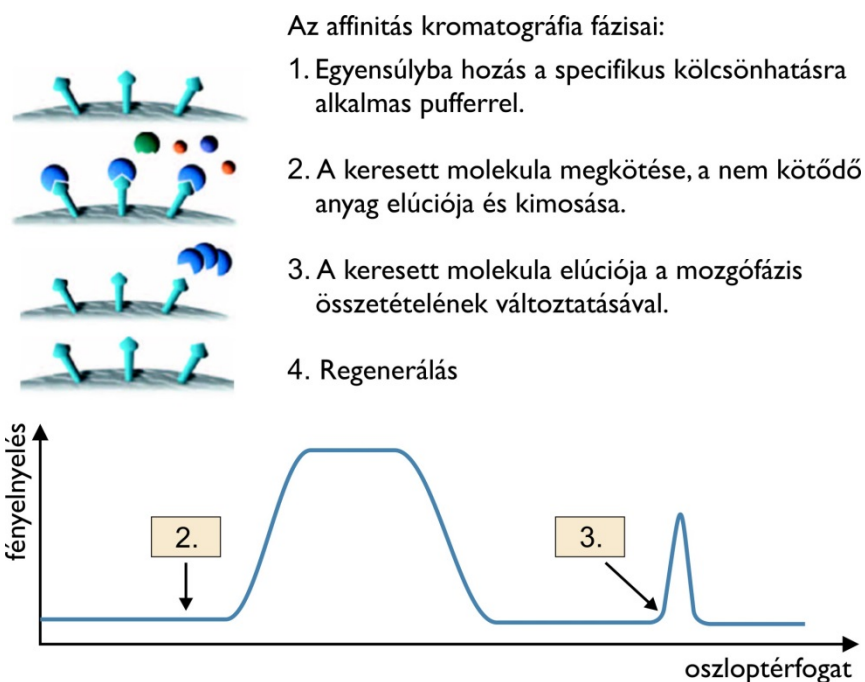
Legjobban elterjedt ilyen címke a láncvégekhez fuzionált oligo-hisztidin (His-tag), ami reverzibilisen kötődik fémkelátokhoz, például szilárd fázishoz rögzített Ni-keláthoz, vagy a glutation S transzferáz (GST) fúziós fehérje, ami mátrixhoz rögzített glutation segítségével izolálható. Ezekre a címkékre specifikus affinitás kromatográfias mátrix, vagy kész előtöltött oszlop a kereskedelmi forgalomban kapható, ezért ezek használata egyszerű.

Más egyedi esetekben a specifikus ligandumot a felhasználónak kell a kromatográfias mátrixhoz kapcsolni. Ehhez viszont többféle aktivált reakcióképes kromatográfias mátrixot lehet beszerezni.

Néhány affinitás kromatográfiában gyakran használt kölcsönhatás:

- | | |
|--------------|--|
| • Enzim | szubsztrátanalóg vagy inhibitor |
| • Antitest | antigén (vírus, sejt) |
| • Nukleinsav | komplementer nukleinsav szekvencia |
| • Nukleinsav | hiszton vagy más nukleinsav kötő fehérje |
| • Hormon | hormon receptor |
| • Glutation | glutation S transzferáz (GST) fúziós fehérje |
| • Fém kelát | His-tag fúziós fehérje |

Affinitás kromatográfia fázisai (6.8. ábra):



6.8. ábra. Affinitás kromatográfia fázisai. Az ábra bal oldalán az affinitás kromatográfia szemléltető ábrázolását látjuk. A mátrixhoz kötött specifikus ligandumhoz csak a „hozzáillő” kötőhellyel rendelkező molekulák kötődnek, a többi molekula lemosható. A mozgó fázis összetételének megváltoztatásával a keresett molekulák tisztán izolálhatók. Az ábra jobb alsó részében egy tipikus affinitás kromatográfias elúciós profilt látunk. (Az ábra a GE Life Science Protein Purification kézikönyv sorozat ábra anyagának a felhasználásával készült.)

A minta előkészítése.

A mintának tiszta, szilárd részecskéktől mentes oldatnak kell lennie. Ez centrifugálással vagy szűréssel érhető el. Fehérje oldatokat célszerű legalább 10000g-vel centrifugálni, sejt lizátumot 40-50000g-vel centrifugáljuk. Szűréshez 0,45 µm-es szűrőt használjunk. (A minta ilyen előkészítése szükséges a HPLC és FPLC módszerek esetén is.) Ellenőrizzük, hogy a mintánk illetve a keresett fehérjénk oldékonyságát és stabilitását hogyan befolyásolja az oldat pH-ja, a só koncentráció, esetleg szerves oldószer jelenléte. Határozzuk meg a keresett célfehérje és a ligandum kölcsönhatását befolyásoló tényezőket (pH, só koncentráció, hőmérséklet). Ennek alapján optimalizáljuk az induló kötő puffer összetételét. Ha a mintában a célfehérjével vagy a ligandummal interferáló komponensek vannak (pl. sejt lizátumban található metabolitok) ezeket távolítsuk el.

Egyensúlybához a specifikus kölcsönhatásra alkalmas pufferrel.

Mossuk a kromatográfias oszlopot 3-4 oszloptérfogat induló kötő pufferrel. A mintát (ha kell oldószer cserével vagy dialízissel) szintén hozzuk egyensúlyba az induló kötő pufferrel.

A keresett molekula megkötése, a nem kötődő anyag elúciója és kimosása.

A minta felvitelénél vegyük figyelembe a kölcsönhatás erősségét. Nagy affinitás esetén a minta felvitel áramlási sebessége nagy lehet, gyenge kölcsönhatás esetén, vagy ha az egyensúly kialakulása lassú folyamat, csökkentünk a mintafelvitel sebességét. A minta felvitel után a kötő pufferrel mossuk tovább az oszlopot, amíg az összes nem kötődő komponenst el nem távolítottuk.

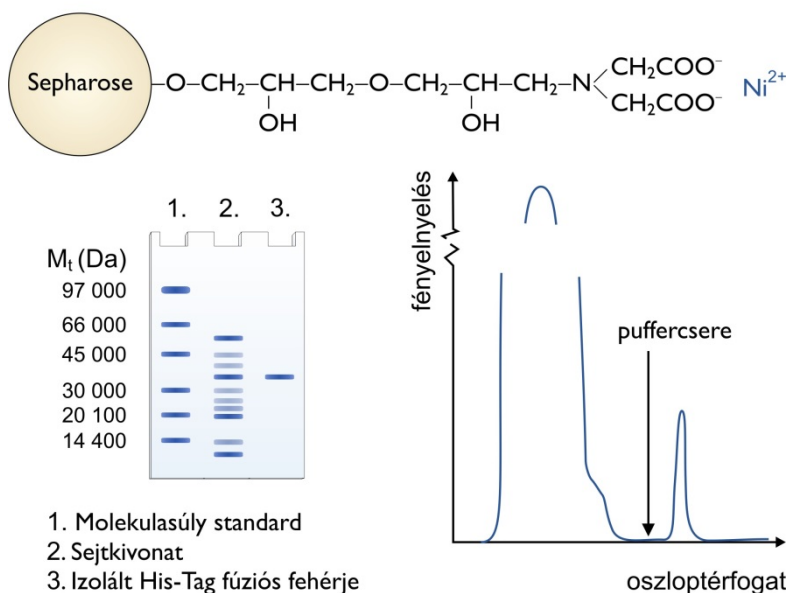
A keresett molekula eluálása a mozgófázis összetételének változtatásával.

Elúció a pH és/vagy az ionerősség megváltoztatásával: Az elúció egyik lehetséges és egyszerű módja az, amikor a ligandum és a célfehérje közötti kölcsönhatás erősség csökken. A pH változtatásával változik a ligandum és/vagy a célfehérje töltött csoportjainak ionizációja, ezáltal változik meg a kölcsönhatás erőssége. Hasonlóan az ionerősség

növelése (rendszerint NaCl koncentráció emelésével) szintén csökkenti a kölcsönhatás erősségét. Mindkét esetben vegyük figyelembe a célfehérje oldhatóságát és stabilitását.

Kompetitív elúció: Kompetitív elúció során olyan anyagokat alkalmazunk, melyek a ligandummal vagy a célfehérjével reagálva, ezekkel vetélkedve a korábban kialakult kölcsönhatást megszüntetik. Így pl. a His-tag címkével rendelkező fúziós fehérje könnyen leszorítható a fémkelát matrixról imidazol pufferrel (**6.9. ábra**).

His-Tag fúziós fehérje izolálása Ni^{2+} -kelát oszlopon.



6.9. ábra. „His-Tag” fúziós fehérje izolálása. A His-Tag fúziós fehérjét tartalmazó sejt kivonatot Ni^{2+} kelát oszlopon tisztítjuk. Az immobilizált Ni^{2+} kelát ligandum szerkezetét látjuk az ábra tetején. A mintát neutrális pufferben visszük az oszlopra, a His-Tag-et tartalmazó fúziós fehérje kötődik a Ni^{2+} kelát ligandumhoz, a többi fehérje lemosása után kompetitív elúcióval, imidazol tartalmú pufferrel a fúziós fehérje tisztán izolálható. A frakció tisztasága SDS- gélelektroforezissel ellenőrizhető. (Az ábra a GE Life Science Protein Purification kézikönyv sorozat ábra anyagának a felhasználásával készült.)

A GST címkével ellátott célfehérje viszont olyan módon válik le a rögzített glutation ligandumról, hogy az elúciós pufferbe kevert szabad glutation a célfehérjével reagálva bontja meg a korábbi affinitás alapú kötést. Az elúció során minden esetben érdemes az elúáló puffer áramlási sebességét csökkenteni, ezzel elkerülhető a célfehérje túlzott hígulása.

Amikor a ligandum-célfehérje kölcsönhatás túlságosan erős, előfordulhat, hogy a fenti módszerek egyikével sem eluálható az izolálandó fehérje. Ilyenkor kaotróp szerekkel (pl. urea, guanidin) vagyunk kénytelenek az oszlopról a fehérjénket lemosni. Ez természetesen a fehérje denaturációjával jár, szerencsés esetben ezután a fehérje aztán megfelelő körülmények között renaturálható. Az említett urea és guanidin használata után tehát a fehérjéket később renaturálni kell.

Regenerálás.

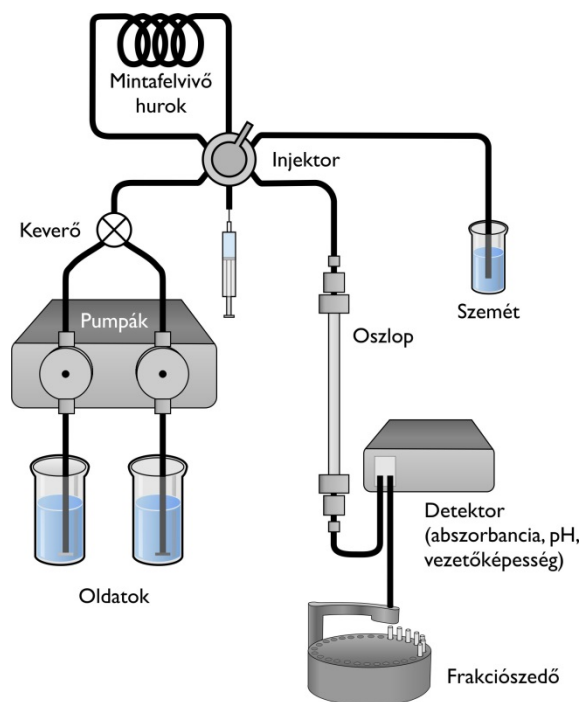
Az elúció sikeres befejezése után az oszlopot néhány oszloptérfogat induló kötő pufferrel mosva, újra felhasználhatjuk. Hosszabb tárolás esetén figyeljünk arra, hogy az oszlopot ne érje baktérium vagy gomba fertőzés, célszerű pl. Na-azidot tartalmazó pufferben tárolni.

6.5. Nagyhatékonyságú (nagynyomású) folyadékkromatográfia, HPLC

A gelszűréses és az ioncserés kromatográfia tárgyalásakor már láttuk, hogy a gélmatrix szemcseméretének csökkentésével valamint a méret homogenitásának fokozásával a kromatográfia hatékonysága növekszik. A

hatékonyság szinte új minőségi tartományba kerül, amikor a mátrix szemcsemérete 3-10 μ m méretű. Az ilyen töltetek alkalmazásával végzett folyadékromatográfiát nevezik nagy hatékonyságú folyadék kromatográfiának, angol neve High Performance Liquid Chromatography után rövidítve HPLC-nek.

Az ilyen szemcseméretű mátrixal töltött kromatográfias oszlopok használatakor viszont a mozgó fázis (eluens) áramoltatása már csak nagy nyomású, 10 MPa körüli, speciális precíziós pumpák alkalmazásával oldható meg (6.10. ábra). A HPLC rövidítés egyidejűleg erre is (High Pressure LC), sőt sokak szerint a speciális berendezések magas ára (High Price LC) is utal.



6.10. ábra. HPLC készülék vázlatos elrendezése. Az ábrán egy HPLC berendezés vázlatos elrendezése látható. A rendszer két komponensből álló mozgó fázis nagy nyomáson történő szállítását biztosító pumpákból, keverő egységből, a vizsgálandó mintát bejuttató injektorból, kromatográfias oszlopból és egy detektorból áll.

Az alkalmazott nagy nyomás miatt az oszlop töltetével szemben elsődleges követelmény, hogy ne legyen összenyomható. Erre a célra kezdetben kizárólag, és döntően ma is szilikagél-t használunk, ebből ugyanis megfelelő körülmények között egyenletes és adott szemcseméretű, meghatározott pórusméretű és kellő szilárdságú gélek készíthetők. A hidrofil szilikagélhez mint állófázishoz természetesen csak hidrofób mozgó fázis alkalmazható, ezért kezdetben a nagy hatékonyságú kromatográfia elsősorban hidrofób szerves oldószerekben oldódó anyagok szeparálására volt alkalmas. Később a szilikagél felszínének kémiai módosításával hidrofób felszínű szilikagéleket készítettek. Ebben az esetben az álló és mozgó fázis hidrofil-hidrofób viszonya megfordul ezért ezt reverz fázisú kromatográfiának nevezték. A reverz fázisú kromatográfia megnyitotta a lehetőségét vízdékony anyagok, így a biológiai eredetű molekulák többségének elválasztására is. Nagy pórusú gélek pedig lehetővé tették makromolekulák szeparálását is. A hidrofób felszín kialakítására hosszú alkil láncokat kapcsolnak a szilikagélre, ez lehet oktadecil, oktil, butil (C18, C8, C4 jelzéssel), de használnak fenil csoportot (lásd korábban a HIC kromatográfiánál leírtakat) vagy ioncsere céljára ioncserélő csoportokat tartalmazó géleket is.

Ha a mozgó fázis összetétele a kromatográfia során állandó, akkor izokratikus elucióról, ha valamilyen lineáris vagy nem lineáris gradiens szerint változik, akkor gradiens elucióról beszélünk. Sok esetben az izokratikus és a gradiens szakaszokat kombinálják egymással. A gradiens kialakítását leggyakrabban mikroprocesszor vezérelte, változtatható sebességű pumpák (legalább két pumpa) segítségével érhetjük el, ilyenkor a mozgó fázis komponensei a pumpák után a nagy nyomású oldalon keverednek. Precíziós szelepek segítségével alacsony nyomáson kevert gradiens is készíthető, ami egy pumpával továbbítható az oszlopra. Módosítatlan szilikagél esetén egymással keveredő, különböző hidrofóbicitású szerves oldószerekből készíthető a mozgó fázis. Reverz fázisú kromatográfia során valamilyen híg vizes oldat (pl. 0,1% trifluor-ecetsav, néhány mM-os foszfát puffer stb.) és valamilyen vízzel

keveredő szerves oldószer (pl. acetonitril, metanol, propanol, stb.) keverésével készíthető megfelelő izokratikus vagy gradiens szerint változó mozgó fázis.

A biokémiai gyakorlatban leggyakrabban fényabszorpciós vagy fluoreszcenciás detektorokat használunk, de használhatók törésmutató változás, vezetőképesség, forgatóképesség mérésen alapuló vagy elektrokémiai detektorok is. Fotometriás detektálásnál természetesen az eluensnek optikailag tisztának kell lennie, és az adott hullámhossz tartományban nem lehet fényelnyelő. A különlegesen tiszta oldószerek használata egyébként is általános követelmény, hogy elkerüljük az oszloptöltet szennyezését és a kromatográfia során nem várt anyagok megjelenését.

Igen fontos fejlesztés eredménye a tömegspektrometriás (MS) detektorok megjelenése. Ezek segítségével meghatározható az egyes elválasztott komponensek tömege, ami az adott anyag meghatározó paramétere. A tömeg meghatározás során valójában nem közvetlenül a tömeget, hanem a tömeg/töltés (M/Z) értékeket mérjük, de az egyszerűen és többszörösen töltött értékekből természetesen a tömeg kiszámítható. Az utóbbi két évtizedben olyan ionizációs technikákat vezettek be az MS mérő rendszerekben, ahol nagy molekulású biopolimerek, így fehérjék ionizációja is jó hatásokkal megvalósítható (ESI elektron spray ionizáció és MALDI matrix assisted laser desorption). Ennek eredményeképpen a kromatográfias módszerek a fehérjekutatásban egyre fontosabb szerepet játszanak. Egy vagy több dimenziós nagyhatékonyságú kromatográfia on-line összekapcsolása a tömegspektrometriával lehetővé teszi, pl. egy sejtben egy adott időben expresszázó fehérjék összességének, a „proteom”-nak, vagy ezek egy meghatározott frakciójának célzott meghatározását. Ez azért jelentős, mert eltérően a genomtól, a proteom nem állandó, változhat szövet vagy sejt típusonként, függ az adott fiziológiás állapottól, vagy az egyed fejlődési állapotától is. Lehetőség van a poszttranszlációs módosulások kimutatására is. Ezen belül különös jelentősége van a foszforilált fehérjék, a foszfo-proteom célzott vizsgálatára, ami a szabályozási folyamatok összefüggéseinek megértését teszi lehetővé.

A készülékek minden komponensének nyomásállónak és kémiailag rezisztensnek kell lennie. Leggyakrabban rozsdamentes acélt, különlegesebb esetekben ellenállóbb titán ötvözeteket alkalmaznak. A mozgó alkatrészek (pl. dugattyúk, szelepek stb.) rendkívül kopásálló anyagokból (különleges kerámia, üveg, ipari rubin stb.) készülnek.

A nyomnyi fémszennyezésekre is érzékeny minták, pl. egyes enzimek elválasztására alkalmas, különlegesen nyomásálló műanyag alkatrészekből felépített berendezések is forgalomba kerültek. Natív fehérjék szeparálására fejlesztette ki a Pharmacia-LKB cég (jelenlegi tulajdonosa a GE Healthcare) az **FPLC** (fast protein liquid chromatography) rendszerét. Ez abban különbözik a fent ismertetett nagyhatékonyságú kromatográfiától, hogy az oszlop töltetek olyan különlegesen kezelt dextransz alapú, vagy szintetikus polimer anyagokból készülnek (Superdex, Superose, Sephacryl stb.) melyek hidrophil karakterük és nagy porozitásuk miatt különösen jól alkalmazhatók biopolimerek szeparálására. Ezek szemcse mérete ugyan egy kicsivel nagyobb, nyomásállósága pedig kisebb a szilika alapú HPLC töltetknél, de elegendő ahhoz, hogy 0,5-1 MPa nyomáson kellő folyadékáramlást lehessen biztosítani és a módszer hatékonysága is megfelel a fehérjékkel kapcsolatos elvárásoknak. Az oszlopok nyomásálló bórszilikát üvegből készülnek, és a pumpában és csőrendszerben is kerülnek a fém alkatrészeket. Mind a HPLC, mind az FPLC nagy hatékonyságot, érzékeny detektálhatóságot biztosít, és időigénye is sokkal kisebb, mint a hagyományos kromatográfias eljárásokhoz szükséges ráfordított idő.

Néhány gyakorlati megfontolás:

A minta előkészítésekor vegyük komolyan, hogy a mintának tiszta oldatnak, por és részecske mentesnek kell lennie. Ellenkező esetben a készülékben dugulás léphet fel, és a kromatográfias oszlopot is elszennyezhetjük. A mintát 20-40000 g-vel centrifugálhatjuk, és tanácsos 0,45 µm-es szűrőn átszűrni. A mintát lehetőleg a mobil fázis induló komponensében oldjuk, vagy győződjünk meg róla, hogy a minta ebben biztosan oldódik. A minta térfogata az alkalmazott oszlop átmérőjétől függ (lásd alább).

Az állófázis (oszloptöltet) kiválasztása. Apoláros, vízben nem oldódó anyagok esetén módosíthatlan szilika, esetleg diol vagy amino csoportokat tartalmazó, poláros, vízben oldódó anyagok esetén reverz fázisú, C18, C8, C4 módosított szilika tölteteket válasszunk. Nagyobb hidrofób peptidek és fehérjék túlságosan erősen kötődhetnek a C18 szilárd fázishoz, ilyenkor ajánlatos C8 vagy C4 mátrixot használni. Analitikai célra kisebb szemcseméretű (3µm vagy 3µm alatti) mátrixot válasszunk, ez növeli az elválasztás hatékonyságát, hátránya azonban, hogy nő a rendszerben a nyomás. Szemipreparatív és preparatív célra az 5-10 µm-es szemcseméret a megfelelő. A szemcseméret mellett vegyük figyelembe a mátrix részecskének porozitását is, Kis molekula tömegű metabolitok, aminosavak kisebb peptidek esetén megfelel a leggyakrabban alkalmazott 100 Å pórusméretű töltet. Makromolekulák esetén nagy porozitású (wide pore) 300 Å pórusméretű tölteteket válasszunk (1 Å = 0.1 nM).

A mozgó fázis kiválasztása. A mozgó fázis legfontosabb jellemzői a tisztaság, a viszkozitás, az UV átláthatóság és a keverhetőség más oldószerekkel. A HPLC technikák különleges tisztaságú (HPLC grade) oldószereket kívánnak meg, beleértve az e célra különlegesen tisztított vizet is. Ezek ára meglehetősen magas, helyes oszlopméret kiválasztásával (lásd alább) nagy megtakarítás érhető el. Lehetőleg ne használjunk nagy viszkozitású oldószereket, ezek megnövelik a rendszer nyomását. A detektálhatóság szempontjából fontos az alkalmazott mozgó fázis optikai tisztasága. Tekintve, hogy leggyakrabban UV tartományban működő fotometriás detektorokat használunk, vegyük figyelembe a mozgó fázis UV elnyelését. A reverz fázisú kromatográfia esetén leggyakrabban használt acetonnitrilből pl. többszörös HPLC minőség is beszerezhető. A legdrágább minőség még 200nm hullámhossznál is használható, ha csak 280-340 nm tartományban mérünk elég az olcsóbb minőségű acetonnitrilt választani. Reverz fázisú kromatográfia esetén az induló mozgó fázis valamilyen híg vizes oldat, a hozzá keverendő polaritást csökkentő szerves komponens lehet metanol, etanol, propanol, acetonnitril stb. Az induló vizes oldat lehet pl. 0,1% hangyasav, ecetsav, néhány mM foszfát puffer. Ion pár képzés miatt leggyakrabban 0,1% trifluoroecetsavat használnak. Az ion pár képzés a töltés kiegyenlítés miatt növeli az erősen töltött molekulák retencióját. Ha viszont a kromatográfia on-line MS méréssel kapcsolt, ne használjunk trifluoroecetsavat, mert ez csökkenti az ionizálhatóságot. Ilyenkor híg hangyasav, vagy ammoniumformiát használata ajánlott. Vegyük figyelembe, hogy gradiens elúció során az oldószerek keveredésekor megváltozik a mozgó fázisban a levegő oldékonysága. Ez azzal járhat, hogy az oszlop után, amikor a nagy nyomás lecsökken levegő buborék kiválás következik be, ami a detektorban lehetetlenné teszi a mérést. A mobil fázis komponenseit ezért gáz mentesíteni kell. Ha a kromatográfias berendezésünk tartalmaz ún. degaser egységet, akkor ez enyhe vákuumot alkalmazva folyamatosan alacsonyan tartja az oldott levegő koncentrációját. Ha ilyen nincs, célszerű közvetlenül a felhasználás előtt a mozgó fázis komponenseit vagy vákuumban gáztalanítani, vagy az igen rosszul oldódó hélium átbuborékolásával kiűzni az oldószerekből az oldott levegőt. A mozgó fázist használat előtt ajánlott finom (0,45µm-es) szűrővel megszüntetni, hogy a levegőből bekerülő finom porszemcséketől megszabaduljunk.

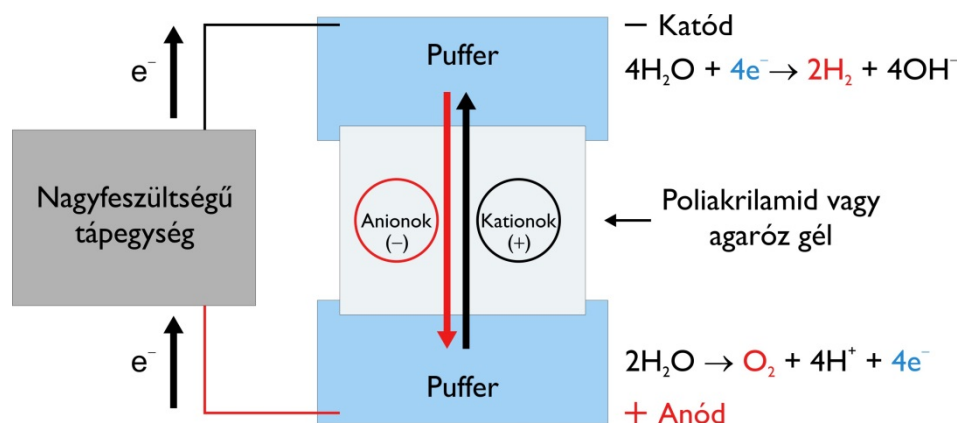
Az oszlop méret kiválasztása. Meghatározó annak eldöntése, hogy a kromatográfias oszlopot analitikai, vagy preparatív célra kívánjuk felhasználni. Analitikai célra használunk mikrobore vagy minibore oszlopokat, ezek belső átmérője 1-3 mm. A mikrobore-minibore oszlopokra felvihető minta térfogata 5-25 µl, ami 0,01-0,1 mg anyagot tartalmazhat. Itt a felhasznált oldószerek mennyisége jelentősen csökkenthető, ezzel mind pénztárcánkat, mind környezetünket is kímélhetjük. Az ilyen kis átmérőjű oszlopok használata akkor is indokolt, ha a rendelkezésre álló minta mennyisége kicsi, ha ilyen kis mennyiségű mintát viszünk fel nagyobb oszlopra, előfordulhat a minta „eltűnése”. A leggyakrabban használt oszlop típus a 4,6 mm átmérőjű standard oszlop. Ezeket az oszlopokat mind analitikai, mind szemipreparatív célra használhatjuk. A standard oszlopokra felvihető minta térfogata analitikai felhasználás esetén 10-50 µl, szemipreparatív munkánál akár 1 ml is lehet. A felvihető anyagmennyiség 0,1-2 mg. Preparatív célra 10-20 mm átmérőjű oszlopokat használhatunk. Itt a felvihető anyagmennyiség 20-200 mg is lehet, a minta térfogata elérheti az 5-10 ml-t is. Az oszlopok ára magas, kímélésük érdekében tanácsos rövid, néhány mm hosszúságú, az oszlop töltetével megegyező előtét vagy védő oszlopot eléjük illeszteni. Ezek dugulás esetén kis költséggel cserélhetők.

7. fejezet - Elektroforézis technikák

szerző: Pál Gábor

7.1. Az elektroforézisről általában

Elektroforézis során egy-egy elektród külön-külön egy-egy puffer tartályba merül, és a két puffer tartály között töltött részecskék számára átjárást biztosítunk (7.1. ábra). Ha a két elektród között egy elektromos tápegységgel elektromos potenciálkülönbséget, tehát feszültséget hozunk létre, akkor ennek hatására elektronok áramlanak a tápegységen keresztül az anód felől a katód felé. A katódra kerülő elektronokat a pufferben lévő vízmolekulák veszik fel, hidrogén gáz és hidroxidionok keletkeznek. Az anódon eközben vízmolekulák adnak le ugyanannyi elektront, mint amennyi a katódra levált, oxigén gáz keletkezik, és protonok (illetve ezek víz molekulákra kerülésével hidroxónium ionok) keletkeznek. A két puffer tartály között töltött részecskék számára átjárást biztosító összeköttetésen a pozitív töltésű ionok (kationok) a negatív töltésű katód felé, a negatív töltésű ionok (anionok) pedig a pozitív töltésű anód felé vándorolnak. Az egyes ionok eltérő töltésük és méretük miatt eltérő sebességgel vándorolnak, tehát így elválaszthatók egymástól. A vándorlás sebességét befolyásoló legalapvetőbb fizikai összefüggések ismerete rendkívül fontos annak megértéséhez, hogy az egyes konkrét elektroforézis eljárások esetekben az egyes molekulák miért lesznek eltérő sebességűek, milyen elven választhatók el egymástól.



7.1. ábra. Az elektroforézis alapelve. Elektroforézis során egy-egy elektród egy-egy puffer tartályba merül. A két tartály között töltött részecskék számára átjárást biztosítunk. A két elektród között egy elektromos tápegységgel elektromos potenciálkülönbséget hozunk létre. Ennek hatására elektronok áramlanak az anód felől a katód felé. A katódra az elektronokat a pufferben lévő vízmolekulák veszik fel, hidrogén gáz és hidroxidionok keletkeznek. Az anódon vízmolekulák adnak le elektront, oxigén gáz és protonok (illetve ezek víz molekulákra kerülésével hidroxónium ionok) keletkeznek. A tartályok közötti, töltött részecskék számára átjárható összeköttetésen a pozitív ionok (kationok) a negatív katód felé, a negatív ionok (anionok) pedig a pozitív anód felé vándorolnak.

A töltéssel rendelkező testre F_e elektromos erő hat, amelynek értéke egyenlő a „ q ” töltés és az „ E ” elektromos térerő szorzatával:

$$F_e = q \times E \quad (7.1)$$

Az E elektromos térerő mértékegysége (newton/coulomb), illetve (volt/cm). Az elektroforézisek egyik fő paramétere az alkalmazott elektromos térerő, amit volt/cm értékben adnak meg.

A vándorló részecskére kis sebesség esetén a sebességgel (v) egyenesen arányos mértékű, a vándorlás irányával ellentétes irányú F_k közegellenállási erő hat:

$$F_k = f \times v \quad (7.2)$$

A közegellenállási erő nagysága a közegre és a testre vonatkozó információkat egyaránt tartalmazó közegellenállási együtthatóval (f) fejezhető ki. Minél nagyobb a részecske, és minél „akadályozóbb” a közeg, annál nagyobb az „ f ” értéke.

Az elektroforézis elindításakor a részecske (pillanatszerűen rövid idő alatt) arra a sebességre gyorsul, amelynél a közegellenállási erő értéke éppen eléri az ellentétes irányú elektromos erő értékét:

$$q \times E = f \times v \quad (7.3)$$

A részecskére ható eredő erő ekkor nulla, tehát a részecske innen egyenletes sebességgel halad ($F_e = F_k$, tehát $F_{eredő} = 0$).

A részecske elektroforetikus mozgékonyasága (μ) megmutatja, hogy az adott részecske (adott közegben) egységnyi térerő esetén mekkora sebességgel vándorol. Ez egyenesen arányos a töltésével, és fordítottan arányos az adott közegre és a részecskére együttesen jellemző közegellenállási együtthatóval.

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} \quad (7.4)$$

Az eltérő mozgékonyaságú töltött részecskék elektroforézis során egymástól elválaszthatók, hiszen azonos közegben azonos elektromos térerő alkalmazásával eltérő sebességgel vándorolnak.

A biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatoknál a töltéssel rendelkező makromolekulák közül leginkább a fehérjék és a nukleinsavak elválasztásához alkalmazzák az elektroforézis elvét. Minden esetben valamilyen térhálós gélben zajlik az elektroforézis, ezért ezeket az eljárásokat összefoglalóan gélelektroforézis eljárásoknak nevezzük.

7.2. A gélelektroforetikus technikákról általában

Az elektroforézis fent említett elve önmagában nem követeli meg, hogy annak során valamilyen gélt is alkalmazzunk. A kezdetek kezdetén nem is alkalmaztak géleket. A töltéssel rendelkező részecskéket homogén folyadékfázisban vándoroltatták. Ezzel az eljárással alapvetően három probléma adódott.

Az egyik, hogy a közönséges folyadékok az eltérő méretű ionok mozgását ugyan eltérő mértékben akadályozzák, de ez az eltérés igen kismértékű, tehát az elválasztás nem hatékony. A másik fontos probléma azzal kapcsolatos, hogy egyszerű folyadékfázis esetén a folyadékfázisban akár kis hőmérsékletkülönbségek hatására is áramlások indulnak el, amelyek rontják az elválasztást. A harmadik probléma abból adódik, hogy folyadékfázisban a (minden irányban zajló) diffúzió mértéke is magas, ami szintén rontja az elválasztás hatékonyságát.

Mindhárom problémára megoldást kínál a térhálós gélek alkalmazása. Az ionokat nem homogén puffer közegben vándoroltatjuk, hanem egy olyan puffer közegben, amelyet valamilyen térhálós gél „sző át”. Ez a gél megakadályozza a folyadékáramlás kialakulását, és az egyszerű folyadékfázishoz képest lényegesen nagyobb mértékben akadályozza a részecskék mozgását, ezáltal csökkenti a diffúzió mértékét. Mindezek mellett az elválasztás hatékonysága szempontjából a gél legfontosabb szerepe az, hogy a vándorló részecskék méretétől függően radikálisan eltérő mértékű akadályt jelent. Az adott térhálós géltre jellemző átlagos pórusméretnél nagyobb részecskék a gélben gyakorlatilag nem vándorolnak, azokat tehát visszatartja. A pórusméretnél jóval kisebb részecskék számára a gél „érzékelhetetlen” vagyis ezekre csak a pufferoldatra jellemző közegellenállás érvényesül. A két szélsőérték közötti részecskeméret tartományban azonban a gél erősen méretfüggő módon lassítja a részecskék vándorlását. Ebből következik, hogy egy-egy konkrét gél csak egy-egy konkrét részecskeméret tartományban használható, tehát minden konkrét feladathoz tartozik egy optimális pórusmérettel rendelkező gél.

Az elektroforézis során alkalmazott géllal szemben a következő általános követelmények merülnek fel. Legyen vízzel nedvesedő, kémiailag stabil (ne lépjen kémiai reakcióba az elektroforézis során), ne hordozzon töltéseket (ne viselkedjen ioncserélőként), legyen fizikailag ellenálló (tehát könnyen kezelhető), legyen átlátszó, ne festődjön az elválasztott anyagok kimutatására használt festékkel, s legyen szabályozható a pórusmérete.

Nem ismerünk olyan anyagot, amely a molekuláris biológia által vizsgált igen nagy részecskeméret tartományt önmagában átfedné, tehát olyat, amelyből szélsőségesen eltérő pórusméretű géleket lehetne készíteni. A molekuláris

biológiai vizsgálatokban alapvetően kétféle anyag vált be, amelyek megfelelnek a fenti kritériumoknak. Az egyik a poliakrilamid, a másik az agaróz. A poliakrilamid gélben az akrilamid gyökös polimerizációjával keletkező poliakrilamid szálakat kovalens kötések kötik össze. Az agaróz gélben ezzel szemben a poliszacharid láncok között másodlagos kötőerők alakulnak ki. A poliakrilamid gélek pórusmérete viszonylag kicsi, ezért ezt a gélt elsősorban fehérjék és kisebb nukleinsavak elválasztásánál alkalmazzák. Az agaróz gélek pórusmérete sokkal nagyobb, ezért elsősorban nagyméretű nukleinsavak elválasztására használják. A továbbiakban az egyes poliakrilamid illetve agaróz-alapú eljárásokat tekintjük át.

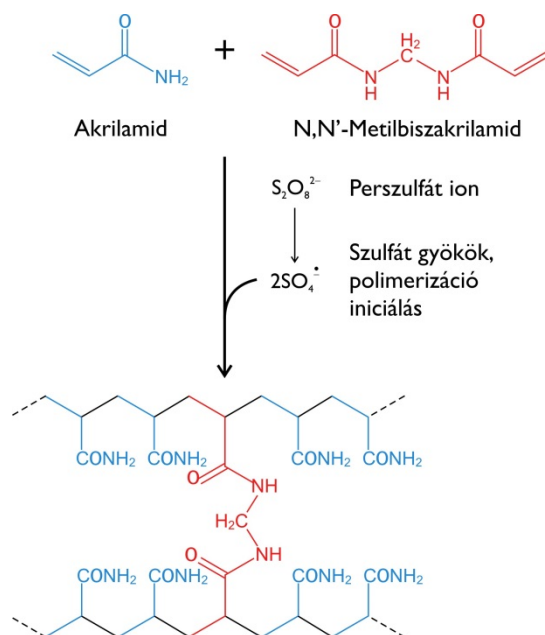
7.3. A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

7.3.1. A PAGE módszerről általában

Mint fent már korábban említettük, a poliakrilamid gélt kisebb nukleinsavak elválasztásánál is alkalmazzák. A Sanger-féle DNS szekvenálás esetében például ezzel a módszerrel választják el egymástól az eltérő hosszúságú, lineáris, egyszálú DNS molekulákat. Az eljárás felbontása a néhány száz 10-bázis hosszútól a nagyjából 1000 bázis hosszúságig terjedő mérettartományban olyan nagy, hogy képes az egymástól csak 1-1 bázis hosszal eltérő molekulákat is elválasztani. DNS esetében tehát egyértelműen a lánc hossza szerint zajlik az elválasztás. Ennek az az oka, hogy a DNS (és RNS) esetében az egységnyi molekulatömegre (polimer-hosszra) eső negatív töltések száma, vagyis a relatív töltés azonos. Ez annak köszönhető, hogy minden monomer egység tartalmaz egy foszfátcsoportot, ami a negatív töltést hordozza. Megfelelő denaturálószer (pl. urea) alkalmazása mellett a lineáris molekulák alakja is azonos lesz. Így kizárólag a denaturált molekula mérete szerint válnak majd el egymástól. (Ugyanezt látjuk majd az SDS-PAGE esetében fehérjék vonatkozásában, lásd később). A PAGE módszernek azonban számos olyan változata van (SDS-PAGE, izoelektromos fókuszálás, 2D PAGE), amelyek elsősorban fehérjék különböző tulajdonságok szerinti elválasztására alkalmas.

A különböző fehérjék egy adott pH értéken más-más töltéssel rendelkeznek. Ráadásul az egyes fehérjék mérete és alakja is eltérő. Ha vizes oldatban elektromos erőtér alkalmazásával a fehérjéket vándorlásra készítjük, az egyes fehérjék eltérő töltésük, méretük és alakjuk miatt különböző sebességgel mozognak, és ez alapján egymástól elválaszthatók. Mivel az elválasztás egyszerre többféle elven zajlik, ezért ugyan nagyhatékonyságú, de pusztán egy-egy elválasztás alapján nem tudjuk meghatározni, hogy egy adott fehérje miért vándorol gyorsabban egy másiknál: elsősorban azért, mert nagyobb a töltése, vagy azért, mert kisebb a mérete. A fent már említett, később ismertetendő PAGE változatokat éppen azért fejlesztették ki, hogy a fehérjék kizárólag méret, vagy éppenséggel kizárólag izoelektromos pont alapján váljanak el (lásd később).

A poliakrilamid gél létrehozása: az akrilamid vizes oldatban, megfelelő katalizátorok és iniciátorok jelenlétében gyökös polimerizációra képes, és a reakció során nagy molekulatömegű, lineáris polimer, ún. poliakrilamid keletkezik. Mivel az akrilamid rákkeltő és mutagén, alkalmazásánál megfelelő óvatosság szükséges. A polimer forma azonban már nem mérgező. Ez utóbbi vizes oldata nagy viszkozitású. Ha megfelelő keresztkötő ágens, N,N'-metilénbiszakrilamidot is alkalmazunk, a hosszú poliakrilamid láncok között "hidak" képződnek, és térhálós szerkezetű gél jön létre (7.2 ábra). Az elektroforézis során az ionokat (nukleinsavakat vagy fehérjéket) ebben a gélben vándoroltatjuk.

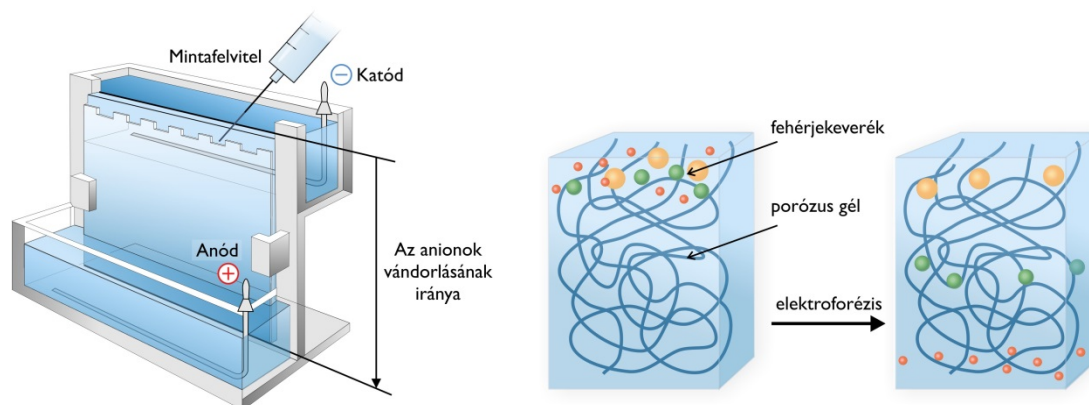


7.2. ábra. A poliakrilamid gél molekuláris felépítése. A térhálós gél poliakrilamid monomerek és N,N'-metilénbiszakrilamid keresztkötő komponensek gyökös polimerizációjával jön létre.

Mint arról már szó esett, az eljárás különlegesen nagy felbontóképességgel rendelkezik, a gélben a molekulák sebességére töltésük, méretük, illetve alakjuk is befolyással bír. A gél méret szerinti „molekulaszűrő” hatását a gél átlagos pórusmérete szabja meg. A pórusméret az akrilamid monomer koncentrációjának és a térhálósító metilénbiszakrilamid százalékos arányának alkalmas megválasztásával tág határok között változtatható. A gél mechanikus tulajdonságai kb. 4-20% akrilamid koncentráció-tartományban kedvezőek. A keresztkötő metilénbiszakrilamid mennyisége az alkalmazott akrilamid monomernek rendszerint 1-3%-a. A poliakrilamid rendelkezik mindazon már említett tulajdonságokkal (hidrofil, nem hordoz töltéseket, kémiaiilag stabil), amik az elektroforézis során előnyösek. Ezekon felül további fontos tulajdonsága, hogy az elválasztandó fehérjékkel nem lép semmilyen fehérje-specifikus kölcsönhatásba, és nem zavarja a fehérjék detektálására szolgáló festési reakciókat sem. Ha az elektroforézist natív (nem-denaturáló) közegben, alacsony hőmérsékleten végezzük, számos enzim megőrzi natív szerkezetét és így enzimaktivitását, ami alapján ezek a gélben specifikusan kimutathatók.

Gélkészítés során az igény szerinti koncentrációjú akrilamid / metilénbiszakrilamid oldathoz megfelelő pH értékű pufferoldatot keverünk, majd a gyökös polimerizációt egy alkalmas katalizátor és iniciátor hozzáadásával indítjuk el. A katalizátor általában peroxidszulfát, mely vizes közegben spontán bomlik, ami által szabad gyökök keletkeznek. Ezek a szabad gyökök azonban önmagukban nem képesek az akrilamid molekula kettős kötését felhasítva elindítani a gyökös polimerizációt, viszont gerjesztik az iniciátor molekulákat. Ez utóbbiakból ekkor olyan szabad gyökök alakulnak ki, amelyek 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, így a gélesedés 10-30 perc alatt teljes mértékben végbemenjen.

Az elektroforézis "geometriája" szerint kétféle eljárás használatos. Az elsőként kidolgozott módszer esetében a pufferrel, katalizátorral, iniciátorral összekevert akrilamid / metilénbiszakrilamid oldatot egy az egyik végén lezárt üvegcsőbe öntik. Az így létrejövő géloszlopban csak egyetlen mintát lehet futtatni. A jelenleg elterjedt eljárásokban a fent említett oldatot két, egymással párhuzamos üveglap közé töltjük (7.3. ábra). Így egy gél lemez alakul ki, amelyben egyidejűleg, egymás mellett, azonos körülmények között számos mintát futtathatunk, melyek ily módon egymással könnyen összehasonlíthatók. Ez nagyban megkönnyíti az elektroforézis eredményének kiértékelését.



7.3. ábra. Fehérjék elválasztása poliakrilamid gél lemezben. Amint azt az ábra mutatja, az elektroforézis készülékben párhuzamosan több mintát is vándoroltathatunk egyetlen gél lemezben. A katód és az anód között csak a gélen keresztül vándorolhatnak az ionok. A gél molekulaszűrőként viselkedik, minél nagyobb a vándorló molekula, annál jobban akadályozza a gél annak mozgását.

Az elektroforézis sikerét döntő mértékben befolyásolja a gél akrilamid koncentráció és a pH 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 vezetés legnagyobb részét 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 puffer koncentráció esetén viszont túl kicsi lesz a fehérjék mobilitása, ami szintén rontja az elválasztás minőségét, mivel a megnövekedett időigény miatt a diffúzióra is több idő jut.

Az alkalmazott puffer rendszerek szempontjából a gélelektroforetikus technikákat két nagy csoportba oszthatjuk. Folytonos (kontinuus) puffer rendszerről beszélünk, amikor ugyanazt a puffert alkalmazzuk a gélben, mint az elektródokat tartalmazó puffer-tankokban. Ennek a módszernek az előnye az egyszerűségében rejlik, viszont a felbontóképessége valamivel rosszabb, mint a bonyolultabb ún. diszkontinuus puffer rendszereké.

A diszkontinuus elektroforetikus technikák két különböző koncentrációjú gélt, és három különböző puffer rendszert alkalmaznak. A futtató (más néven szeparáló) gél fölül egy ún. koncentráló (más néven: tömörítő) gélt polimerizálunk. Ennek akrilamid koncentrációja a futtató gélénél jóval alacsonyabb, olyannyira, hogy itt a molekulaszűrő hatás még nem érvényesül. A három különböző puffer rendszerben 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. Tank pufferként viszont olyan puffer rendszert alkalmaznak, melynek anion komponense egy gyenge sav savmaradéka, pl. glicinát anion. A tankpufferben a pH 8.3.

A kistérfogató fehérjemintát a koncentráló gél felszínére rétegezzük. Feszültség hatására a fehérjeionok és a tank puffer 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 glicin molekula csak parciálisan negatív (az idő nagy részében nettó semleges ikerionos állapotban van), elektroforetikus mobilitása alacsony, így lokálisan csökken a töltéssel rendelkező molekulák koncentrációja. Ez helyileg megnöveli az elektromos ellenállást. Minthogy az elektromos körben az áramerősség állandó kell, hogy legyen, (nincs makroszkopikus töltésszétválás), Ohm törvényének megfelelően az ellenállással arányosan megnő a térerő is, ezért a fehérjék vándorlása felgyorsul, amíg el nem éri az ionokban gazdag, kis elektromos ellenállású klorid ion frontot. Minthogy a klorid ion frontban az ellenállás, és így a térerő kicsi, a fehérjék sebessége csökken, és a front mögött mintegy összetorlódva igen vékony sávban vándorolnak a futtató gél felszínéig.

A futtató, vagy más néven szeparáló gélben a helyzet megváltozik. A szeparáló gél pH értéke 8.8-9.0 között van. Ezen a pH-n a glicinben lévő aminosocsoportok egy része elveszti az extra protonját, így elveszti a pozitív töltését. A glicinát ion parciálisan negatív töltése emiatt megnő, ezért mobilitása is megnövekedik. Így a glicinát töltéshiányából eredő koncentráló hatás megszűnik, a fehérjék a továbbiakban különböző töltésük miatt eltérő sebességgel

vándorolnak. Ráadásul a futtató gél akrilamid koncentrációját már úgy választjuk meg, hogy a molekulaszűrő hatás is érvényesüljön, és a gél az elválasztani kívánt fehérjék mérettartományában a lehető legnagyobb mértékben szeparáljon méret szerint is.

Az elektroforetikus eljárások többségénél a futtatás során jelzőfestéket alkalmazunk, amit a mintába keverünk. Ez a kis molekulatömegű, negatív töltésű festék rendszerint gyorsabban vándorol a gélben, mint az elválasztandó makromolekula-ionok (pl. fehérjék). A festék mintegy láthatóvá teszi a futási frontot, így egyértelművé válik, mikor tekinthető az elválasztás befejezettnek. A leginkább használatos jelzőfesték a brómfenolkék.

A továbbiakban ismertetjük az egyes PAGE eljárásokat, a legegyszerűbttől az egyre összetettebb felé haladva.

7.3.2. Natív PAGE

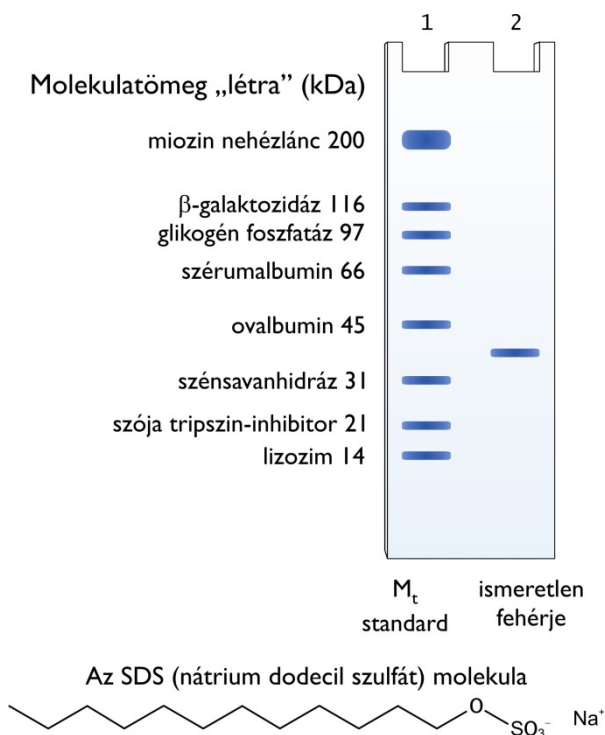
A natív PAGE fehérjék elválasztására szolgáló eljárás. Ennek során igyekszünk olyan körülmények közepette vándoroltatni a fehérjéket, hogy azok megtartsák natív térszerkezetüket. Az elektroforézist tehát nem-denaturáló közegben, és rendszerint alacsony hőmérsékleten végezzük. Ilyen körülmények között számos enzim megőrzi natív szerkezetét és így enzimaktivitását. Ezáltal ezek 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 amelynek terméke színes és oldhatatlan. Így ahol a gélben az adott enzim megtalálható, ott annak helyét színes csapadék jelzi.

Ezen felül a natív PAGE kiválóan alkalmas arra is, hogy egy olyan, alaposan megtisztított fehérjepreparátum esetén, amely csak egyetlen fehérjét tartalmaz, megnézzük, hogy az valóban homogén-e. Egyetlen éles csíkot csak akkor kaphatunk, ha a fehérjénk homogén. Amennyiben a tisztítás során a fehérjemolekulák egy része kémiaiilag módosult, (pl. dezaminálódott, vagy diszulfidhíd átrendeződésen ment át), esetleg aggregálódott, úgy egynél több csíkot kapunk. A natív PAGE arra is kiválóan alkalmas, hogy detektáljuk vele két vagy több fehérjekomponens egymással alkotott komplexének kialakulását. A kovalens kötésekkel, vagy éppen másodrendű kölcsönhatásokkal létrejövő alegységszerkezet, vagy két önálló fehérje (pl. enzim-inhibitor, receptor-ligandum) között kialakuló komplex ugyanis a natív elektroforézis során stabilan együtt marad, együtt vándorol.

A natív elektroforézisek során különösen ügyelni kell arra, hogyan viszonyul egymáshoz a gélben alkalmazott puffer pH értéke és az elválasztani kívánt fehérje, vagy fehérje-komplex izoelektromos pontja, hiszen ez szabja meg a fehérje vándorlási irányát.

7.3.3. SDS PAGE

Az SDS PAGE is fehérjék elválasztására használt módszer, csakhogy itt a fehérjéket denaturált állapotukban vándoroltatjuk. Az általános bevezetőben leírtak szerint a hagyományos (natív) akrilamid gélelektroforézis során a szeparáció a fehérjék töltésétől, alakjától és méretétől egyaránt függ, ezért első megközelítésben nem alkalmas pl. fehérje molekulatömeg meghatározásra. Arra sem ad választ, hogy egy már tisztított mintában lévő fehérje több alegységes-e, hiszen natív körülmények között az alegységek együtt maradnak. Ezen kérdések megválaszolására a poliakrilamid gél elektroforetikus technikák leginkább elterjedt válfaja, az SDS poliakrilamid gélelektroforézis bizonyult alkalmasnak (7.4 ábra).



7.4. ábra. SDS poliakrilamid gélelektroforézis. Az SDS (sodium dodecyl sulfate) egy anionos detergens, amely kitekeri, és a polipeptidlánc hosszával arányos mennyiségű extra negatív töltéssel látja el a fehérjéket. Az SDS-kezelt fehérjék a poliakrilamid gélben méretük szerint válnak el egymástól. A vándorlás sebessége és a molekulatömeg logaritmusában fordított arányban vannak egymással. Ismert molekulatömegű kalibráló fehérjék (lásd molekulatömeg „létra”) segítségével a vizsgált fehérje molekulatömege meghatározható.

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

A kötődött SDS mennyisége nagyjából független 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 az egyes fehérjék ugyanolyan módon lesznek kizárólag méretük szerint elválaszthatók, ahogy korábban azt a lineáris egyszálú (denaturált) DNS molekulák PAGE elválasztása során már láttuk. A bevezetőben említett három tulajdonság (relatív töltés, alak, méret) szerinti szeparálás helyett ugyanis itt is csak méret szerinti szeparáció történik. Mivel a molekulaméret arányos a molekulatömeggel, az SDS poliakrilamid gélelektroforézis végső soron molekulatömeg szerint szeparál.

Ez a legelterjedtebb, legolcsóbb módszer a fehérjék aegység molekulatömegének viszonylag pontos 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 fehérjék aegység molekulatömege leolvasható.

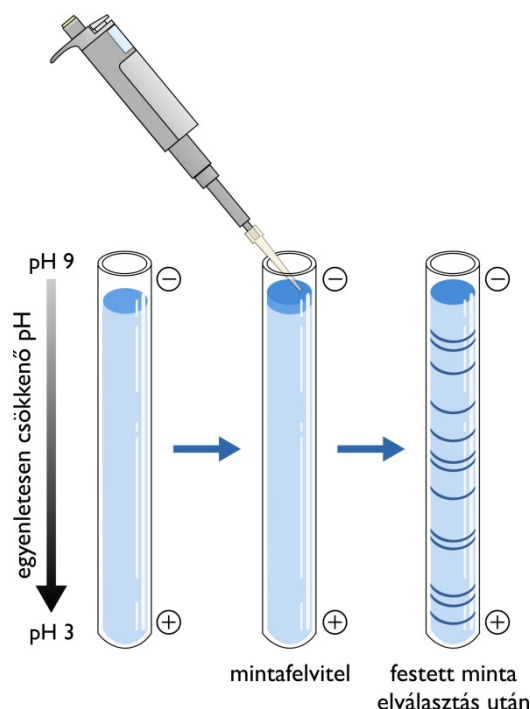
Az alábbi táblázat azt mutatja, hogy különböző akrilamid koncentrációjú gélek esetén milyen mérettartományban teljesül a relatív mobilitás és a molekulatömeg logaritmus között előbb említett összefüggés:

Akrilamid koncentráció (%)	Az elválasztás lineáris tartománya (kDa)
15	12-43
10	16-68
7.5	36-94
5.0	57-212

Az SDS poliakrilamid gél elektroforézis a leginkább elfogadott módszer annak eldöntésére, hogy egy fehérje, ill. enzimpreparátum homogén-e. Különösen jól alkalmazható bonyolultabb fehérje-asszociátumok, multienzim komplexek, például a miofibrillum vizsgálatára (lásd később). A denaturáló SDS PAGE során ezek a komplexek alkotóikra esnek szét, és az egyes polipeptid láncok külön-külön vándorolnak a gélben. A fehérjék gélben történő megfestésével mennyiségi meghatározásra is lehetőség nyílik, így nem csak azt lehet megállapítani, hogy egy alaposan megtisztított, sokkomponensű komplex hányféle alegységből áll, de meg lehet határozni az egyes alegységek számának egymáshoz viszonyított arányát is.

7.3.4. Izoelektromos fókuszálás

Izoelektromos fókuszálás során olyan körülményeket teremtünk, hogy a fehérjék kizárólag az izoelektromos pontjuk alapján váljanak el egymástól (7.5. ábra). Az eljárás azon alapul, hogy a fehérjéken lévő, proton leadásra illetve felvételre képes csoportok disszociációs állapota függ a környezetük pH értékétől (lásd Henderson-Hasselbalch egyenlet). A fehérjék nettó töltése tehát függ a közeg pH értékétől. Amennyiben egy fehérjén a savas oldalláncok (Asp, Glu) száma meghaladja a bázikus (Arg, Lys, His) oldalláncok számát, úgy a fehérje semleges közegben negatív töltésű lesz, izoelektromos pontja (IEP), vagyis az a pH érték, amelyen a fehérje eredő töltése nulla, a savas tartományba esik. Az ilyen fehérjéket savas fehérjéknek is nevezzük. Amikor a fehérje bázikus oldalláncainak a száma múlja felül a savas oldalláncok számát, akkor semleges közegben a fehérje pozitív töltésű lesz, izoelektromos pontja a bázikus pH tartományba esik. Ezeket a fehérjéket bázikus fehérjéknek is szokták nevezni.



7.5. ábra. Izoelektromos fókuszálás. Izoelektromos fókuszálás során a (rendszerint poliakrilamid) gélben pH gradienst hoznak létre. Ebben a gradienstben minden fehérje abban térrészben halmozódik fel, ahol a pH értéke megegyezik a fehérje izoelektromos pontjával. Mivel a fehérjén ekkor a negatív és a pozitív töltések száma éppen megegyezik, a fehérjére nem hat eredő elektromos erő.

Mivel az eltérő fehérjék IEP értéke igen széles tartományt fed le, ezért az izoelektromos pont alapján történő elválasztás hatékony módszer. Ha a közeg pH értéke alacsonyabb, mint a fehérje IEP értéke, akkor a fehérje pozitív töltésű lesz, és elektroforézis során a katód felé vándorol. Ha a közeg pH értéke magasabb, mint a fehérje IEP értéke, akkor a fehérje töltése természetesen negatív lesz, és a fehérje az anód felé vándorol. Ha a pH értéke éppen megegyezik a fehérje IEP értékével, akkor a fehérje nettó töltése nulla, ezért elektroforézis során nem vándorol.

Amennyiben olyan közegbe helyezzük a fehérjét, amelyben a pH a katód és az anód között fokozatosan (gradiens mentén) változik, úgy a fehérje elindul a vele ellentétes töltésű pólus felé. A pozitív töltésű anódnál alacsony pH értékű közeget, a negatív töltésű katódnál magas pH értékű közeget hoznak létre. Miközben a fehérje a változó pH értékű közegben vándorol, a töltése is változni fog. Ha negatív töltésűként az anód felé vándorol, úgy az egyre savasabb közegben egyre több protont vesz fel egészen addig, míg a rajta lévő negatív és pozitív töltések száma megegyezik, vagyis eléri az izoelektromos pontját. Ekkor a fehérjére nem hat eredő elektromos erő, ezért nem vándorol tovább. Ha a spontán diffúzió miatt mégis közelebb kerül az anódhoz, akkor újabb protonok felvétele miatt pozitív töltésűvé válik, és visszafelé vándorol a katód felé. Ugyanilyen gondolat mentén, ha az adott fehérje pozitív töltésűként a katód felé vándorolt, akkor az egyre magasabb pH értékű tartományon át haladva fokozatosan protonokat ad le, míg eléri izoelektromos pontját, és megáll. Ha diffúzióval közelebb kerül a katódhoz, akkor protonokat ad le, és az elektromos erő újra az anód felé vándoroltatja. Tehát a fehérjék mindegyike a saját IEP értékének megfelelő pH értékű gél-tartományba fókuszálódik, a fehérjék IEP értékük alapján válnak el egymástól. A fenti folyamatok logikájából következik, hogy érdektelen, hogy a fehérjét a gél mely pontján visszük a rendszerbe, ettől függetlenül „megtalálja” az IEP értékének megfelelő pontot.

Az eljárás meghatározó eleme, hogy egy - lehetőleg lineáris - gradiens szerint változó pH értéket hozunk létre a gélben. Erre két módszer ismeretes. Az egyik az amfolit hordozók alkalmazása. Az amfolit kifejezés az amfoter elektrolit kifejezés rövidítése. Az amfolitok olyan kis szerves molekulák, amelyeken egyszerre vannak jelen gyenge savas és gyenge bázikus csoportok. Ezeknek az anyagoknak az eredő töltése is a pH függvénye. Az izoelektromos fókuszálás során olyan amfolitokból készítenek keveréket, amelyek IEP értéke egymástól csak kismértékben tér el, és együttesen átfednek egy bizonyos IEP tartományt. Ezt a keveréket a gélbe juttatják, és létrehozzák a gélben az elektromos teret. Ekkor a fehérjékre már említett folyamat zajlik le. Minden amfolit elindul a töltésének megfelelően valamelyik pólus felé, majd az izoelektromos pontjánál megáll. Mivelhogy ez a folyamat lezajlott, az amfolitok pufferként működve stabilan tartják a közvetlen környezetük pH értékét. Így alakul ki a pH gradiens,

amiben a fehérjék elválaszthatók. A másik, a fenténél még finomabban szabályozott pH gradienst úgy hozzák létre, hogy speciális amfolitokat alkalmaznak. Olyanokat, amelyeket kovalens kötésekkel bele lehet polimerizálni az akrilamid gélbe. A géllöntés során hozzák létre a leendő gél oldatában a megfelelő amfolitok gradiensét, amely a gél polimerizáció során kovalensen rögzül. Így ezekben a gélekben egyfajta immobilizált pH gradiens alakul ki. Az, hogy milyen értékek között érdemes a pH gradienst létrehozni, függ az elválasztandó fehérjék IEP értékeitől.

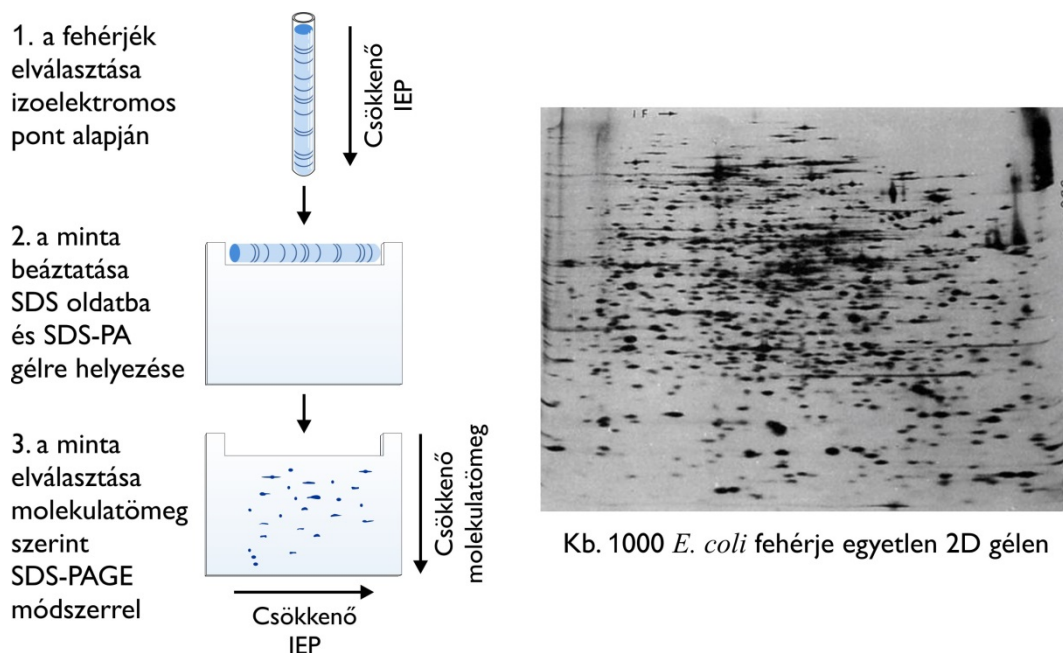
Bármelyik eljárással hozzuk is létre a pH gradienst, amikor már minden fehérje elérte az IEP értékének megfelelő helyzetet a gélben, az elektroforézist folytatva nem történik további vándorlás. A rendszer egyfajta állandósult állapotba kerül.

Az izoelektromos fókuszálás során jelentkező egyik potenciális technikai problémát az jelenti, hogy a fehérjék oldhatósága izoelektromos pontjukon a legalacsonyabb, így egyes fehérjék az IEP értékük közelében kicsapódhatnak a gélben. Ezt megakadályozandó leggyakrabban ureát is adnak a rendszerbe, amely segít oldatban tartani a fehérjéket. Ez egyes fehérjék esetében ahhoz vezet, hogy a fehérje oldatban marad, de denaturált állapotban lesz. Mivel az izoelektromos pont független attól, hogy a fehérje natív, vagy denaturált állapotú, ez a tény nem befolyásolja az eljárást. Membránfehérjék elválasztásánál pedig a fehérje oldatba vitelét nem-ionos detergenssekkel segítik elő.

Izoelektromos fókuszálásnál kizárólag IEP alapján igyekszünk elválasztani a fehérjéket, ezért a gél kizárólag a keveredésses folyadékáramlás megakadályozását szolgálja, tehát nem szabad molekulaszűrőként viselkednie. Ennek érdekében kifejezetten alacsony akrilamid koncentrációjú, nagy pórusméretű géleket alkalmaznak. Emiatt ritkábban ugyan, de ennél a technikánál agaróz gélt is alkalmaznak. Az eljárást leggyakrabban vízszintesen elhelyezett gélekben folytatják intenzív hűtés mellett.

7.3.5. Kétdimenziós (2D) elektroforézis

A legkülönbözőbb elválasztás technikák célja az, hogy egy sokkomponensű rendszer minden egyes összetevőjét elválassza az összes többi összetevőtől. Az elválasztás természetesen az összetevőknek valamilyen fizikai-kémiai tulajdonságban tetten érhető eltérésein alapul. Sokkomponensű elegyek esetében gyakori probléma, hogy pusztán egyetlen tulajdonság szempontjából nem tér el az összes komponens egymástól. Ilyenkor az adott tulajdonság szerinti elválasztás eredményeképpen lesznek olyan összetevők, amelyek homogéne elválnak a többitől, de lesznek olyanok is, amelyek továbbra is más összetevőkkel együtt, keverékben maradnak. Természetesen ezeket a keverékeket is el lehet választani komponensekre, amennyiben egy, az előzőekben alkalmazottól eltérő, attól lehetőleg tökéletesen független egyéb tulajdonság szerinti elválasztást alkalmazunk. Jó példa erre a fehérjék nagyhatékonyságú elválasztására bevezetett kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D PAGE), amelyben két, az előbbieken már tárgyalt technikát kombinálnak (7.6. ábra).



7.6. ábra. Kétdimenziós (2D) elektroforézis. A 2D elektroforézis az izoelektromos fókuszálás és az SDS PAGE kombinációja. Először izoelektromos pont, majd méret szerint választjuk el a fehérjéket. Mivel ez a két tulajdonság egymástól teljesen független, a kétféle eljárás kombinálásával lényegesen hatékonyabban választhatjuk el az egyes fehérjéket egymástól, mint a két egyedi eljárással külön-külön.

Az első lépésben alkalmazott technika az izoelektromos fókuszálás, amelynek során a fehérjéket izoelektromos pontjuk szerint választják el egymástól. Ennél a lépésnél egyetlen mintahelyet alkalmaznak, és az elválasztás egy egy-mintahelyes gélcsíkbán történik. Ekkor mind konkrét, mind pedig átvitt értelemben is egy dimenzióban választjuk el a fehérjéket. Konkrét értelemben úgy, hogy egyetlen vonal mentén válnak el egymástól, átvitt értelemben pedig azért, mert egyetlen adott tulajdonság (IEP) szerint válnak el egymástól.

Amint az első dimenzióban megtörtént az elválasztás, ezt a gél-csíkot SDS oldattal itatják át, és egy SDS poliakrilamid gél egyik szélére illesztik. Az elektródok megfelelő elrendezésével az IEP alapján elválasztott fehérjéket az eredeti elválasztási irányra merőlegesen bevándoroltatják az SDS poliakrilamid gélbe, és végrehajtanak egy már ismert SDS PAGE elválasztást. Ennél a lépésnél tehát konkrét, és átvitt értelemben is egy másik dimenzió szerint zajlik az elválasztás. Egyrészt az előző elválasztási irányra merőleges, második térdimenzióban válnak el a komponensek, másrészt az előzőekben alkalmazott tulajdonságtól (IEP) teljesen független második tulajdonság, a molekulaméret szerint történik ez az elválasztás. Tehát amennyiben az izoelektromos fókuszálás során egy-egy térrészben még több, azonos IEP értékű fehérje volt jelen, úgy ezek most méret szerinti elválhatnak egymástól. Erdemes megjegyezni, hogy erre a második elválasztásra mindaz érvényes, amit az SDS PAGE esetében már leírtunk. Azok a másodlagos kölcsönhatások, amik az izoelektromos fókuszálásnál esetleg még egyben tartottak fehérje alegységeket megszüntnek, és az egyes alegységek elválnak egymástól. A diszulfid hidak felbontásához természetesen itt is redukáló szert kell alkalmazni. Ebben a második dimenzióban tehát elkülönült polipeptidláncok vándorolnak. Tehát amennyiben az izoelektromos fókuszálásnál egy adott térrészben egy adott több-alegységes fehérje volt jelen, úgy a második dimenzió szerinti elválasztásban most már annak alegységei vándorolnak. Ha eltérő méretű alegységekből áll a fehérje, úgy ezek az alegységek a második dimenzióban elválnak egymástól.

7.4. Az agaróz gélelektroforézis

Amint azt már a bevezetőben írtuk, a gél pórusmérete dönti el, hogy milyen méretű molekulákat lehet elválasztani egymástól benne. A kutatások során vizsgálандó DNS molekulák gyakran több mint ezer bázispárból állnak (*lásd 10. fejezet*). 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 gélben 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 (sol) 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 a gél agaróz koncentrációjától függ. Az agaróz gélre is igaz, számos, már az akrilamid gélnél is említett előnyös tulajdonság. Ez a gél is hidrófil, kémiaiilag inert, stabil, és nem köt meg számos olyan festéket, amelyet a benne elválasztandó molekulák festésére használunk.

7.5. Festési eljárások

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

7.5.1. Általános fehérjefestékek

Számos olyan vegyületet ismerünk, melyek nagy hatékonysággal kötődnek fehérjékhez. Ezek használatakor célunk az, hogy lehetőleg az összes fehérjét kimutassuk a gélben. Ilyen festékek növekvő érzékenység szerint sorba állítva:

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

Ezek közül leggyakrabban a Coomassie Brilliant Blue-t használják. Segítségével a gél keresztmetszetétől és az adott fehérje speciális festődési tulajdonságától függően akár már 0.1 µg fehérje is jól detektálható.

7.5.2. Általános DNS-festékek

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. Ezért használatuk fokozott óvatosságot igényel.

A festék kisebb hatékonysággal az egyszálú DNS-t is festi, valószínűleg azért, mert nagy egyszálú DNS molekulákon belül is vannak egymással részlegesen komplementer szakaszok, amik miatt helyenként kétszálú részek jöhetnek létre.

Az etidium bromid mellett az utóbbi időben számos érzékenyebb, alacsonyabb háttér fluoreszcenciát biztosító és kevésbé mutagén festék is elérhetővé vált.

7.5.3. Specifikus fehérje-kimutatási eljárások

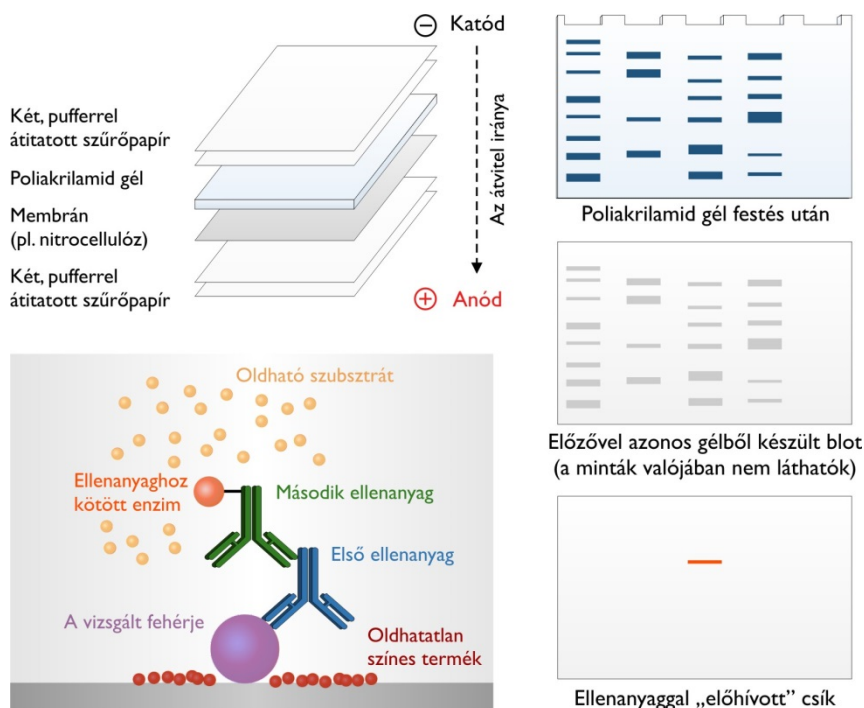
Ha nem az összes fehérjét akarjuk detektálni, hanem egy bizonyos fehérjét szeretnénk kimutatni, akkor két különböző eljárás áll rendelkezésünkre.

7.5.3.1 A Western „blot” (lenyomat) módszer

Ha rendelkezünk a kimutatandó fehérjével szemben specifikus ellenanyaggal, akkor úgynevezett Western blot eljárást alkalmazhatunk (7.7. ábra). Ennél a következő módon járunk el: a fehérjéket első lépésben SDS gélelektroforézissel elválasztjuk egymástól. Ezek után egy erre a célra kialakított készülékben a gélre 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.

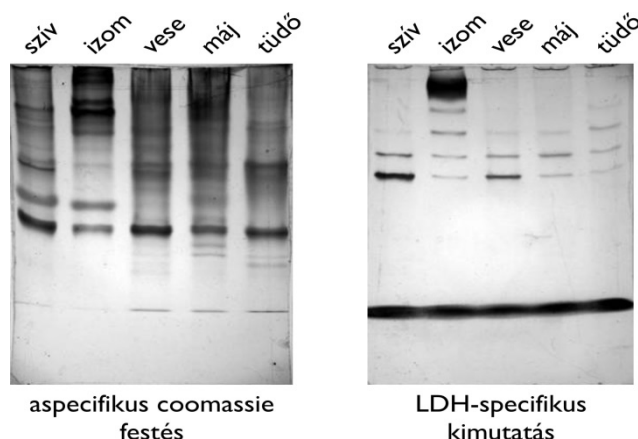
Erre a második ellenanyagra, mely specifikusan felismeri az első ellenanyag konstans régióját, még a felhasználás előtt kovalensen egy enzimet, leggyakrabban peroxidázt kötnek. Ezután a membránt az enzim mesterséges szubsztrátját tartalmazó oldatban inkubálják. Az enzimreakció terméke színes csapadék, mely végső soron ott jelenik meg, ahol a kimutatandó fehérje található.



7.7. ábra. A Western blot (lenyomat) eljárás sémája. A (rendszerint SDS-) PAGE eljárás után a fehérjéket a gél síkjára merőleges irányban végrehajtott, második elektroforézis lépésben egy (rendszerint) nitrocellulóz membránra visszük át. Ezen a membránon az ELISA eljárásokhoz hasonló elven mutatjuk ki akár több száz fehérje közül a keresett fehérjét. Ehhez egy, az adott fehérjére nézve specifikus ellenanyagot használunk. Annak érdekében, hogy ne kelljen célfehérjénként külön-külön enzimmel jelölni a specifikus ellenanyagot, egy olyan második ellenanyagot kapcsolnak enzimekhez, amely ellenanyag felismeri az elsőként alkalmazott, célfehérjénként eltérő ellenanyagok azonos, konstans részét. Az enzimreakció során egy oldható szubsztrátból színes csapadék keletkezik.

7.5.3.2. Enzimaktiváson 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 lejátszódik a kimutatandó enzim specifikitásának megfelelő enzimreakció. Olyan szubsztrátot használnak, mely a reakció során színes terméké alakul, és ez a termék ráadásul csapadék. Ez azt jelenti, hogy a gélnek csak azon területei színeződnek el, ahol az adott enzim van (7.8. ábra).



7.8. ábra. Tejsav dehidrogenáz (LDH) izoenzimek kimutatása. Az ötféle (M_4 ; M_3H ; M_2H_2 ; M_1H_3 ; H_4) LDH izoenzim egyes típusai natív gélelektroforézissel elválaszthatók egymástól úgy, hogy megőrzik enzimaktivitásukat. A baloldali ábrán a durva szövetpreparátum minták általános fehérjefestéssel lettek megfestve. A több száz jelenlévő fehérje szinte összefüggő sávokat eredményez. A jobboldali ábrán látható a specifikus szubsztráton alapuló kimutatás. A gélbe diffundáló, oldható szubsztrátból az enzimkatalizált specifikus reakcióban oldhatatlan színes csapadék keletkezik, amely természetesen kizárólag ott alakul ki, ahol az izoenzimek jelen vannak.

A fenti elvnek egy speciális változata a zimográfia eljárás, ami proteázok kimutatására szolgál. Ez az SDS PAGE olyan speciális változata, amelynél a szeparálógél készítésekor a gélbe nagy molekulású fehérje szubsztrátot, általában kazeint, vagy denaturált kollagént, (más néven zselatint) juttatnak be. A szeparálandó mintát ugyan SDS oldattal kezelik, de nem alkalmaznak redukáló szert, és nem forralják. A kimutatandó proteázok így is (nagy valószínűséggel) denaturált állapotba kerülnek, és így vándorolnak a gélben méretüknek megfelelő sebességgel. A futtatás után a gél nem-ionos detergenst tartalmazó oldatban áztatják annak érdekében, hogy az SDS-t eltávolítsák, és a jelenlévő proteáz molekulák legalább egy része renaturálódjon. Amint a renaturálódás megtörténik, megindul a gélben rögzített szubsztrát fehérjék hasítása. Az ekkor keletkező kis peptidok a gélből kidiffundálnak. A gél általános fehérjefestéssel való kezelése után a proteáz aktivitásnak megfelelő helyeken a gél halványabban festődik, illetve nem festődik. A proteázokat tehát egy negatív festési eljárással mutatjuk ki, azok helyét a festődés hiánya jelzi.

7.6. A fehérjeelválasztó gélelektroforézis technikák néhány jellegzetes példája

A DNS-elválasztási módszerekről a rekombináns DNS technikákat bemutató fejezetben még lesz szó (lásd 10. fejezet), ezért itt kizárólag a fehérjékkel kapcsolatos elektroforézis eljárásokra említünk meg néhány jellegzetes példát. Ezek a példák remélhetőleg jól megvilágítják a fejezetben eddig felsorolt elméleti ismeretek gyakorlati jelentőségét.

7.6.1 Natív PAGE - Tejsav-dehidrogenáz izoenzimek elválasztása és kimutatása

Azokat az enzimeket, melyek molekuláris szerkezete eltérő, de azonos kémiai reakciót katalizálnak, izoenzimeknek 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, az M (muscle) típusú, és a H (heart) típusú. Az M alegység főleg az vázizmokra, a H alegység pedig a szívizomra jellemző. A két alegységet két külön gén kódolja. A négy alegységes fehérjében az egyes alegységek úgy érintkeznek egymással, hogy egy képzeletbeli tetraéder csúcspontjaiban helyezkednek el.

Mivel a kétféle alegység véletlenszerűen kombinálódhat egymással, végeredményképpen ötféle izoenzim lehetséges:

M₄, M₃H, M₂H₂, MH₃ és H₄.

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 alakja és molekulatömege (34.000 Da) azonos, emiatt a tetramer izoenzimek alakja és molekulatömege (136.000 Da) is azonos lesz. Ugyanakkor a kétféle alegység töltése különböző, így az egyes izoenzimek töltése is különböző. A H alegység több negatív töltést hordoz, mint az M alegység.

Natív PAGE módszert alkalmazva a natív körülmények miatt az egyes alegységek nem válnak szét, tehát magukat a tetramer izoenzimeket vándoroltatjuk.

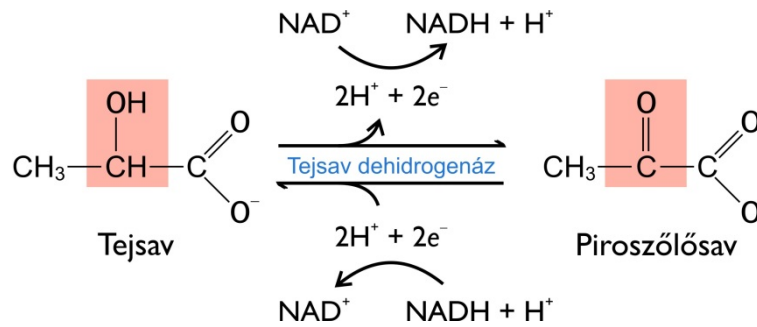
Mivel ezek alakja és mérete azonos, csak az eltérő töltéseik alapján válnak el egymástól. Az egyre több H alegységet tartalmazó izoenzimek rendre egyre több negatív töltést hordoznak. Ebből következően a H₄ izoenzim vándorol az anód felé a leggyorsabban, és az M₄ a leglassabban. Az egyes izoenzimek sebességei könnyen levezethető arányban állnak egymással.

Az egyre több H alegységet tartalmazó formákra egyenesen arányosan rendre egyre nagyobb elektromos erő (F_e) hat. Ugyanakkor az azonos méret, és azonos gél-közeg miatt a közegellenállási együttható (f) minden HDL izoenzimre azonos. Ebből következően az LDH izoenzimek mozgékonyága (μ), tehát egységnyi térerőre vonatkozó sebessége is lineárisan növekszik a H alegységek számával. Tehát ha adott térerő esetén az M₃H izoenzim sebessége X cm/órával nagyobb, mint az M₄ izoenzimé, akkor az M₂H₂ izoenzimé 2X, az MH₃-é 3X, a H₄-é 4X értékkel lesz nagyobb, mint az M₄ izoenzimé. Ugyanezt másképpen megfogalmazva: minden egyes M→H alegység csere azonos mértékű sebességnövekedést jelent. Ennek végeredménye az, hogy az elválasztás végén a szomszédos izoenzim csíkok egymástól azonos távolságban lesznek.

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 szérumra normálisan jellemző LDH izoenzim eloszlás ekkor elmozdul a sérült szövetre jellemző eloszlás felé.

A szövetekre jellemző izoenzim összetétel kimutatása igen bonyodalmas lenne, ha ehhez az enzimet homogén formában, tisztán kéne 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 (lásd 7-8. ábra). Így csak a vizsgált enzim helyén jelentkezik elszíneződés, ami leegyszerűsíti a kiértékelést.

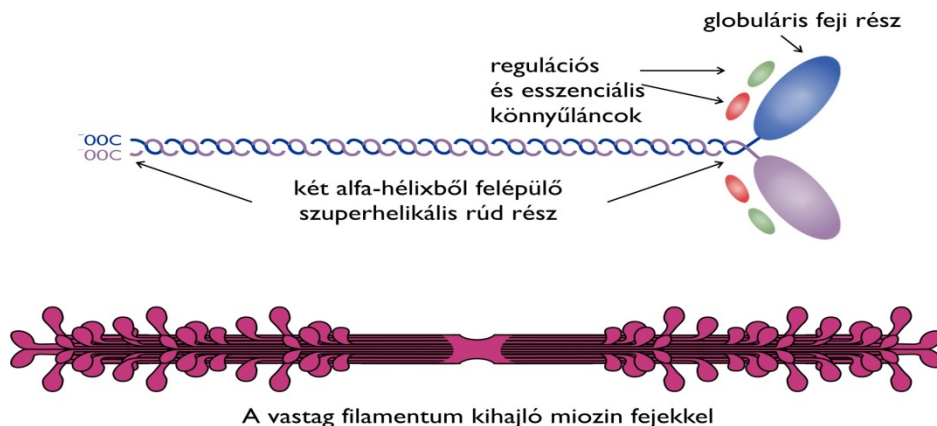
A tejsav dehidrogenáz a **7.9. ábrán** látható reverzibilis folyamatot katalizálja. Az LDH kimutatható egy speciális színreakcióval, mely a reakcióban szereplő NADH koenzim redukáló képességén alapul. A gél egy megfelelő puffer oldatban inkubáljuk, mely tejsavat, NAD koenzimet, fenazin-metaszulfátot (FMS, elektronakceptor), és para-nitro-tetrazólium-kéket (PNTK, redox festék) tartalmaz. A reakció során keletkező NADH redukálja a FMS-ot, ami az oxidált formában jelenlévő sárgás színű PNTK-et redukált formává alakítja. Az így keletkező termék egy sötétkék csapadék, amely a gélben színes csíkok formájában jelenik meg, az enzimet tartalmazó helyeken.



7.9. ábra. A tejsav dehidrogenáz enzim által katalizált kémiai reakció. A reverzibilis reakció során a reakció irányától függően vagy oxidált, vagy redukált NAD koenzim keletkezik. A 7.8. ábrán látható kimutatás során a gélhez tejsavat és oxidált NAD-ot adnak. A kimutatás a keletkező redukált NADH koenzimet használja fel egy kapcsolt reakcióban (lásd a főszövegben).

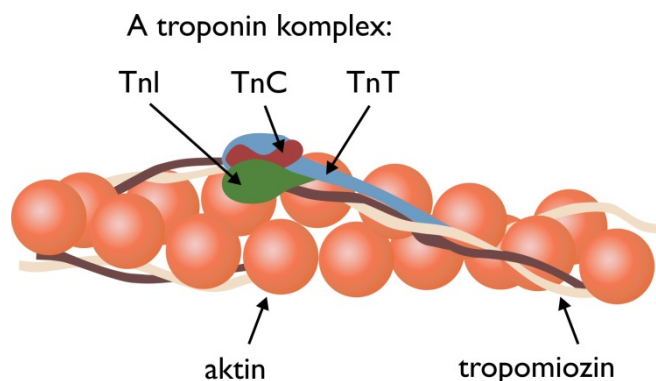
7.6.2. Miofibrilláris fehérjék molekulatömegének meghatározása SDS PAGE módszerrel

A miofibrillumok a harántcsíkolt izomszövet izomroston belüli összehúzódásra képes elemei. A miofibrillum nem sejtorganelum, hanem szupramolekuláris képződmény, mint pl. a riboszómák. A harántcsíkolt miofibrillumban, melynek alapegysége a szarkomer, kétféle - egy vastag és egy vékony - filamentumrendszer található. A vastag filamentum fő fehérjéje a miozin, ami hat alegységből, négy könnyűláncból és két egyforma nehézláncból áll, mint azt a 7.10. ábra mutatja. A miozin molekulák a szuperhelikális részükön keresztül összekapcsolódva hozzák létre a vastag-filamentumot.



7.10. ábra. A vázizom miozin és az abból létrejövő vastag filamentum sematikus szerkezete. A vázizom miozin háromféle polipeptid láncból, egyfajta nehézláncból, és kétfajta könnyűláncból áll. A nehézláncban fej, nyak és fark domének különíthetők el. Két nehézlánc kapcsolódik össze a fark doméneken keresztül egy szuperhelikális szerkezeti elemet, a miozin rudat képezve. Mindkét nehézlánc nyaki doménjéhez egy-egy esszenciális, és egy-egy regulációs könnyűlánc kapcsolódik. A globuláris fejek rendelkeznek az aktin-kötés és az ATP-bontás képességével. A miozin rudak egymáshoz kapcsolódásával jön létre a vastag filamentum.

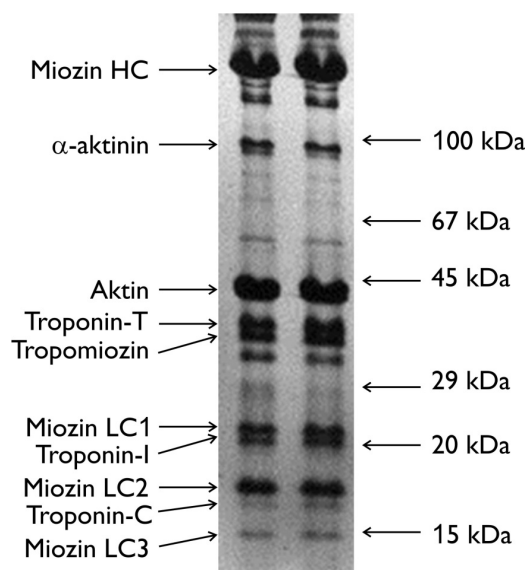
A vékony filamentum vázát a globuláris aktinból felépülő aktin filamentum adja, amihez gerincesek esetében reguláló fehérjék kapcsolódnak: a tropomiozin és a három alegységes troponin (7.11. ábra).



7.11. ábra. A vékony-filamentum sematikus képe. A vékony-filamentum a globuláris aktin monomerek irányított polimerizációjával jön létre. Ehhez az aktin filamentumhoz kötődik a tropomiozin, és a troponin komplex elemei (TnT; TnC; TnI).

Az SDS PAGE gyakorlatát preparált miofibrillum elektroforézisén keresztül demonstrálhatjuk (7.12. ábra). A nyúl fehér vázizmából preparált miofibrillum tartalmazza a már említett fehérje komponenseket, amelyek a komplex szerkezetű miofibrillumban egymáshoz másodlagos kölcsönhatásokkal kötődnek. Ezeket a kölcsönhatásokat az SDS-ben történő forralás megszünteti, és az egyes fehérjék, illetve a többalegységes fehérjék egyes alegységei külön-külön vándorolnak a gélben molekulaméretük (molekulatömegük) szerinti sebességgel.

Ugyanabban a gélben, amiben a miofibrillum minta is vándorol, de természetesen szomszédos mintahelyeken, ismert molekulatömegű egy-alegységes fehérjéket is futtatunk. Ezeknek a mozgékonyasága és a molekulatömegek tízes alapú logaritmus alapján létrehozunk egy tapasztalati grafikont (kalibráló egyenest), amely alapján becslést teszünk a miofibrillum mintában lévő egyes komponensek molekulatömegére. Az így kalkulált molekulatömegek alapján azonosítjuk be az egyes (ismert molekulatömegű) miofibrillum alkotó fehérjéket a gélben.



7.12. ábra. A miofibrillum komponenseinek SDS PAGE elválasztása. Az SDS kezelés hatására a miofibrillum egyes fehérje komponensei, illetve a több alegységes fehérjék egyes alegységei egymástól különválnak, és SDS poliakrilamid gélelektroforézissel méret szerint elválaszthatók. Az egyes fehérjék, illetve fehérje alegységek a gélben a molekulatömegük alapján könnyen beazonosíthatók. A molekulatömeg meghatározáshoz használt molekulatömeg marker (ismert tömegű kalibráló-fehérjék keveréke) az átláthatóság kedvéért nem került bemutatásra, a pozíciójuknak megfelelő tömegeket az ábra jobb oldalán szereplő nyilak jelzik. (Az ábra egy olyan gélképet mutat, amin ugyanaz a minta kétszer lett töltve és futtatva.)

8. fejezet - Fehérje-ligandum kölcsönhatások

szerző: Kardos József

8.1. Biomolekulák kölcsönhatásai

Az élő sejt működése, környezettel való kölcsönhatása a legrövidebb baktériumoktól a magasabb rendű élőlényekig mind makromolekulák kölcsönhatásain keresztül valósul meg. Ezek a kölcsönhatások, reakciók lehetnek egyszerűbbek vagy összetettebbek, melyekben legalább az egyik partner valamilyen biológiai makromolekula, rendszerint fehérje. Ebben a fejezetben ezen kölcsönhatások típusait, molekuláris hátterét, elméletét és a gyakorlati alkalmazásait fogjuk röviden áttekinteni. A fehérjemolekulák kölcsönhatásait a kölcsönható partnerek természetét illetve funkcióját tekintve többféle csoportba sorolhatjuk, melyek nem függetlenek egymástól. Ezekre példák:

- Fehérjék kölcsönhatásai fehérjékkel, kis molekulákkal, szénhidrátokkal, lipidekkel, nukleinsavakkal
- Receptor-ligandum kölcsönhatások
- Antigén-ellenanyag kölcsönhatások
- Enzimreakciók, inhibitorok enzimhez való kötődése

A továbbiakban az ilyen reakciókat fehérje-ligandum kölcsönhatásoknak fogjuk nevezni. Nagyon gyakran egy-egy ilyen kölcsönhatás kulcsszerepet játszik bonyolult többlépcsős reakciók elindításában. A ligandum kötődése például aktiválhat egy receptor molekulát, ami egy választóanyagot indukál a sejtben, pl. szteroid hormonok kötődése citoplazmatikus vagy nukleáris receptoraikhoz, szekretált peptid ligandumok kötődése transzmembrán receptorokhoz.

8.2. Reakciókinetika

Egy adott fehérje-ligandum kölcsönhatást meghatározó tényezők a partnerek aktuális koncentrációi, a kötődés erőssége, affinitása, továbbá az asszociáció és disszociáció sebessége. Az elméleti leíráshoz először tekintsük át röviden (és egyszerűsítve) a reakciókinetikai alapokat és alapfogalmakat.

Tekintsük a következő kémiai reakciót:



A reakciósebesség a termékek keletkezésének és visszaalakulásának eredőjeként alakul ki.

$$v = k_+ [\text{A}]^m [\text{B}]^n - k_- [\text{C}][\text{D}] \quad (8.2)$$

melyben a k_+ és k_- a sebességi állandók, m a reakció rendje A-ra vonatkozóan, n pedig B-re vonatkozóan, $m+n$ adja a reakció rendjét. A **8.1. táblázat** néhány egyszerűbb, gyakoribb reakciót szemléltet. Egyensúlyban a nettó reakciósebesség 0, vagyis a keletkezés és disszociáció sebessége megegyezik, a koncentrációk pedig állandó, egyensúlyi értéket vesznek fel:

$$k_+ [\text{A}]^m [\text{B}]^n = k_- [\text{C}][\text{D}] \quad (8.3)$$

Az egyensúlyra vonatkozóan felírhatjuk az egyensúlyi disszociációs (és asszociációs) állandót, amely a két sebességi állandó hányadosa, és kifejezhető a kiindulási anyagok és a termékek koncentrációi szorzatának hányadosával, ahol az egyes koncentrációk a sztöchiometriának megfelelő hatványon szerepelnek:

$$K_D = k_- / k_+ = ([A]^m[B]^n) / ([C][D]) \quad (8.4)$$

Az asszociációs állandó a disszociációs állandó reciproka:

$$K_A = 1 / K_D \quad (8.5)$$

Az egyensúlyi asszociációs illetve disszociációs állandó azt jellemzi, mennyire van eltolva az egyensúly a termékek keletkezése felé, ami a fehérje-ligandum kölcsönhatások esetében a kötés erősségét, az affinitást adja.

Az egyensúlyi állapottól távol az oda vagy vissz irányú reakció dominálhat, ilyen esetben például gyorskinetikai mérésekkel direkt módon meghatározhatók a sebességi állandók.

	reakció	reakciósebesség	rendűség
monomolekuláris	$A \leftrightarrow B$	$k^+ [A] - k^- [B]$	elsőrendű
bimolekuláris	$A + B \leftrightarrow C + D$	$k^+ [A] [B] - k^- [C] [D]$	másodrendű
trimolekuláris	$A + B + C \leftrightarrow D + E$	$k^+ [A] [B] [C] - k^- [D] [E]$	harmadrendű

8.1. táblázat. Néhány példa a reakciók sebességére és rendűségére.

8.3. A fehérje-ligandum kölcsönhatás

Az általános leírás után a továbbiakban a fehérje-ligandum kölcsönhatás egyszerű, másodrendű reakcióval jellemezhető modelljét és leírását fogjuk áttekinteni. A kölcsönható fehérjekomponenst P , a ligandumot L jelzi, PL pedig a kötődés során kialakuló fehérje ligandum komplex.



ahol k_{on} és k_{off} a kötődés (asszociáció) és a disszociáció sebességi állandója.

A kötődést jellemző egyensúlyi disszociációs és asszociációs állandók:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (8.7)$$

$$K_A = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_{on}}{k_{off}} \quad (8.8)$$

ahol $[P]$ a szabad fehérjemolekulák koncentrációja, $[L]$ a szabad ligandum koncentrációja, $[PL]$ pedig a fehérje-ligandum komplex koncentrációja. Ennél az egyszerű kötődési reakciónál a disszociációs állandó mértékegysége koncentráció (M, mol/liter), és minél kisebb az állandó annál erősebb a kölcsönhatás. A biológiai rendszerekben szoros kötődés esetén a disszociációs állandó 10^{-9} M (nM) nagyságrendű, vagy kisebb is lehet. Nagyon szoros enzim-inhibitor kölcsönhatások esetén, mint amilyen például a marha tripszin inhibitor (BPTI)-tripszin komplex, a K_D 10^{-13} M nagyságrendű, vagyis szub-pikomólos.

8.4. Összefüggés a szabadentalpia-változás és az egyensúlyi állandó között

A termodinamika második főtétele szerint állandó nyomáson és hőmérsékleten egy reakció akkor megy spontán módon végbe, ha a kiindulási és végállapotra vonatkozó Gibbs-féle szabadenergia (más néven szabadentalpia) változás negatív: $\Delta G < 0$. Egyensúlyban a szabadentalpia minimumot vesz fel, és $\Delta G = 0$. Emlékeztetőül a Gibbs-féle szabadenergia definíciója:

$$G = H - TS \quad (8.9)$$

ahol H az entalpia, T az abszolút hőmérséklet és S az entrópia. Oldatok esetén a rendszer standard állapothoz tartozó szabadentalpiája az a G^0 érték, amely ahhoz az esethez tartozik, amikor a komponensek moláris koncentrációja egységnyi (1 M). Ehhez a referenciaértékhez képest a rendszer szabadentalpiája egy A molekula egyszerű oldata esetében a következő formában fejezhető ki:

$$G = G^0 + RT \ln a \quad (8.10)$$

ahol a az aktivitás, másnéven effektív koncentráció, R az egyetemes gázállandó, melynek értéke $8.31447 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$. Híg oldat esetében a megközelítően egyenlő A moláris koncentrációjával ($[A]$), így:

$$G = G^0 + RT \ln [A] \quad (8.11)$$

Oldatfázisban, egy többkomponensű reakció esetében a reakcióhoz tartozó szabadentalpia-változás a következőképpen fejezhető ki:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{\prod[\text{termékek}]}{\prod[\text{reaktánsok}]} \quad (8.12)$$

Ahol a törtben a reaktánsok és termékek koncentrációinak szorzatait találjuk. Egyensúlyban $\Delta G = 0$, a törtben szereplő koncentrációk pedig az egyensúlyi koncentrációk, így a tört éppen az asszociációs egyensúlyi állandót adja. Ebből következik, hogy a standard szabadentalpia különbséget direkt módon meghatározhatjuk az egyensúlyi állandóból:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_A = RT \ln K_D \quad (8.13)$$

Meg kell jegyeznünk, hogy a biokémiai rendszerekben általában vizes oldatokat használunk, és itt a standard állapot alatt a semleges kémhatású (pH 7,0) állapotot értjük. Ekkor a protonok és hidroxid ionok koncentrációja 10^{-7} M , tehát nem minden komponens koncentrációja tekinthető egységnyinek. Viszont továbbra is érvényes a ΔG^0 egyensúlyi állandóval történő meghatározása.

ΔG^0 a reakciótermékek, illetve fehérje-ligandum kölcsönhatás esetén a komplex kiindulási anyagokhoz viszonyított stabilitását fejezi ki az egyensúlyi állapotban. A **8.II. táblázat** a disszociációs egyensúlyi állandó és a ΔG^0 kapcsolatát mutatja be különböző kötési erősségek esetén és a 100 nM-os értékhez viszonyítva.

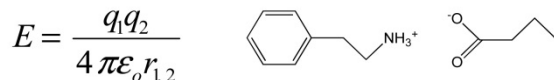
Ligandum	K_D (nM)	ΔG^0 (kJ/mol)	$\Delta\Delta G^0$ (kJ/mol)
X	100	-39,9	0
Y	1000	-34,2	5,7
Z	10	-45,6	-5,7
W	1	-51,3	-11,4

8.II. táblázat. ΔG^0 összehasonlító táblázat 25 °C hőmérsékleten. ($\Delta\Delta G^0$ értékek a 100 nM-os interakcióhoz vannak viszonyítva.)

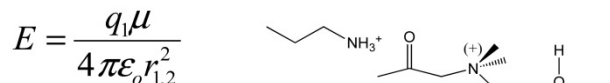
8.5. A ligandumkötést stabilizáló erők

A fehérje-ligandum kötés erősségét a molekulák között fellépő különböző, általában másodlagos kölcsönhatások határozzák meg (8.1. és 8.2. ábra). Ezen kölcsönhatások a kötések erősségében (energiájában) és hatótávolságukban térnek el egymástól. Tekintsük át röviden őket.

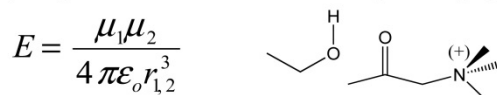
- Kovalens kötés. A legerősebb kölcsönhatás a kovalens kötés, amely irreverzibilis kötődést eredményez. Energiája ~ -500 kJ/mol.
- Ionos kölcsönhatás. Energiája -20 - -40 kJ/mol, távolságfüggése $1/r$.



- Töltés-dipól kölcsönhatás: -10 - -30 kJ/mol, távolságfüggés $1/r^2$



- Dipól-dipól kölcsönhatás: -5 - -20 kJ/mol, távolságfüggés $1/r^3$

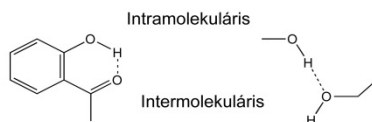


q a töltés, μ a dipólmomentum; r a távolság, ϵ_0 pedig a dielektromos állandó

- Hidrogén-híd: -4 - -30 kJ/mol

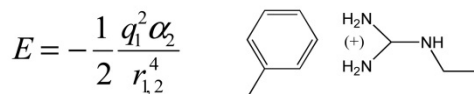
H-kötés donor ... akceptor

N-H ... O
N-H ... N
O-H ... N
O-H ... O



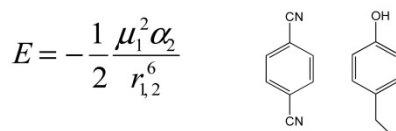
A hidrogén-hidak esetében a kölcsönhatási energiát nagymértékben meghatározza a donor-akceptor távolság, ami kisebb, mint 3,5 Å, és az orientáció.

- Töltés – indukált dipól kölcsönhatás: -20 - -40 kJ/mol, $1/r^4$

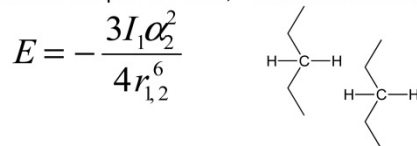


Ahol q_1 a töltés, α_2 a polarizálhatóság és $r_{1,2}$ a távolság.

- Dipól-indukált dipól kölcsönhatás, -5 - -30 kJ/mol, $1/r^6$



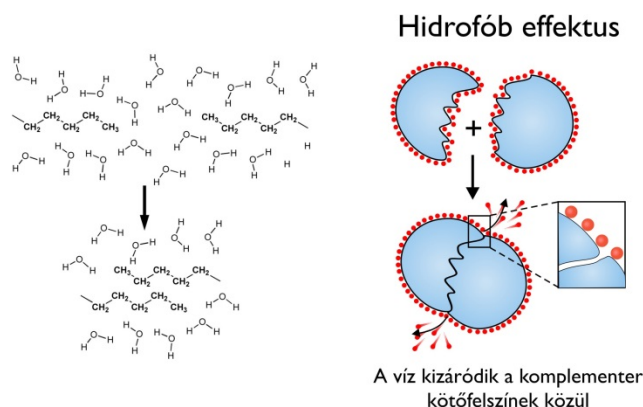
- London-diszperziós erők, -2 kJ/mol metilén csoportonként



μ : dipólmomentum; α : polarizálhatóság, I : ionizálhatóság r : távolság

Az atomok közötti ütközés esetén a Pauli-féle kizárási elv alapján erős taszító kölcsönhatás lép fel, amit $1/r^{12}$ távolságfüggéssel szoktak figyelembe venni.

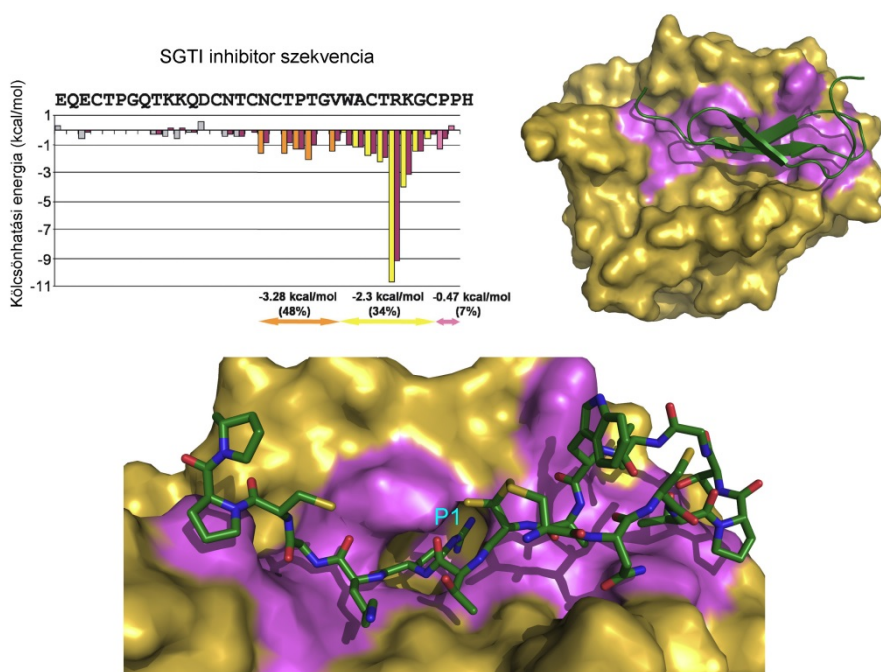
8.1. ábra. A másodlagos kölcsönhatások típusai.



8.2. ábra. A hidrofób kölcsönhatás.

A hidrofób effektus egy összetett másodlagos kölcsönhatás, melynek során vizes oldatban a molekula hidrofób részei eltemetődnek és csökken az apoláros felszín mérete. A kölcsönhatás additív, arányos az eltemetett felszínnel, energiája: $\sim -80-100 \text{ J/mol/Å}^2$. Ez eltemetett metilén csoportonként megfelel körülbelül -3 kJ/mol energiának.

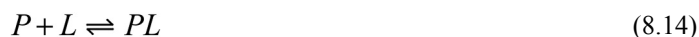
A fehérje-ligandum kölcsönhatások esetén egyedi, gyenge kölcsönhatások eredőjeként alakul ki az erős kötési állandó és specificitás. A **8.3. ábra** egy ilyen kölcsönhatást mutat be, melynek disszociációs állandója 10^{-13} M .



8.3. ábra. Egy tripszin inhibitor kölcsönhatása a folyami rákból származó tripszin proteázzal. A fenti tripszin inhibitor a rák tripszinnel erősebb kölcsönhatást alakít ki, mint a marhából származó tripszinnel. Balra fenn: az inhibitor oldallancaira eső kölcsönhatási energiák megoszlása, összehasonlítva a marha tripszinnel való komplexével. (A marha tripszinnel alkotott komplexből adott aminosav pozícióra számított kölcsönhatási energia hozzájárulás bordó színnel, míg ugyanez a rák tripszin-inhibitor komplexre régióként színezve van feltüntetve a diagramon.) Jobbra: a komplex térszerkezete. Lent: A kölcsönható régiót bemutató ábra. Érdekes megfigyelni a P1 pozícióban lévő arginin oldalláncot, amint benyúlik a proteáz szubsztrátkötő zsebébe.

8.6. A kötési állandó meghatározása

Tekintsük a 8.3. pontban leírt ligandumkötési reakciót és írjuk fel a disszociációs egyensúlyi állandót úgy, hogy behelyettesítünk a teljes fehérjekoncentrációval ($[P]_T$).



$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{([P]_T - [PL])[L]}{[PL]} \quad (8.15)$$

$[P]$ a szabad fehérje koncentrációja, $[L]$ a szabad ligandum koncentráció, $[PL]$ a fehérje-ligandum komplex koncentrációja, $[P]_T$ a teljes fehérjekoncentráció.

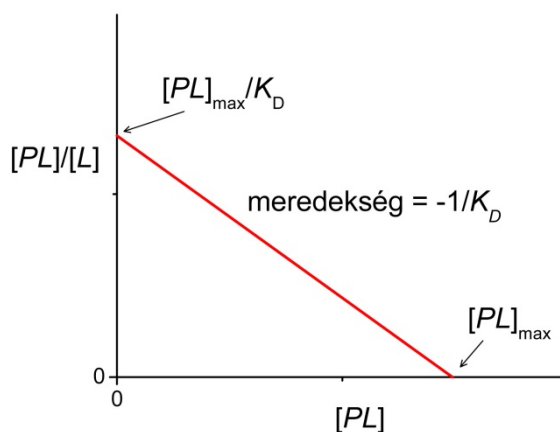
$[PL]$ -val beszorozva és $[L]$ -val és a K_D -val leosztva a következő kifejezéshez juthatunk:

$$\frac{[PL]}{[L]} = \frac{[P]_T - [PL]}{K_D} \quad (8.16)$$

Vegyük észre, hogy ez egy egyenes, vagyis az $y = [PL] / [L]$ értékek (kötött/szabad ligandum koncentráció) egy egyenesen helyezkednek el $x = [PL]$ függvényében. Ezt nevezzük Scatchard-plotnak (8.4. ábra).

$$y = -\frac{1}{K_D} x + \frac{[P]_T}{K_D} \quad (8.17)$$

A Scatchard-ábrázolásból grafikusán egyszerűen meghatározható a kötési állandó, mert az egyenes meredeksége $-1/K_D$. A Scatchard-plot problémája, hogy eltorzítja a mérési hibákat. Ma már ritkán van szükségünk a kötődési egyenlet linearizálására, mert számítógép segítségével szinte tetszőleges függvényre tudunk illesztést végrehajtani.



8.4. ábra. A Scatchard plot egy egyszerű kötési reakció esetén.

Általánosabb esetben, ha a kötőhelyek száma nem egy, $[PL]$ helyett a kötött ligandum és a komplexben lévő fehérje koncentrációjának hányadosát ábrázoljuk. Ekkor az egyenes n értéknél metszi az x tengelyt, ami a fehérjén (receptoron) található kötőhelyek száma. Ilyen módon a Scatchard-ábrázolás alkalmas a kötőhelyek számának meghatározására is.

Most alakítsuk tovább a 8.16. egyenletet, keresztbe szorozva:

$$[PL] K_D = ([P]_T - [PL]) [L] \quad (8.18)$$

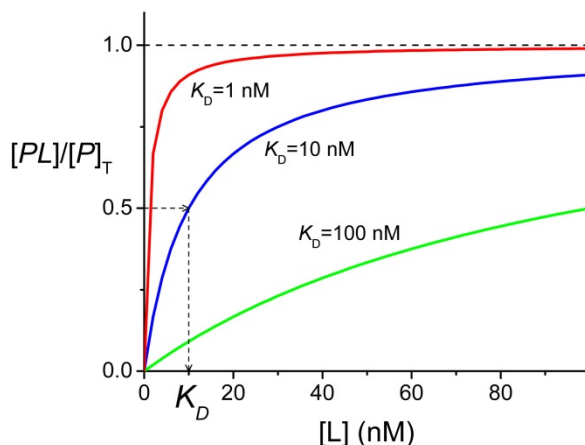
Átrendezve:

$$[PL] (K_D + [L]) = [P]_T [L] \quad (8.19)$$

Ebből egyszerűen megkapjuk a fehérje $[PL] / [P]_T$ telítettségét, más néven szaturációját, ami azt mondja meg, hogy a fehérjemolekulák hányad része van komplexben:

$$\frac{[PL]}{[P]_T} = \frac{[L]}{K_D + [L]} \quad (8.20)$$

Az összefüggés egy hiperbola, azaz a telítési görbe a szabad ligandum koncentráció függvényében egységnyi maximális értékhez tart hiperbolikusan. A **8.5. ábra** ilyen telítési görbéket ábrázol, melyekhez különböző K_D értékek tartoznak. A fenti egyenletbe behelyettesítve azt is észrevehetjük, hogy a K_D értéke megegyezik az 50%-os telítéshez tartozó szabad ligandum koncentrációjával.



8.5. ábra. Hiperbolikus telítési görbék különböző kötési állandókkal.

A telítési görbére való hiperbola illesztéséből pontosan meghatározható a kötési állandó értéke. A telítési görbe felvételéhez ismernünk kell a szabad (nem kötött) ligandum koncentrációját. A konkrét mérések során általában a kötött ligandum koncentrációját tudjuk mérni ($[PL]$), így a szabad ligandum koncentrációja a teljes ligandumkoncentrációból ($[L]_T$) állítható elő kivonással:

$$[L] = [L]_T - [PL] \quad (8.21)$$

Ekkor $[L]$ értéke is tartalmazza $[PL]$ mérésének hibáját. Ehelyett gyakran a teljes ligandumkoncentráció segítségével szokták a K_D értékét kifejezni, ami hiperbola helyett egy másodfokú egyenletre vezet. A szabad ligandumkoncentráció meghatározásának problémája kiküszöbölhető, ha a fehérjekoncentráció sokkal kisebb, mint a K_D , illetve $[L]_T$ értéke:

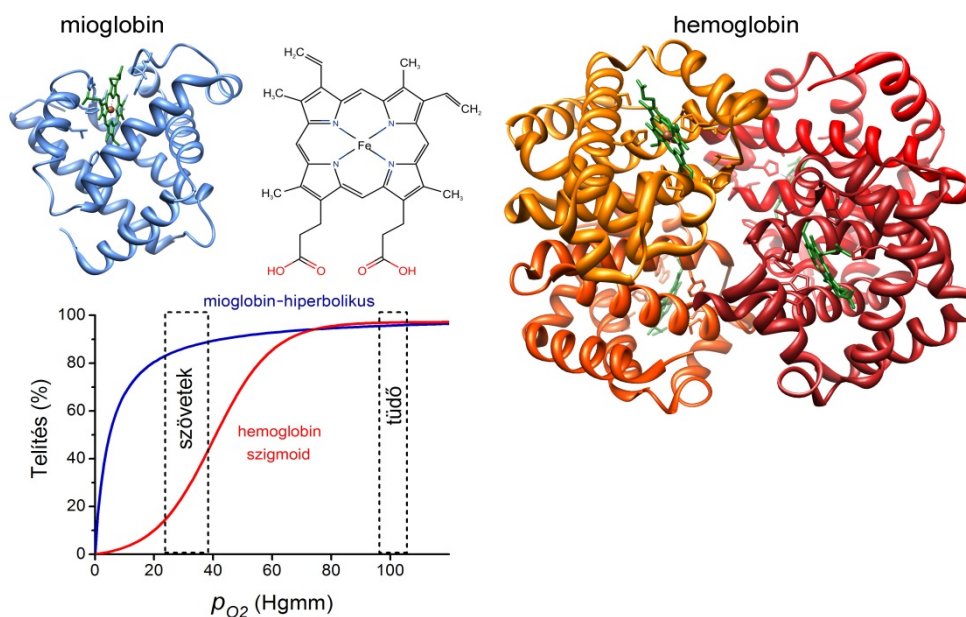
$$[P]_T \ll K_D, [L]_T \quad (8.22)$$

Ekkor a komplexben lévő molekulák száma elhanyagolható részét teszi ki a ligandummolekuláknak, így a szabad ligandum koncentrációja egyenlőnek tekinthető a teljes ligandumkoncentrációval.

$$[L] \cong [L]_T \quad (8.23)$$

Klasszikus biokémiai példa a hiperbolikus telítési görbére a mioglobin reverzibilis oxigénkötése. A mioglobinnal nagyfokú hasonlóságot mutató, de tetramer szerkezetű hemoglobin molekula négy oxigénmolekula megkötésére képes, azonban az oxigén megkötése ebben az esetben kooperatív folyamatként valósul meg. Az első oxigénmolekula még kisebb affinitással köt, de kötődése egy allostérikus konformációváltozás során elősegíti a további molekulák kötődését. Ebben az esetben a telítési görbe egy szigmoid görbéhez lesz hasonlatos. A **8.6. ábra** a mioglobin és hemoglobin szerkezetét illetve oxigénnel való telítési görbéjüket mutatja be az oxigén parciális nyomása függvényében. A hemoglobin elsődleges funkciója az oxigén szállítása a gerincesek vérében. A telítési görbéket

elemezve megérthetjük az oxigén szállításának molekuláris mechanizmusát. A tüdő kapillárisaiban az oxigén parciális nyomása kb. 100 Hgmm. Ezen a nyomáson a hemoglobin molekulák majdnem teljesen, mintegy 97%-ban telítődnek oxigénnel. A vörösvértestek a vérárammal eljutnak a különböző szövetekbe, ahol az oxigénfelhasználás történik. Ezekben a szövetekben az oxigén parciális nyomása alacsonyabb, általában nem több, mint 40 Hgmm. A telítési görbét elemezve megállapíthatjuk, hogy ilyen nyomás mellett egyensúlyi állapotban csak mintegy a kötőhelyek fele köt oxigén molekulát. Ennek következményeként a tüdőből érkező telített hemoglobin oxigént fog leadni. Az így szabályozott oxigén transzfer érdekessége az is, hogy a több oxigént felhasználó szövetekben, ahol a parciális nyomás alacsonyabb, a hemoglobin több oxigént ad le, tehát a leadás ott történik, és olyan mértékben, ahol és ahogyan szükség van rá. Ezzel szemben a mioglobin az oxigén szöveti parciális nyomása mellett is nagymértékben köti az oxigént. Valószínű funkciója az oxigén tárolása, amire az is utal, hogy nagy koncentrációban található meg a nagy oxigénfelhasználó harántcsíktal izomszövetben, különösen azon tengeri emlősök izmaiban, amelyek hosszú időt töltenek a víz alatt.



8.6. ábra. A mioglobin és hemoglobin szerkezete és reverzibilis oxigénkötésük az oxigén parciális nyomásának függvényében.

8.7. Módszerek a kötési állandó kísérleti meghatározására

A molekuláris biológia és biokémia, de a legújabb tudományágak, mint például a proteomika esetében is központi kérdés a sejtek különböző életfolyamataihoz tartozó molekuláris szintű mechanizmusok leírása, és ennek során a kölcsönható molekulák kilétének és a kölcsönhatások erősségének meghatározása. Számos módszer használható a kölcsönható partnerek keresésére, az interakciók kimutatására. A specifikus ligandumkötés, mint amilyen az antigén-ellenanyag kölcsönhatás, felhasználható különböző antigének, anyagok kimutatására, mennyiségi meghatározására is. Fehérje- ligandum kölcsönhatást vizsgáló módszerek többek között az alábbiak:

- Affinitáskromatográfia
- Keresztkötés
- Gélszűrés
- Ko-lokalizáció
- Két-hibrid módszer
- Spektroszkópiai módszerek
- 3D szerkezet meghatározása
- Egyensúlyi dialízis
- Radioaktív jelölés

- Szedimentációs mérés
- Titrációs kalorimetria
- Felszíni plazmon rezonancia
- Microarray
- Immunfestés
- ELISA

Tekintsünk át néhány gyakran használt módszert. A **radioimmunoassay** (RIA) különböző antigének, hormonok, drogok koncentrációjának meghatározására alkalmas pl. az emberi testfolyadékokban. A mérés során ismert mennyiségű radioaktívan jelölt antigént kevernek a hozzá tartozó antitesthez. Általában gamma-sugárzó izotópot használnak (ilyen például a tirozinhoz kötött jódtartó izotóp), majd a jelöletlen (hideg) antigén mintát adagolják hozzá, és mérik a jelölt antigén felszabadulását. A jelöletlen anyag versenyez a radioaktívval, és ha koncentrációja magasabb, akkor leszorítja azt az antitestről. A komplexben lévő anyagot elválasztjuk a szabad antigéntől. A technika nagyon érzékeny és specifikus, de különleges elővigyázatosságra van szükség a radioaktív izotóp felhasználása miatt, illetve bonyolult műszereket és drága anyagokat igényel. Ma inkább az ELISA módszert használják, ahol a radioaktív jel helyett az antigén-antitest kölcsönhatást színreakcióval mérik.

Az **ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay) során egyszerű esetben az antigént egy felszínhez kötjük, majd egy specifikus antitest segítségével felismertetjük azt. Ezután egy második antitestet kötünk fel, amely az első ismeri fel, és rendszerint egy kovalensen kötött enzim molekulát is hordoz. Az enzim szubsztrátjának hozzáadásával színes vagy fluoreszcens termék keletkezik, és ilyen módon az antigén jelenléte vagy akár koncentrációja is meghatározható. Bonyolultabb változat az ún. szendvics ELISA. Ekkor a lemez felszínére egy „elfogó” antitestet immobilizálunk, amelyhez második lépésként az antigén kötődik. Ezután az antigén jelenlétét detektáló második antitestet alkalmazunk, így alakul ki a szendvics. Majd rendszerint egy harmadik antitest segítségével, amelyik hordozza a kimutatásra alkalmas enzimet vagy jelölést, válik lehetővé a kvantitatív meghatározás. A szendvics ELISA jóval érzékenyebb a közönséges ELISA módszernél. Többek között a terhességi tesztek is így működnek.

A fehérje-ligandum kölcsönhatások kvantitatív meghatározására rendelkezésre álló legmodernebb módszerek közül a felszíni plazmon rezonancia (SPR), izotermális titráló kalorimetria (ITC) és fluoreszcencia depolarizáció módszereit ismertetjük.

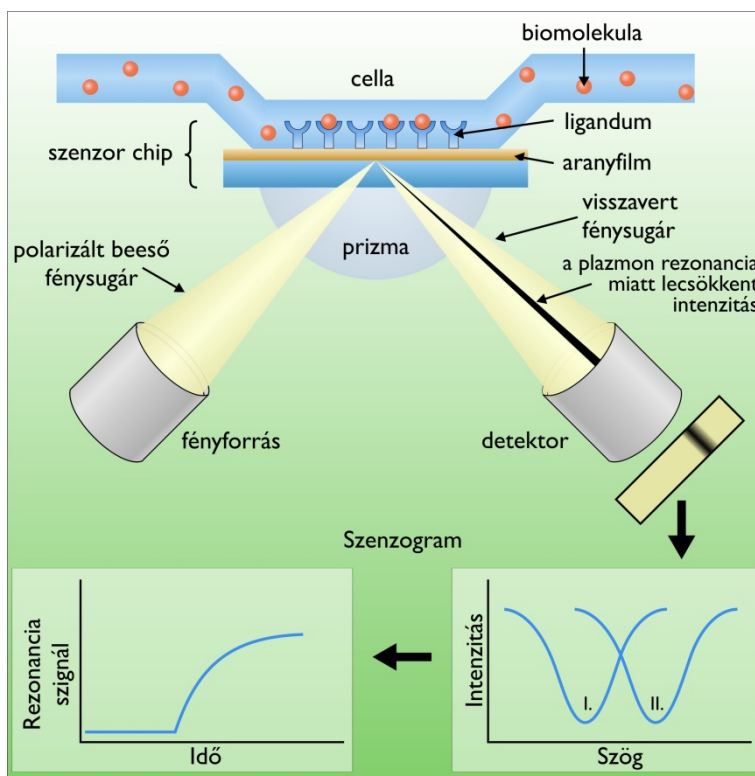
8.7.1. A felszíni plazmon rezonancia

Az SPR mérés során a kölcsönható partnerek egyikét egy chip felszínén immobilizáljuk, majd fölötte áramoltatva a másik partnert (analit) vagy puffert, a kötődés illetve disszociáció sebességi állandója (k_{on} és k_{off}) meghatározható. A felszínhez kötődő anyagot (tömeget) spektroszkópiai úton, az úgynevezett felszíni plazmon rezonancia jelenségén keresztül méri a készülék. A chip tulajdonképpen egy üveglemez, amelynek felszínét vékony fémréteggel, általában arannyal vonják be. Ezt egy olyan „fedőlemez” borítja, amiben csatornák vannak kialakítva, lehetővé téve, hogy a felszín fölött folyadékot áramoltassunk, így hozva létre egy vagy több, átfolyós rendszerű mikrocellát. Az aranyfelszín még általában egy vagy több molekularéteg boríthatja, például dextrans, ami lehetővé teszi az egyik kötőpartner felszínhez történő immobilizálását. Ez leggyakrabban kovalens módon történik. Ha sikerült az immobilizálás, akkor kezdetét veheti a mérés, melynek során a kölcsönható partnert a felszín felett áramoltatva, az kötődik. A **8.7. ábra** mutatja be az SPR készülék működését. A chip a készülékben egy prizmán helyezkedik el. A mérés során a chipet a túoldalról a teljes visszaverődés szögén belül, de széles beeső szög tartományban lézertfényvel világítjuk meg, amely az üveg felső határán teljes visszaverődést szenved, majd a visszavert sugár egy detektorra vetődik. Ismert fizikai jelenség, hogy a teljes visszaverődés során az elektromágneses hullám kismértékben, exponenciálisan csökkenő intenzitással behatol a túoldalra lévő közegbe. Ezt hívjuk evaneszcens mezőnek, amely jelen esetben a fémrétegre és fölötte egy keskeny tartományra korlátozódik, és ilyenformán érzékeny a felszínhez kötődő anyagra. A beeső fény egy bizonyos szög mellett kölcsönhatásba lép a fémrétegben lévő szabad elektronokkal és az általuk létrehozott elektromágneses térrel, és rezgésbe hozza, gerjeszti azokat, vagyis kialakul a felszíni plazmon rezonancia. Ekkor az adott beesési szöghöz tartozó fény elnyelődik, intenzitása csökken. A detektor segítségével meghatározhatjuk az intenzitáscsökkenéshez illetve kioltáshoz tartozó szöveget. A felszínhez kötődő molekulák megváltoztatják a lokális törésmutatót, amely hatással van a plazmon hullámok rezonanciafeltételeire, így a kötődés során a rezonanciához tartozó szög eltolódik. Ez az eltolódás fehérjék esetében jó közelítéssel egyenesen arányos a felszínen megkötődő anyagmennyiséggel. Értékét vagy szögeltolódásban, vagy bizonyos készülékek (pl. Biacore) esetében egy származtatott mennyiségben, a rezonancia egységben (resonance unit – RU) adják meg. $1 \text{ RU} = 1 \text{ pg/mm}^2$, vagyis 1 RU megfelel 1 pg lerakódó anyagmennyiségnek 1 mm^2 felületen. 1 ezredfok szögeltolódás megfelel kb. 6 RU -nak.

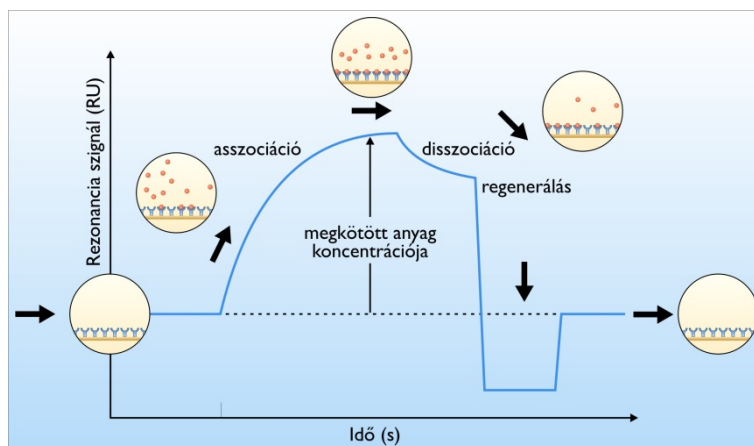
Az SPR jel időbeni változását követve meghatározható a kötődéshez tartozó asszociációs sebességi állandó, k_{on} , majd a felszín fölött ligandummentes puffér áramoltatásával a disszociációt, azaz a k_{off} állandót is mérhetjük. A kettő hányadosa a K_A asszociációs állandót, vagyis a kötés erősségét és ezen keresztül a ΔG° értékét is megadja. A mérés vázlatos menetét a **8.8. ábra** mutatja be.

Az immobilizálásnál általában a ligandumot igyekszünk valamilyen módszerrel felkötni a szenzor felszínre (chipre). A kovalens immobilizálás nagyon stabilis és általában nem igényli a ligandum előzetes módosítását, azonban annak tartalmaznia kell valamilyen reaktív csoportot, például $-NH_2$, $-SH$, $-COOH$, és a ligandum gyakran véletlenszerű orientációban fog felkötődni. Leggyakrabban az amin vagy tiol csoporton keresztül immobilizálunk, de a sztreptavidin-biotin felkötés is nagyon hatékony módszer. Általában első lépésként a dextrán felszínre „aktiváljuk” a karboxil csoportok módosításával, amihez N-hidroxiszukcinimidet (NHS) és 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid hidrokloridot (EDC) használunk. Ezután felköthető a ligandum az aktivált felszínre a szükséges koncentrációban, majd a fennmaradó reaktív helyeket etanolamin beinjektálásával blokkolhatjuk.

Az SPR módszer előnye, hogy méréshez nem szükséges a kölcsönható partnerek módosítása vagy jelölése, ezáltal a molekulák tulajdonságai nem változnak meg. A mérés során valós időben követhetjük a kötődés kinetikáját, és kiszámíthatjuk az interakció termodinamikai paramétereit is. További előny, hogy csak kis anyagmennyiség szükséges a méréshez, ráadásul a szenzorfelszín a rákötött ligandum oldatával általában többször is regenerálható, így több mérést is végrehajthatunk, különböző kötőpartnereket tesztelhetünk. Az oldat turbiditása sem okoz problémát. Az SPR módszer hátránya, hogy bár valóban nem kell jelöléssel ellátnunk a kötő partnereket, de szükség van egyikük felszínhez történő immobilizálására. Ez jelentős hatással lehet a kötődésre, akár lehetetlenné is téve azt, ha például a fehérje-ligandum kötésben résztvevő felszín egybeesik az immobilizálásban részt vevő régióval, de az is elég, ha az egyszerűen csak a chip felé eső oldalon helyezkedik el. Az ilyen problémák kiküszöbölésére szokták az immobilizálást hosszabb linker molekulák közbeiktatásával végezni. Másik probléma lehet, hogy a kötődés nem szabad oldatfázisban, hanem egy felszínen történik, amely különböző áramlási effektusokat okozhat. Erős kötődés, illetve az immobilizált molekulák nagy felszíni sűrűsége esetén a disszociálódó molekulák azonnal újra be tudnak kötni. Ez a lokális ligandumkoncentrációt növeli, amit erősebb kötésként észlelhetünk. Az eredmények értelmezése akkor is bonyolulttá válhat, ha több kötőhely található a fehérjén. Kisméretű molekulák ($M_w < 300-500$) esetén a felszínre kötődő anyagmennyiség túl kevés a pontos méréshez.



8.7. ábra. A felszíni plazmon rezonancia módszere.



8.8. ábra. Az SPR mérés vázlatos bemutatása.

8.7.2. Az izotermális titráló kalorimetria (ITC)

Az ITC technika esetében ténylegesen módosítás, jelölés és immobilizálás nélkül, oldatfázisban tudjuk a fehérje-ligandum kölcsönhatásokat vizsgálni. A mérés során ráadásul direkt módon, a reakcióhő mérésén keresztül határozható meg a kötőhelyek száma, az egyensúlyi állandó (K_a) és a kölcsönhatás termodinamikai paraméterei, vagyis az entalpia, szabadentalpia, entrópia és az állandó nyomáson mért fajlagos hőkapacitáskülönbség (ΔH , ΔG^0 , ΔS^0 , ΔC_p). Minden más módszer, mint például a spektroszkópiai módszerek, indirekt mérésen alapul, kihasználva azt, hogy a komplex valamilyen (spektrális) tulajdonsága más, mint a szabad partnereké. Az ITC esetén nem jelent problémát sem a turbiditás, sem az oldat elnyelése. Nagy előnye az is, hogy gyakorlatilag alig van fenntartási költsége a rendszernek. A mérés és a kiértékelés is egyszerű, komputervezérelt. Hátránya, hogy viszonylag sok anyagot igényel az SPR technikához képest, és oldhatósági problémák is jelentkezhetnek a szükséges koncentrációk mellett.

A kaloriméternek két cellája van, egy referencia és egy mintacella. A referenciacellába vizet töltünk, a mintacellába pedig a fehérjét vagy ligandumot tartalmazó oldatot, melyet egy komputervezérelt injektor segítségével titrálunk meg a kölcsönható partnerrel. A mérés során a referenciacellát konstans, de nagyon kis teljesítménnyel fűtjük, amely nem eredményez számottevő hőmérséklet növekedést a mérés ideje alatt. A mérés lényege az, hogy a mintacellát pontosan (ezredfok pontossággal) azonos hőmérsékleten tartjuk, mint a referenciát, és az ehhez szükséges fűtőteljesítményt mérjük. Ha nem történik reakció, a mintacellát a referencia fűtőteljesítményhez közeli értékkel kell fűtenünk. Ha endoterm reakció játszódik le a cellában, akkor az hőt von el, így a cellát jobban kell fűtenünk, mint a referenciát. Ha exoterm reakció történik, akkor a hőfejlődés miatt a mintacellát kevésbé kell fűteni az azonos hőmérséklet tartásához. Az automatizált injektorral előre meghatározott időközönként kevertetés közben a cellában lévő fehérjéhez injektáljuk a titrálás egy kis mennyiségét, és mérjük az ekkor létrejövő reakció hőjét. A titrálás során mért hőváltozás egyenesen arányos azzal, hogy az injektált ligandum hányad része kötődik. Eleinte a ligandum nagyobb része kötődik, majd a telítést elérve már nem történik további kötődés.

A mért hő:

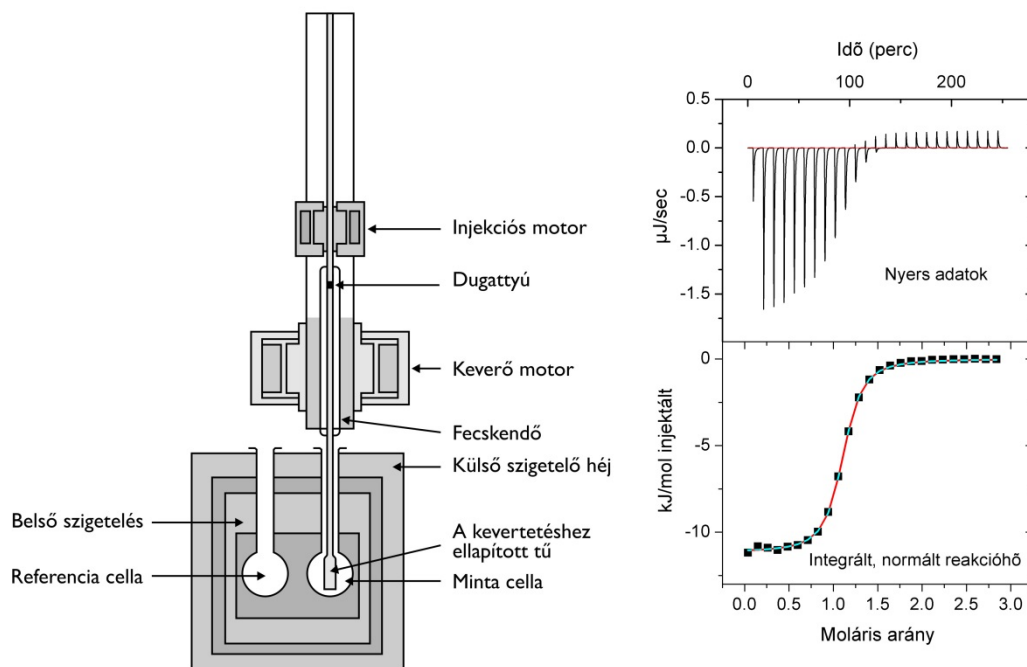
$$Q = V_0 \Delta H_b [M]_t K_a [L] / (1 + K_a [L]) \quad (8.24)$$

ahol V_0 a cella térfogata, ΔH_b 1 mól ligandum kötődéséhez tartozó entalpiaváltozás, $[M]_t$ a teljes makromolekula koncentráció a cellában, K_a a kötődési állandó, $[L]$ a szabad ligandum koncentrációja. Általános esetben, több kötőhely esetén a fenti egyenlet felösszegeződik az összes kötőhelyre.

Rendkívül fontos a koncentrációk pontos ismerete. Az alapvonalat (amely a reakciómentes állapothoz tartozó fűtőteljesítményt jelenti) levonva, a csúcsok alatti terület adja az injektálásokhoz tartozó reakcióhőt. A **8.9. ábra** a kaloriméter vázlatos felépítését ábrázolja és bemutat egy jellemző titrálási profilt annak kiértékelésével. A mérés során nagyon fontos, hogy a fehérje és a ligandum ugyanabban a pufferben, pontosan ugyanazon pH-n legyenek, máskülönben a fehérje-ligandum kötésén kívül még hígítási és ionizációs entalpiaváltozást is mérhetünk, amely igen nagy lehet. Az ilyen effektusok kimérésére és figyelembe vételére kontrollméréseket végzünk, amelyek során

puffert injektálunk pufferbe, titránst pufferbe, illetve puffert a cellában lévő fehérjeoldathoz. Az így mért hőváltozások korrekcióba vehetők.

A műszer érzékenységét jelzi, hogy 10^{-8} W hőváltozást képes kimutatni. Az aszociációs állandót a $K_a = 10^2 - 10^9$ M^{-1} tartományban tudjuk pontosan mérni.



8.9. ábra. A kaloriméter vázlatos felépítése és egy jellemző titrálási kísérlet nyers görbéje és kiértékelése. (A „Moláris arány” az x tengelyen a ligandum / fehérje koncentráció hányadost jelöli.)

8.7.3. Fehérje-ligandum kötés mérése fluoreszcencia depolarizáció módszerével

A fluoreszcencia depolarizáció (FD) jelenségének mérése során a mintát síkban polarizált fényel világítjuk meg, és mérjük az emittált fény polarizáltságát, mégpedig úgy, hogy megmérjük az eredeti polarizációs síkhoz tartozó és arra merőlegesen jelentkező fényintenzitást. A polarizációt a következőképpen definiálhatjuk a párhuzamos és a merőleges síkban előálló fényintenzitásokkal:

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}) \quad (8.25)$$

A fény polarizáltságát gyakran egy másik mennyiséggel, az anizotrópiával is ki szokták fejezni:

$$A = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}) \quad (8.26)$$

Ha egy fluoreszcens csoport orientált és rigid, azaz nem mozdul el, akkor az általa emittált fény polarizált lesz. Ha a csoport mozgékony és el tud fordulni, akkor az emittált fény kevésbé lesz polarizált.

A fény kromofórok általi abszorpciója rendkívül gyors folyamat, a 10^{-15} mp, azaz a femtoszekundum nagyságrendjébe esik. Ezzel szemben, a fluoreszcencia esetében a emissziós folyamat lényegesen lassabb körülbelül 10^{-8} mp, vagyis a nanoszekundum időrendjébe esik. Ha a mintát síkban polarizált fényel világítjuk meg, a rendkívül gyors abszorpció során a molekulák elfordulása elhanyagolható. Az emisszió létrejöttéhez szükséges időtartam alatt viszont, ami a gerjesztéshez képest lassú, a molekulák elmozdulhatnak, elfordulhatnak, így az emittált fény depolarizáltabbá válik. A nagyméretű makromolekulák lassan mozognak, diffundálnak az oldatban, így az emittált

fény kevésbé lesz depolarizált, szemben a kisméretű, mozgékony, gyorsan forgó csoportokéval, amelyek nagyfokú depolarizációt mutatnak.

A fehérje-ligandum kölcsönhatás során létrejövő molekulakomplex mérete, alakja eltérő a kiindulási molekulákhoz képest, így mozgása, diffúziója is más az oldatban. A kölcsönható molekulákban található fluorofórok lokális mozgékonyasága is megváltozhat a komplex képződés során, ha környezetük zsúfoltsága változik, vagy kölcsönhatásokat alakítanak ki. Mindezek hatással vannak a fluoreszcencia depolarizáció mértékére, így annak mérésével a fehérje-ligandum kölcsönhatás jellemezhető.

A méréshez szükséges fluoreszcens csoportok, próbák lehetnek a folyamat során természetesen jelen lévő „belső” kromofórok, mint például az aromás triptofán és tirozin oldalláncok, de ilyenek például a NADH és FAD molekulák is. Használhatunk olyan fluoreszcens jelölő szintetikus molekulákat is, amelyekkel aminosavakat helyettesítünk vagy módosítunk. Lehetséges „külső” fluoreszcens próba alkalmazása is, amely a célmolekulához kötődve fluoreszkálni fog (lásd 4. fejezet).

A fluoreszcencia depolarizációt mérhetjük „steady-state” és időfelbontásos módon is. Az előbbinél egyszerűen csak meghatározzuk a párhuzamos és merőleges polarizációhoz tartozó fényintenzitásokat állandó gerjesztőfény alkalmazásával. Utóbbi esetben egy nagyon rövid gerjesztő fényimpulzus után mérhetjük a fluoreszcencia élettídet, vagy az anizotrópia időbeni lecsengését is, amelyből a fluorofórok translációs és rotációs mozgására nagyon pontosan következtethetünk.

A fluoreszcencia depolarizáció módszere egyszerű, gyors mérés a fehérje interakciók oldatfázisban történő jellemzésére. Belső fluorofórok használata esetén módosítás nélkül mérhetünk, azonban gyakran kénytelenek vagyunk fluoreszcens jelölést alkalmazni, ami különös körülményt igényel, mert megváltoztathatja molekulánk tulajdonságait, interferálhat a ligandummal való kölcsönhatással. Egyben előnyös is lehet, ha a fluoreszcens próbát alkalmas molekularészlethez tudjuk kapcsolni, mert ilyenkor helyspecifikus információkat is nyerhetünk.

8.8. Ellenőrző kérdések, feladatok

- Mi a K_D és mi a mértékegysége egy egyszerű kötődési reakcióban?
- Írd fel egy másodrendű reakció egyenletét!
- Mi határozza meg a reakció irányát?
- Milyen összefüggés áll fenn a standard szabadentalpia és a kötési állandó között?
- Milyen nemkovalens kölcsönhatások határozzák meg a kötés erősségét?
- Milyen módszerekkel lehet a fehérje-ligandum kölcsönhatást mérni?
- Rajzold fel a receptor-ligandum telítési görbét!
- Hogyan lehet grafikusán meghatározni a K_D -t?
- Hogyan módosul a telítési görbe, ha kooperativitás áll fenn a kötőhelyek között?
- A receptormolekulák hány százaléka van komplexben, ha a szabad ligandum koncentrációja $3K_D$?
- Mennyivel stabilizálódik a kötődés (ΔG), ha a K_D 3 nagyságrenddel csökken?
- Kis ligandumok esetén a kötődést illetve disszociációt jellemző sebességi állandók közül (k_{on} és k_{off}) melyik könnyebb javítani az erősebb kölcsönhatás érdekében? Milyen irányban kell megváltozzon?
- Mi a különbség a mioglobinn és a hemoglobinn oxigénkötésében?
- Hasonlítsa össze az SPR, ITC és FD módszerek előnyeit és hátrányait!

9. fejezet - Enzimkinetika

szerző: Pál Gábor

Az élő szervezetek egyik közös jellemzője, hogy bennük viszonylag alacsony hőmérsékleten kémiai reakciók ezrei játszódnak le, az alacsony hőmérséklet ellenére nagyon nagy sebességgel, és rendkívül szabályozott módon.

A nagy sebesség és szabályozottság közös okra vezethető vissza. Ezeket a kémiai reakciókat enzimek, legnagyobb részben fehérjék, kisebb részben RNS molekulák katalizálják. Az enzimek, legyenek azok akár fehérje-, akár RNS-alapúak, mind makromolekulák, amelyek kiterjedt kölcsönhatásokon keresztül, nagy specifitással lépnek kapcsolatba az egymással reakcióba lépő molekulákkal. Az enzimkatalizált reakciók szabályozása elsősorban az enzim szabályozásán, aktiválásán vagy éppen gátlásán keresztül valósul meg.

Az enzimkinetika elsősorban azt vizsgálja, hogy a katalizált reakció sebessége hogyan függ az enzimmel kölcsönhatásba lépő molekulák koncentrációjától, és adott enzimkoncentráció mellett mekkora az elérhető legnagyobb reakciósebesség. Emellett lényeges kérdés, hogy a reakció hogyan függ a hőmérséklettől, a közeg kémhatásától, ionösszetételétől. Mindezek fontos támpontok az enzim által katalizált reakció mechanizmusának felderítéséhez.

Az enzimkinetika nevének megfelelően tehát elsősorban a katalizált reakció sebességét, a sebességet befolyásoló tényezőket vizsgálja. Mielőtt az enzimkinetika alapegyenleteit tárgyalnánk, mindenképpen szót kell ejtenünk arról, hogy miként lehet termodinamikai alapon értelmezni az enzimek kémiai reakciót gyorsító hatását.

9.1 Az enzimkatalízis termodinamikai értelmezése

A 9.1 egyenlettel jelzett reakciósémában az egymással egyensúlyra vezető reakcióba lépő anyagokat „A” illetve „B”, míg a reakció eredményeként keletkező terméket „P” (produktum) jelöli. Egyelőre csak azt tekintjük át, mitől függ a nem katalizált reakció sebessége.



A fenti reakcióban, amikor még csak A és B vannak jelen, tehát termék még nem keletkezett, a reakció sebessége a 9.2 egyenlettel írható le, ahol „V” a reakció sebessége, a kapcsos zárójel moláris koncentrációkat jelent, és „t” az időt jelzi.

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B] \quad (9.2)$$

Mivel a kémiai reakcióhoz a reagáló molekuláknak találkozniuk, „ütközniük” kell, intuitívan is belátható, hogy a reakciósebesség egyenesen arányos kell, hogy legyen az egymással reagáló molekulák koncentrációjával. A „k” egy, a reakcióra jellemző arányossági tényező, a reakció sebességi állandója.

A reakciónak tehát fontos jellemzője ez a sebességi állandó, de vajon mitől függ annak értéke? A lehető legegyszerűbb mechanizmus modellt, amely már értelmezni tudja, hogy mitől függ a k sebességi állandó értéke, a 9.3 egyenlet mutatja.



Tegyük fel, hogy a két molekula reakciója során egy pillanatszerűen gyors, egyensúlyra vezető folyamatban kialakul egy „X*” molekula, amely az egymással reagáló molekulákhoz képest „aktivált állapotban”, más szóval magasabb szabadentalpia szinten van.

Ezt az X^* molekulát „átmeneti állapotnak” (angolul transition state) nevezzük (ami annak tükrében, hogy egy konkrét molekuláról van szó talán szokatlannak hat). Az itt tárgyalt leírásban ez az X^* molekula alakul át P terméké. Az X^* molekulát eredményező kémiai reakció *egyensúlyi állandóját* (figyelem, ez *nem* sebességi állandó!) K^* , míg az $X^* \rightarrow P$ lépésre vonatkozó *sebességi állandót* k' jelöli. A 9.3 séma a 9.4 sebességi egyenlethez vezet.

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B] = k'[X^*] \quad (9.4)$$

A termékképzés sebessége tehát végső soron az átmeneti állapot koncentrációjának, és egy – látszólag további bonyodalomként – újonnan bevezetett sebességi állandónak, a k' -nek a szorzata.

Első lépésként vizsgáljuk meg, hogy mitől függ az átmeneti állapot koncentrációja. Ez átvezet a termodinamika területére. Az X^* egy K^* egyensúlyi állandóval jellemzett egyensúlyban van a kiindulási anyagokkal a 9.5 egyenlet szerint.

$$K^* = \frac{[X^*]}{[A][B]} \quad (9.5)$$

A K^* egyensúlyi állandóra felírható a kémiai reakciók egyensúlyi állandója és a kémiai reakciót kísérő standard szabadentalpia változás közötti összefüggés a 9.6 egyenlet szerint.

$$-RT \ln K^* = \Delta G^* \quad (9.6)$$

A 9.6 egyenletben szereplő ΔG^* az a szabadentalpia különbség, amely az alapállapotú A és B molekulák és az aktivált állapotú X^* átmeneti állapot szabadentalpia értékei között van. A ΔG^* más néven a reakcióra jellemző aktiválási szabadentalpia (amit hibásan leegyszerűsítve gyakran aktiválási energiának is neveznek).

A 9.6 egyenletből a K^* két egyszerű algebrai átalakítással a 9.7 és 9.8 egyenletek szerint fejezhető ki.

$$\ln K^* = \frac{-\Delta G^*}{RT} \quad (9.7)$$

$$K^* = e^{\frac{-\Delta G^*}{RT}} \quad (9.8)$$

A 9.8 egyenlet és a 9.5 egyenlet alapján adódik a 9.9 egyenletsor, amelynek végeredményét a 9.10 egyenlet mutatja.

$$V = k'[X^*] = k'(K^*[A][B]) = k'e^{\frac{-\Delta G^*}{RT}} [A][B] \quad (9.9)$$

$$V = k'e^{\frac{-\Delta G^*}{RT}} [A][B] \quad (9.10)$$

A reakciósebesség tehát a már említett A és B molekulák koncentrációjának, valamint a k' sebességi állandó értékén felül a ΔG^* aktiválási szabadentalpia értékétől függ. Ha a $\Delta G^* = 0$, akkor az $e^{-\Delta G^*/RT}$ értéke 1. Minél nagyobb pozitív számértéke van az aktiválási szabadentalpiának, annál kisebb lesz az $e^{-\Delta G^*/RT}$ szorzótényező értéke, közelítve a nullához. Az $e^{-\Delta G^*/RT}$ szorzótényező értéke tehát 0 és 1 között lehet.

Képszerűen megfogalmazva, az $e^{-\Delta G^*/RT} [A][B]$ szorzatban szereplő $e^{-\Delta G^*/RT}$ szorzótényező azt mutatja meg, hogy az A és B molekulák ütközésének mekkora hányada eredményez X^* átmeneti állapotot. Ha a szorzótényező 1, akkor minden ütközés átmeneti állapotot eredményez, ha 0, akkor az ütközések nem eredményeznek átmeneti állapotot.

Előbbi esetben a reakciósebesség maximális, míg az utóbbi esetben természetesen nulla. Tehát, minél nagyobb a reakcióra jellemző aktiválási szabadentalpia, annál lassabb lesz a reakció.

A fenti modell a k' sebességi állandó mibenlétére is egyszerű magyarázatot ad az alábbiak szerint. Ahhoz, hogy az átmeneti állapot termékké alakuljon, legalább egy kémiai kötésnek fel kell bomlania. A k' sebességi állandó (képszerűbben megnevezve sebességi ráta, vagyis sebességi ütem) azt fejezi ki, hogy milyen ütemben, milyen gyakorisággal (frekvenciával) képes az adott kémiai kötés felszakadni.

Ezt a 9.11 egyenlet fogalmazza meg, amelyben a ν (nű) azt a frekvenciát jelzi, amellyel az elbomlandó kötés rezeg, a κ (kappa) pedig az átviteli együttható. Azt mutatja meg, hogy a már kialakult átmeneti állapot milyen arányban alakul termékké, illetve alakul vissza kiindulási anyagokká. Ha a kappa értéke 0,5, akkor az esetek felében termék irányba, az esetek másik felében visszafelé alakul át, ha a kappa értéke 1, akkor az átmeneti állapot kizárólag termék irányba alakul át.

$$k' = \kappa \nu \quad (9.11)$$

Az egyszerűség kedvéért vegyük azt az esetet, amikor az átviteli együttható értéke 1. A kötés rezgésének energiája a 9.12 egyenletben szereplő módon, a Planck törvény szerint függ a rezgés frekvenciájától.

$$\nu = \frac{E}{h} \quad (9.12)$$

Az egyenletben E a rezgő kötés energiáját, h a Planck állandót jelzi. Az egyenletben szereplő energia ugyanakkor egy másik módon is felírható a 9.13 egyenlet szerint, amelyben k_b a Boltzmann állandót, T pedig a Kelvin skálán vett hőmérsékletet jelzi.

$$E = k_b T \quad (9.13)$$

A 9.11-9.13 egyenleteket kombinálva, és az átviteli együttható értékét 1-nek tekintve kapjuk a 9.14 egyenletet.

$$k' = \frac{k_b T}{h} \quad (9.14)$$

A 9.4, 9.10 és a 9.14 egyenletek kombinálásával kapjuk a 9.15 illetve 9.16 egyenleteket, amik kifejtik, hogy végül is mitől függ egy nem katalizált kémiai reakció sebessége.

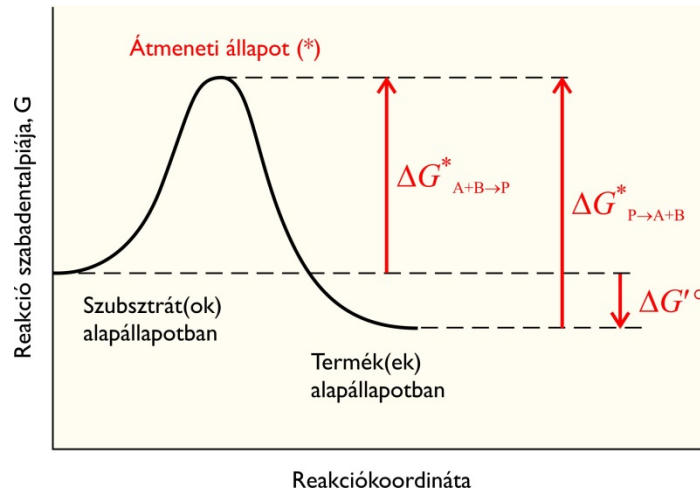
$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^*}{RT}} \quad (9.15)$$

$$V = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^*}{RT}} [A][B] \quad (9.16)$$

Mint látható, a reakció k sebességi állandója fordítottan arányos a reakcióra jellemző aktiválási szabadentalpiával, és összetett módon függ a hőmérséklettől. Ez utóbbi mind a pre-exponenciális szorzótényezőben, mind pedig az exponenciális tag kitevőjének nevezőjében is szerepel. Mindkét tag jelzi, hogy a hőmérséklet emelése növeli a reakció sebességi állandóját. A pre-exponenciális tagban, amely a k' sebességi állandót fejezi ki, a hőmérsékletemelés növeli az elbomló kötés rezgési frekvenciáját, míg az exponenciális tagban a hőmérsékletemelés növeli azon ütközések arányát, amelyek átmeneti állapotot eredményeznek.

Maga a reakciósebesség a 9.4 egyenletben leírtak szerint a k sebességi állandón kívül egyenesen arányos a reakcióba lépő anyagok koncentrációjával.

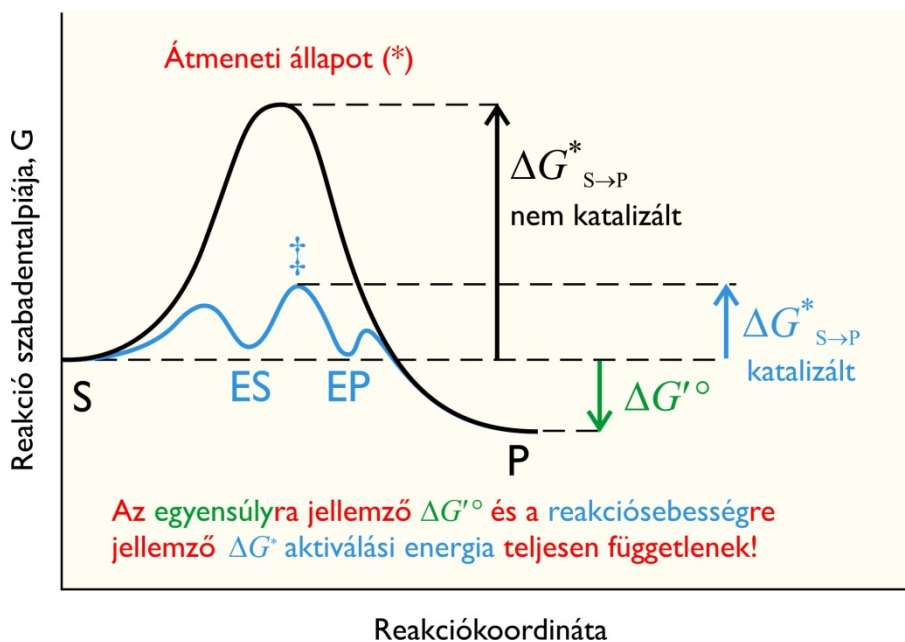
A kémiai reakciók sebességére vonatkozó termodinamikai modellt a **9.1. ábra** szemlélteti.



9.1. ábra. A kémiai reakciók sebességére vonatkozó termodinamikai model.

Az ábra azt is mutatja, hogy a reakció egyensúlyi állapotában kialakuló reagens arányok, amelyeket a kémiai reakciót kísérő standard szabadentalpia változás ($\Delta G'^{\circ}$) értéke jelez, tökéletesen függetlenek a reakció sebességétől, amit az aktiválási szabadentalpia (ΔG^*) értéke jellemez.

A kémiai reakciók sebességének termodinamikai leírása egyértelműen megmutatja, hogy az enzimek milyen módon növelik a kémiai reakció sebességét: az *enzimek csökkentik a reakció aktiválási szabadentalpiáját (9.2. ábra)*.



9.2. ábra. Az enzimek csökkentik a reakció aktiválási szabadentalpiáját.

A kérdés, hogy alapvetően milyen módokon csökkenthető a ΔG^* . Ennek megválaszolásához idézzük fel, hogy a szabadentalpia változás minden esetben, így az aktiválási szabadentalpia esetében is, felbontható egy entalpiával kapcsolatos és egy entrópiikus tagra a 9.17 egyenlet szerint.

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \tag{9.17}$$

A reakciósebesség szempontjából kedvezőtlen, azt csökkentő magas ΔH^* tag azt jelenti, hogy az átmeneti állapothoz (például egy energetikailag kedvezőtlen elektroneloszlás miatt) magas energiaszint tartozik, ami egyben azt is jelenti, hogy az átmeneti állapot nagyon alacsony arányban jelenik meg. Az enzim azáltal csökkenti az entalpia tagot, hogy stabilizálja az átmeneti állapotot, tehát vonzó kölcsönhatásokat alakít ki az átmeneti állapottal. Az

enzimek tehát olyan kötőzsebbel rendelkeznek, amely komplementer az általuk katalizált kémiai reakció átmeneti állapotával. Érdeemes megjegyezni, hogy azt, hogy az enzimek a kémiai reakciót az átmeneti állapot stabilizálásán keresztül gyorsítják, elsőként Linus Pauling javasolta.

A reakciósebesség szempontjából kedvezőtlen negatív ΔS^* , tag azt jelzi, hogy az átmeneti állapot lényegesen rendezettebb, mint a kiindulási állapot. A rendeződés miatt az átmeneti állapot létrejöttének magas, entrópiával kapcsolatos ($-T \Delta S^*$ formában kifejezett) energetikai ára van. Az enzim entrópikus szempontból oly módon gyorsíthatja a kémiai reakciót, hogy a kötőzsebe egymáshoz éppen megfelelő távolságba és orientációba hozza, tehát rendezi az egymással reakcióba lépő molekulákat.

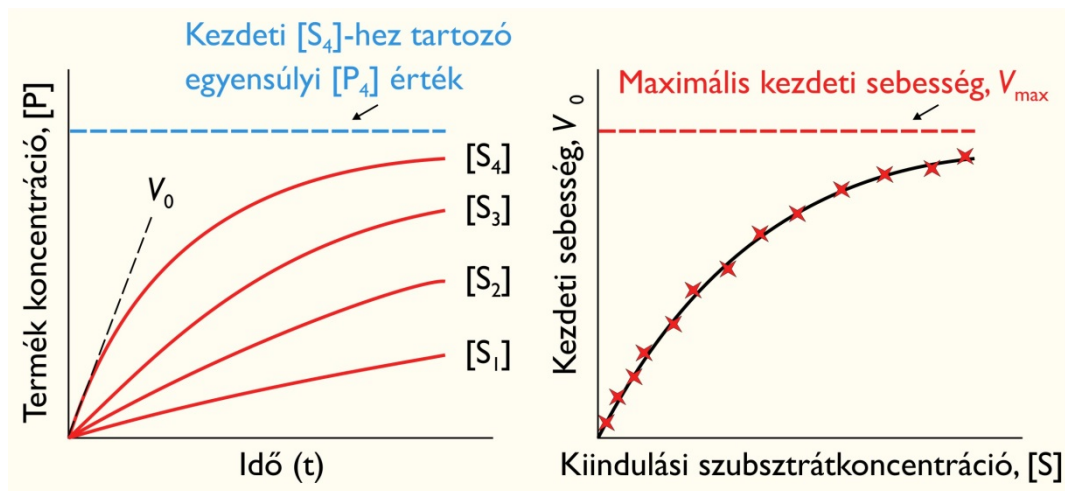
9.2. A Michaelis-Menten kinetika

A termodinamikai értelmezés után áttérünk az enzimkinetika alapvető összefüggéseinek leírására. Mivel itt már az enzimatis reakcióra fókuszálunk, a kiindulási anyagunkat szubsztrátnak nevezzük majd, és S jelöléssel hivatkozunk rá. A terméket továbbra is P betű jelzi. A korábbi $A + B \rightarrow P$ sémával szemben a lehető legegyszerűbb, $S \rightarrow P$ esettel foglalkozunk.

Az enzimkinetika tudományág kialakulásának hajnalán az enzimek fizikai mibenlétéről, a sebességnövelés lehetséges mechanizmusairól még szinte semmit nem tudtak.

A legegyszerűbb elsőrendű kémiai reakciónál a fenti jelöléseket használva a nem katalizált $S \rightarrow P$ reakció sebessége $V = d[P]/dt = k[S]$. Más szóval a reakció sebessége egyenesen arányos S koncentrációjával. A sebesség így elvileg „végtelenségig” növelhető, annak csak S oldhatósága szabna gátat.

Amennyiben egy enzim katalizálja az átalakulást, a reakció nagyságrendekkel gyorsabban zajlik, ugyanakkor jellegzetesen eltérő az $[S]$ -V függvény. Állandó $[E]$ esetén kis $[S]$ értékeknél az $[S]$ növelésével a V reakciósebesség közel egyenes arányban, tehát lineárisan növekedik, de egyre nagyobb kiindulási $[S]$ esetén a V egyre kevésbé növekedik, és egy maximális érték felé tart (9.3. ábra).



9.3. ábra. Enzimkinetikai kezdeti sebesség görbék.

Az első kinetikai modell, amely sikeresen magyarázta a fenti jelenséget, Leonor Michaelis és Maud Menten nevéhez fűződik, és azon a ma már triviálisnak tűnő feltételezésen alapult, hogy az enzim és a szubsztrát között fizikai kapcsolat jön létre, ami egy átmeneti komplexet eredményez. Ezt a sémát a 9.18 egyenlet mutatja, ahol ES jelöli a ma már Michaelis nevével fémjelzett komplexet.



A fenti, legegyszerűbb séma a következő feltételezéseken alapul. Az enzim és a szubsztrát között pillanatszerűen gyors reakcióban kialakul az ES komplex, ezért ennek a részreakciónak a sebességi állandóival a modell nem is foglalkozik. Ezek helyett csak az egyensúlyi állandót (K_S) (nem-kovalens E-S kölcsönhatás esetén ez egy disszociációs állandó) definiálják a 9.19 egyenlet szerint.

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (9.19)$$

A modell szerint az ES komplex termékké bomlásának üteme, a katalitikus sebességi állandó, amelynek jelölése k_{cat} , lényegesen alacsonyabb értékű, mint az egyensúlyi állandóban rejlő sebességi állandók. E szerint a modell szerint a termék irányú bomlás olyan alacsony ütemű, hogy (a mérés során) praktikusán nem befolyásolja az [E], [S] és [ES] egyensúlyi koncentrációkat.

Vezessük le, hogy a fenti reakció séma, és kiindulási feltételek esetén milyen függvény szerint függne a kezdeti sebesség a szubsztrát koncentrációjától.

A 9.18 egyenletben szereplő sémából következik a reakciósebességnek a 9.20 egyenlete, amely egy elsőrendű kémiai reakciót tükröz, amelyben a termékkeletkezés sebessége kizárólag egyfajta anyagnak, az ES komplexnek a koncentrációjával arányos.

$$V_0 = k_{cat}[ES] \quad (9.20)$$

A séma nem számol azzal, hogy az enzimből és a termékből a fordított irányú reakcióból szintén ES jöhet létre, mondván a reakció legelejét vizsgáljuk, amikor még nem keletkezett termék. Ezért is fontos hangsúlyozni, hogy az így definiált sebesség kezdeti, nulla időpillanathoz tartozó reakciósebesség.

Ahhoz, hogy olyan egyenlethez jussunk, amely ES nem ismert koncentrációja helyett ismert enzim és szubsztrát-koncentrációkat tartalmaz, a 9.19 egyenletet felhasználva ki kell fejeznünk az ES koncentrációt a kísérletben beállított, tehát ismert koncentrációkkal.

Ehhez vegyük figyelembe, hogy a szabad enzimkoncentráció, a teljes enzimkoncentráció, és az ES komplexben lévő enzimkoncentráció között a 9.21 egyenletben felírt, egyszerű összefüggés áll fenn:

$$[E] = [E]_r - [ES] \quad (9.21)$$

A 9.21 egyenletet a 9.19 egyenlettel kombinálva kapjuk a 9.22 egyenletet:

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([E]_r - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{[E]_r[S] - [ES][S]}{[ES]} \quad (9.22)$$

Mindkét oldalt megszorozva az ES koncentrációval a 9.23 egyenletet kapjuk.

$$K_S[ES] = [E]_r[S] - [ES][S] \quad (9.23)$$

A 9.24 egyenletben az ES tartalmú tagokat egymás mellé rendezzük,

$$K_S[ES] + [ES][S] = [E]_r[S] \quad (9.24)$$

majd a 9.25 egyenletben kiemeljük az [ES]-t a szorzatok összeadásából:

$$[ES](K_S + [S]) = [E]_r[S] \quad (9.25)$$

Végül mindkét oldalalt elosztjuk [ES] szorzójával, így a 9.26 egyenlethez jutunk:

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{(K_S + [S])} \quad (9.26)$$

Ezzel az ismeretlen ES koncentrációt az ismert teljes enzimkoncentráció, a szabad szubsztrát koncentráció, és az egyensúlyi állandó segítségével fejeztük ki.

Amennyiben olyan kiindulási körülményt teremtünk, amelyben a teljes szubsztrát koncentráció nagyságrendekkel meghaladja a teljes enzimkoncentrációt, úgy az a szubsztrát mennyiség, amely ES komplexbe kerül, elhanyagolható lesz az összes szubsztrát mennyiségéhez képest. (Ez a kísérletek során rendszerint könnyen biztosítható, de érdemes megjegyezni, hogy az élőlényekben zajló valós folyamatokban az esetek jó részében nem teljesül). Emiatt a szabad szubsztrát koncentráció (a reakció elején) praktikusán megegyezik majd a teljes szubsztrát koncentrációval, tehát mind az $[E_T]$, mind az $[S]$ kísérletesen meghatározott, ismert értékű adat.

A következő lépésben a 9.20 egyenlet alapján mindkét oldalt megszorozzuk a k_{cat} sebességi állandóval, ami a kezdeti sebességet fogja megadni a 9.27 egyenlet szerint.

$$V_0 = k_{cat} [ES] = \frac{k_{cat} [E]_T [S]}{(K_S + [S])} \quad (9.27)$$

Vegyük észre, hogy az elérhető legmagasabb, tehát maximális sebességi értéket, amelynek jelölése V_{max} , akkor kapjuk, ha az összes enzim ES komplexben van. Ebben az esetben a szubsztrát telíti az oldatban jelenlévő enzim molekulákat. Ekkor tehát $[ES] = [E_T]$. A 9.27 egyenlet jobboldalán a számlálóban szereplő $k_{cat} E_T$ szorzat tehát nem más, mint maga a V_{max} . Ennek figyelembevételével kapjuk a 9.28 egyenletet, ami a legegyszerűbb, eddig tárgyalt enzimkinetikai modell végső egyenlete:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{(K_S + [S])} \quad (9.28)$$

Ez az egyenlet egy derékszögű hiperbola függvény, amelynek általános felírása: $Y = P_1 X / (P_2 + X)$, ahol X a független változó, jelen esetben a szubsztrát koncentráció, Y a függő változó, jelen esetben a kezdeti sebesség, a P_1 és P_2 pedig a függvény paraméterei, jelen esetben a két állandó, a V_{max} és a K_S . A P_1 egyben a hiperbola vízszintes aszimptotája is, vagyis az a maximális Y érték, amelyet növekvő X érték (szubsztrát koncentráció) esetén a függvényérték tetszőleges mértékben megközelíthet, de el nem érhet. A P_2 paraméter a K_S .

Vegyük észre, hogy ez az egyenlet kiváló összhangban van a már említett, a 9.3. ábrán is bemutatott tapasztalati $[S]-V_0$ összefüggéssel az alábbiak szerint. Amikor $[S] \ll K_S$, akkor $[S]$ a nevezőben elhanyagolható, és a 9.29 egyenlethez jutunk:

$$V_0 = \frac{V_{max}}{K_S} [S] \quad (9.29)$$

A 9.29 egyenletben a szubsztrát koncentráció szorzója két állandó hányadosa, amely hányados maga is állandó. A K_S értékéhez képest elhanyagolhatóan alacsony szubsztrát koncentráció tartományban tehát a kezdeti sebesség – a tapasztalattal egyezően –, lineáris függvénye a szubsztrát koncentrációnak.

Amikor $[S] \gg K_S$, akkor a 9.28 egyenletben éppenséggel a K_S lesz elhanyagolható az $[S]$ értékéhez képest a nevezőben. Az elhanyagolást elvégezve a 9.30 egyenlethez jutunk:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S]} = V_{max} \quad (9.30)$$

Amikor tehát a szubsztrát koncentrációja nagymértékben meghaladja a K_S értékét, a szubsztrát telíti az enzimet, minden enzim ES komplexbe kerül, a kezdeti sebesség eléri a maximálisan elérhető értéket, további szubsztrát

koncentráció növelésével a sebesség már nem növelhető. Ebben a szubsztrát koncentráció tartományban a kezdeti sebesség tehát már gyakorlatilag nem függ a szubsztrát koncentrációjától. A 9.3. ábrán szereplő grafikonok emiatt telítési görbének, vagy szubsztrát-telítési görbének is szokás nevezni.

Amikor a szubsztrát koncentrációja éppen megegyezik a K_S számértékével, akkor a reakció kezdeti sebessége éppen a V_{\max} érték fele. Az itt levezetett 9.28 egyenlet tehát leíró értelemben jól használható. Ugyanakkor mégis alapvető problémákat vet fel. Minél hatékonyabb egy enzim, annál inkább tarthatatlan az a kiindulási feltételezés, hogy az enzimkatalízis során a nagysebességgel zajló szubsztrát fogyás ne mozdítaná be az enzim, a szubsztrát és az ES komplex között – az eredeti feltételezés szerint pillanatszerűen gyorsan - kialakuló egyensúlyt. A fenti leírás tehát éppen a leghatékonyabb enzimek jellemzésére a legkevésbé alkalmas.

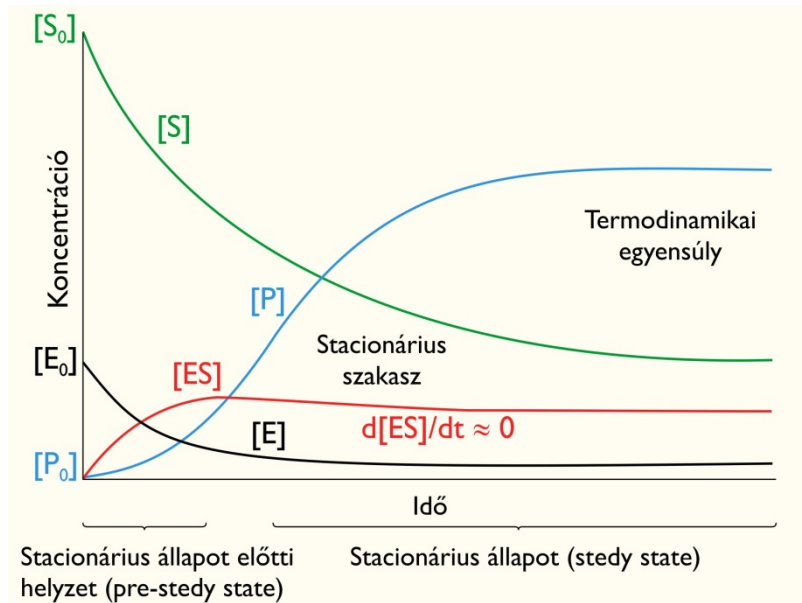
A másik probléma az, hogy a fenti modell ellentmondásban van a termodinamikai bevezetőben leírtakkal is. A K_S egy disszociációs állandó, ami mint ilyen, kötéseerősség, más szóval affinitás jellemzésére is alkalmas. A K_S ebben a modellben megadja, hogy az enzim mennyire stabil kölcsönhatást létesít a szubsztráttal, milyen „erősen” köti azt. A modell szerint minél alacsonyabb a K_S , annál hatékonyabb az enzim, hiszen annál alacsonyabb szubsztrát koncentráción éri el a reakció sebessége V_{\max} értékének a felét. Csakhogy a valóságban minél stabilabb kölcsönhatást létesít az enzim a szubsztráttal, annál lassabbnak kell lennie a reakciónak, hiszen az enzim éppenséggel stabilizálná a szubsztrátot. Az enzimnek természetesen meg kell kötnie a szubsztrátot, de igazán hatékonyan a rendkívül instabil átmeneti állapottal kell kölcsönhatást létesítenie, azt kell stabilizálnia.

A fentiek miatt az enzimkinetikai modellt tovább kellett fejleszteni az alábbiak szerint.

A továbbfejlesztett séma már számol az enzim és a szubsztrát ES komplexhez vezető reakciójának sebességi állandójával (jelölése k_1), valamint az ES komplex enzimre és szubsztrátra történő visszaalakulásának sebességi állandójával (jelölése k_{-1}). A sémát a 9.31 egyenlet mutatja.



A modell szerint az enzim és a szubsztrát oldatának összekeverésekor nem egy dinamikus egyensúly, hanem egy stacionárius állapot (angolul steady state) áll be szinte pillanatszerű gyorsasággal. A stacionárius állapotban a körülményektől függően akár hosszú ideig állandó lehet az ES komplex koncentrációja. (Pontosabban megfogalmazva az ES koncentrációja a pillanatszerű emelkedés után folyamatosan csökken, de ez a csökkenés jóval kisebb ütemű, mint a szubsztrát fogyásának, vagy a termék keletkezésének az üteme, és a modellben elhanyagolható.) Ehhez az kell, hogy az ES komplex kialakulásának k_1 sebességi állandóval jellemzett üteme éppen megegyezzen az ES komplex elbomlásának ütemével. Ezt a **9.4. ábra** szemlélteti. A reakciót szubsztrát hozzáadásával indítjuk. (Az ábra arányai csalnak, hogy egyetlen oldalon be lehessen mutatni a lényegét. A stacionárius szakasz valójában már néhány ezredmásodperc alatt kialakul, és akár percekig is fennmaradhat. A valóságban az $[S]$ sokkal magasabbról indul, hiszen $[S] \gg [E]$.)



9.4. ábra. A stacionárius állapot.

A bomlás egyrészt végbemehet a termék kialakulásának irányában k_2 sebességi állandóval, illetve ezzel ellentétes irányban, szabad enzimet és szubsztrátot eredményezve k_{-1} sebességi állandóval. A stacionárius állapot kialakulását a 9.4. ábra illusztrálja, annak fent körülírt feltételét pedig a 9.32 egyenlet írja le.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (9.32)$$

Ezt a feltételezést elsőként G.E. Briggs és James B.S. Haldane javasolta, ennek ellenére az alábbiakban kifejtett, továbbfejlesztett modellt Michaelis-Menten kinetikának, és az abból fakadó egyenletet Michaelis-Menten egyenletnek hívjuk. Az egyenletben $k_1[E][S]$ sebességgel keletkezik az ES komplex, amely visszafelé $k_{-1}[ES]$ sebességgel, termék irányban pedig $k_2[ES]$ sebességgel bomlik. A keletkezés és a kétirányú elbomlás eredő sebessége, vagyis az ES komplex koncentrációjának változása nulla.

A következőkben a 9.32 egyenletet rendezzük át több lépésben úgy, hogy ismét a mérhető, illetve kísérletesen megszabott $[E]$ és $[S]$ koncentrációk szerepeljenek a végső egyenletben. Ez a továbbfejlesztett modell is alapfeltételként szabja meg, hogy a szubsztrát koncentrációja nagyságrendekkel haladja meg az enzimkoncentrációt. A termékkeletkezés üteme itt is egyszerűen megadható a 9.33 egyenlet szerint, amely analóg az első modell 9.20 egyenletével.

$$V_0 = k_2[ES] \quad (9.33)$$

A korábbi modellben k_{cat} néven jelzett sebességi állandó helyett a továbbfejlesztett sémából származó k_2 megnevezést alkalmazzuk.

A 9.32 egyenletet átrendezve kapjuk a 9.34 egyenletet.

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (9.34)$$

A korábban már látott módon, a szabad enzim koncentrációját a teljes enzimkoncentráció és az ES koncentráció különbségként fejezzük ki a 9.35 egyenlet szerint.

$$k_1([E]_T - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (9.35)$$

Az egyenletben egyszerű algebrai átalakítással felbontjuk a zárójeles tagot, így a 9.36 egyenletet kapjuk.

$$k_1[E]_T[S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (9.36)$$

Ezután az [ES] tagot tartalmazó részeket azonos oldalra rendezve adódik a 9.37 egyenlet.

$$k_1[E]_T[S] = (k_{-1} + k_2)[ES] + k_1[ES][S] \quad (9.37)$$

Ebből az egyenletből kiemeljük az [ES] szorzót, így a 9.38 egyenlethez jutunk.

$$k_1[E]_T[S] = (k_{-1} + k_2 + k_1[S])[ES] \quad (9.38)$$

A 9.39 egyenletben az [ES] tagot baloldalra rendezzük.

$$[ES] = \frac{k_1[E]_T[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \quad (9.39)$$

A jobb oldalon a számlálót és a nevezőt is elosztjuk a k_1 sebességi állandóval, ami a 9.40 egyenlethez vezet.

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} + [S]} \quad (9.40)$$

A nevezőben megjelenő törtre a 9.41 egyenletben definicióként bevezetjük a Michaelis állandó (Michaelis konstans) elnevezést, amelynek rövidítése K_M .

$$\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \equiv K_M \quad (9.41)$$

Mint látható a K_M azt mutatja meg, hogy milyen arányban van az ES komplex kétirányú elbomlásának és egyirányú keletkezésének az üteme. Más szóval azt jelzi, hogy mennyire bomlékony az ES komplex.

A 9.41 egyenletet a 9.40 egyenletbe építve a 9.42 egyenletet kapjuk.

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (9.42)$$

A 9.33 egyenlet és a 9.42 egyenlet kombinálása a 9.43 egyenlethez vezet.

$$V_0 = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_T[S]}{(K_M + [S])} \quad (9.43)$$

Ahogy az egyszerűbb modell 9.27 egyenlete nyomán már jeleztük, az elérhető legmagasabb, V_{\max} sebességi értéket akkor kapjuk, ha az összes enzim ES komplexben van, vagyis $[ES] = [E]_T$. A 9.43 egyenletben szereplő k_2E_T szorzat tehát nem más, mint a V_{\max} . Ennek figyelembevételével kapjuk a 9.44 számú Michaelis-Menten egyenletet, ami a továbbfejlesztett enzimkinetikai modell végső egyenlete:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{(K_M + [S])} \quad (9.44)$$

Vegyük észre, hogy ez az egyenlet formailag megegyezik a korábbi modell 9.28 egyenletével, ezért a 9.29 és 9.31 egyenletben ismertettek szerint ez az egyenlet is összhangban van a tapasztalattal. Abban a szubsztrát koncentráció

tartományban, ahol $[S] \ll K_M$, a V_0 lineárisan függ $[S]$ értékétől, míg abban a tartományban, ahol $[S] \gg K_M$, a reakció már nem függ az $[S]$ értékétől, és a maximális, V_{\max} sebességgel zajlik.

Amennyiben az $[S]$ értéke éppen megegyezik a K_M számértékével, akkor a reakció a V_{\max} felének megfelelő sebességgel zajlik.

Formailag tehát sok a hasonlóság, de az értelmezésben lényegi különbségek vannak. Vegyük észre, hogy az egyszerű modell K_S állandója, és a továbbfejlesztett modell K_M állandója nem ugyanazt fejezik ki. A 9.45 egyenlet mutatja, hogy a disszociációs állandó jellegű K_S egyensúlyi állandó hogyan származtatható a k_1 és k_{-1} sebességi állandókból.

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (9.45)$$

Mint azt már írtuk, a K_S egyfajta affinitási jellemző, amely jelzi, hogy az enzim milyen erősen köti a szubsztrátot. A 9.45 és a 9.41 egyenlet összehasonlításából látható, hogy a K_M csak akkor lenne egyenértékű a K_S állandóval, ha igaz lenne, hogy $k_2 \ll k_{-1}$, azaz ha az ES komplex termék irányú átalakulásának az üteme sokkal alacsonyabb lenne, mint a szubsztrát irányú visszabomlásának az üteme. Márpedig minél hatékonyabb egy enzim, annál inkább fordított a helyzet, annál inkább igaz, hogy $k_2 \gg k_{-1}$.

Tehát minél hatékonyabb az enzim, annál kevésbé tekinthető a K_M egyfajta enzim-szubsztrát affinitási jellemzőnek. Ez a fajta értelmezés, mint már említettük, amúgy is ellentmondana az enzimkatalízis termodinamikai leírásának.

Míg a K_M és a K_S nem feleltethető meg egymásnak, a továbbfejlesztett modellben szereplő k_2 sebességi állandó, amennyiben az ES komplex valóban egyetlen lépésben bomlik enzime és termékre, megfelel az egyszerűbb modellben bevezetett k_{cat} sebességi állandónak. (Több átmeneti állapoton keresztül zajló, összetettebb katalízis mechanizmus esetén a k_{cat} sebességi állandót olyan egyenlet adja meg, amelyben minden egyes lépés sebességi állandója szerepel). A k_{cat} tulajdonképpen az enzimnek, mint kémiai katalizátornak a hatékonyságát jellemzi attól az állapottól kezdve, amikor az ES komplex már kialakult.

Vizsgáljuk meg, hogy a 9.46 és 9.47 egyenletek szerint mi a k_{cat} sebességi állandó fizikai jelentése.

$$V_{\max} = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_T \quad (9.46)$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{\left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{\max}}{[E]_T} \quad (9.47)$$

Mint láttuk, a maximális sebesség a k_{cat} és a teljes enzimkoncentráció szorzata. A 9.47 egyenlethez úgy jutunk, hogy elosztjuk a termék koncentrációváltozásának 9.46 egyenletben kifejtett sebességét a teljes enzim koncentrációval. Mivel a termék és az enzim azonos oldattérfogatban vannak, az arány mennyiségek hányadosa lesz. Azt adja meg, hogy egyetlen enzim molekula időegységként hány termék molekula keletkezését katalizálja.

A k_{cat} sebességi állandót emiatt átviteli számnak is nevezik, dimenziója $1/t$, ahol t az időt jelöli. Természetesen minél magasabb a k_{cat} értéke, annál hatékonyabb az enzimreakció. Vegyük észre, hogy a továbbfejlesztett modellben, amennyiben a $k_{\text{cat}} = k_2$, ez a sebességi állandó a K_M állandót definiáló törtben is szerepel, mégpedig a számlálóban. A magas k_{cat} érték tehát növeli a K_M állandót. Ugyanakkor az is belátható, hogy minél alacsonyabb a K_M értéke, annál hatékonyabb az enzim, annál alacsonyabb szubsztrát koncentráción éri el a fél-maximális sebességet a reakció. Mindezek alapján kérdés, hogyan jellemezhető legjobban az enzim hatékonysága?

A leghatékonyabb enzimtől azt várjuk, hogy már nagyon alacsony szubsztrát koncentráción is magas sebességgel dolgozik, és magas az átviteli száma is. Mint már kifejtettük, olyan alacsony szubsztrát koncentráció tartományban, ahol $[S] \ll K_M$, a reakciósebesség lineárisan függ a szubsztrát koncentrációjától. Ezt mutatja a 9.48 egyenlet.

$$V_0 \cong \frac{k_{cat}}{K_M} [E][S] \quad (9.48)$$

Az egyenletben szereplő k_{cat}/K_M hányados egy másodrendű reakció sebességi állandója. Ez a hányados mutatja meg, hogy a „legnehezebb” szituációban, amikor a szubsztrát koncentrációja nagyon alacsony, mennyire hatékony az enzim. A k_{cat}/K_M hányadost emiatt „katalitikus hatékonyságnak” is szokták nevezni. Ugyanez a hányados azt is megmutatja, hogy az enzim milyen mértékben szelektív egy szubsztráton. Egy olyan oldatban, ahol azonos, alacsony koncentrációban többféle szubsztrát is jelen van, az enzim ezeket a rájuk vonatkozó k_{cat}/K_M értékek arányában fogja átalakítani. A k_{cat}/K_M hányadost ezért „specifitási állandónak” is szokták nevezni.

Nézzük meg, hogy a modellünk szerint mi szab határt a katalitikus hatékonyságnak, mi jellemző a lehető leghatékonyabb enzimekre. A 9.49 egyenletsorban 9.48 egyenletben szereplő k_{cat} illetve K_M állandókba helyettesítsük be a modellből, illetve a definícióból adódó sebességi állandókat.

$$V_0 = \frac{k_2}{(k_{-1} + k_2)} [E][S] = \frac{k_2 k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S] \approx k_1 [E][S] \quad (9.49)$$

Az egyenletrendszer jobboldali része szerint akkor, és csak akkor, ha a $k_2 \gg k_{-1}$, a nevezőben a k_{-1} tag elhanyagolható lesz, és a k_2 taggal egyszerűsíteni lehet. A $k_2 \gg k_{-1}$ körülmény azt jelenti, hogy az ES komplex szinte kizárólag termék irányba bomlik, a fordított irányban nem. A reakció k_{cat}/K_M értéke ekkor jó közelítéssel megegyezik k_1 értékével. Ez tehát azt jelenti, hogy ekkor kizárólag az enzim és szubsztrát ES komplexhez vezető találkozásának üteme szabja meg a reakció sebességét. Magától értetődő, hogy ennél gyorsabb a reakció nem is lehet, hiszen nem keletkezhet nagyobb ütemben termék, mint amilyen ütemben ES komplex keletkezik az enzimből és a szubsztrátból.

Első megközelítésben a leghatékonyabb enzimek működésének tehát a diffúzió szab határt, amely megszabja, hogy milyen gyakran találkozhat az enzim és a szubsztrát. A diffúzió sebessége jól számolható a diffundáló molekulák méretének és az oldat viszkozitásának ismeretében.

Egyes enzimreakciók esetében azonban kiderült, hogy azok nagyobb sebességgel zajlanak, mint a számolt diffúzió sebessége. Legalább két olyan körülmény ismert, amely ilyen jelenséget eredményezhet. Egyes szubsztrátok jelentős töltéssel bírnak. Amennyiben az enzim szubsztrátkötő felszíne szintén jelentős, a szubsztrátéval ellentétes töltéssel bír, úgy a viszonylag távolra ható elektrosztatikus kölcsönhatás, és annak orientáló jellege miatt az enzim szubsztrátkötő helye és a szubsztrát hatékonyabban talál egymásra, mint azt az egyszerű diffúzió lehetővé tenné.

A másik jellegzetes lehetőséget arra, hogy a szubsztrát ne egyszerű diffúzióval találkozzon az enzimmal, a multi-enzim komplexek szolgáltatják. Az anyagsere folyamatok során rendszerint számos köztes termékén keresztül alakul át egy-egy kiindulási anyag végső terméké. Az egyik lépést katalizáló enzim terméke ilyenkor a soron következő lépést katalizáló enzim szubsztrátja. Amennyiben ezek az enzimek egy nagyobb multi-enzim komplex alegységei, úgy a keletkező köztes termékek enzimről enzimre „adogatódhatnak” anélkül, hogy az oldatba kerülve diffúzióval jutnának a soron következő enzimhez.

9.3. A kezdeti sebesség értékek és a fő kinetikai paraméterek meghatározása

A kinetikai mérések során rendkívül fontos, hogy a hőmérsékletet állandó értéken tartsuk, és ez az érték lehetőleg legyen közel a vizsgált enzim hőmérséklet optimumához. A reakció során a pH értékét is állandóan kell tartani megfelelő pufferek alkalmazásával. Minden enzimreakcióhoz tartozik egy optimális pH érték, érdemes az ennek megfelelő pH értéket beállítani. Olyan puffert kell választani, amely önmagában nem befolyásolja a vizsgált kémiai reakciót, illetve a detektálást. Az ATP-ázok aktivitását például gyakran a keletkező foszfát mérésén keresztül vizsgálják. Ilyen esetben természetesen nem lehet foszfát puffert alkalmazni.

Amint az a fejezetben már többször említésre került, egy általánosan „P”-vel jelzett terméket eredményező (enzimkatalizált) kémiai reakció sebessége (V_0) definíció szerint nem más, mint a P anyag koncentrációjának időbeni változása: $V_0 = d[P]/dt$. Egy általánosan felírt $S \rightarrow P$ reakció esetén az előzővel egyenértékű sebesség definíció az, amely a szubsztrát koncentráció ($[S]$) csökkenését veszi figyelembe: $V_0 = -d[S]/dt$. A V_0 méréséhez tehát vagy a termék, vagy a szubsztrát koncentrációját kell mérnünk.

A kémiai átalakulás minden esetben elektronszerkezet-változással jár. A megváltozott elektronszerkezet megváltozott fény általi gerjeszthetőséget is jelent, ami az esetek egy részében spektroszkópiai módszerekkel jól mérhető. Legegyszerűbb esetben a termék optikai tulajdonságai, fényelnyelési, esetleg fluoreszcencia spektruma mérhetően eltérnek a szubsztrát (és minden más oldatkomponens) említett paramétereitől. Ilyen esetben a termék keletkezése, illetve a szubsztrát fogyása folyamatában követhető. Megfelelő koncentrációtartományban (lásd 4. fejezet) a fényelnyelés (abszorbancia) mértéke, fluoreszcencia esetén pedig a kibocsájtott fény intenzitása egyenesen arányos annak a molekulának a koncentrációjával, amely a fényt elnyeli, illetve kibocsájtja. Ennek alapján a spektroszkópiai méréssel a termék (vagy a szubsztrát) koncentrációjának időbeli változása pontosan mérhető.

Amennyiben sem a termék, sem a szubsztrát nem rendelkezik jól mérhető optikai tulajdonságokkal, akkor is lehetőség nyílik spektroszkópiai mérésre, amennyiben a keletkezett terméket egy specifikus, pillanatszerűen lejátszódó kémiai reakcióba lehet vinni, amelynek eredményeként optikailag aktív (fényelnyelő, illetve fluoreszkáló) molekula keletkezik. Ha ez a második reakció olyan körülmények között zajlik, amely összeegyeztethető az enzimatis reakció során alkalmazandó oldatkörülményekkel (pH, hőmérséklet) akkor az ilyen típusú mérés is lehet folyamatos. Ha azonban ez a második reakció csak az enzimreakcióval össze nem egyeztethető körülmények között megy végbe (például extrém pH értéken, vagy magas hőmérsékleten), akkor a kinetikai mérést csak szakaszosan lehet elvégezni. Ilyenkor abból az oldatból, amelyben az enzimreakciót elindítottuk, különböző időpillanatokban mintát veszünk, az enzimet az oldatösszetétel megfelelő, gyors megváltoztatásával inaktíváljuk, és elvégezzük az optikai jelet generáló második reakciót. Érdemes megjegyezni, hogy olyan kémiai reakciókat, amelyek proton felszabadulással, vagy proton felvétellel járnak, a pH-változáson keresztül is követni lehet. Pontosabban, az ilyen esetekben egy automata készülék, az úgynevezett pH-stat alkalmazásával a pH-t állandóan tartják. A reakciót annak a meghatározásán keresztül követik, hogy az idő függvényében a készüléknek mennyi savat vagy bázist kell a reakcióterbe adagolnia ahhoz, hogy a pH állandó maradjon.

A kezdeti sebesség folyamatos méréssel történő meghatározásának elvét a 9.3. ábra baloldalon lévő grafikonja illusztrálja. A reakciót vagy az enzim, vagy a szubsztrát bemérésével indítjuk, és az oldat gyors összekeverését követően haladéktalanul elkezdjük a mérést. A mérés során természetesen csökken a szubsztrát koncentrációja. Ezzel kapcsolatban arra kel törekedni, hogy ez a csökkenés elhanyagolható mértékű legyen, hiszen a csökkenő szubsztrát koncentráció csökkenő sebességet eredményez, ahogy azt a 9.3. ábra baloldalon lévő grafikonok is mutatják. Ennek a nem kívánt effektusnak a mértéke ráadásul függ a szubsztrát koncentrációjától, ami a 9.3. ábra jobboldalon szereplő telítési görbéről is leolvasható. Jóval a K_M érték alatti szubsztrát koncentráció esetén az $[S]$ - V_0 függvény jó közelítéssel lineáris, míg jóval a K_M érték feletti szubsztrát koncentráció tartományban a V_0 csaknem független az $[S]$ értékétől. Ebből következik, hogy minél alacsonyabb szubsztrát koncentráción dolgozunk, arányaiban annál nagyobb sebességcsökkenést okoz azonos arányú (pl. 10%-nyi) szubsztrát koncentráció csökkenés. Jóval a K_M érték alatti szubsztrát koncentráció tartományban 10 %-os $[S]$ csökkenés ~ 10%-os V_0 csökkenést eredményez, míg jóval a K_M érték feletti tartományban ennél lényegesen kisebb mértékű a V_0 csökkenés. Általánosan elfogadott javaslat, hogy a kezdeti sebességet olyan módon kell megmérni, hogy a mérés időtartama alatt a szubsztrát koncentrációja 10%-nál kisebb mértékben csökkenjen. Ilyen feltétel mellett a mért kezdeti sebesség értéke 10 % alatti hibával lesz meghatározva.

A fő kinetikai paraméterek, tehát a V_{max} és a K_M értékek, meghatározásához különböző kezdeti szubsztrát koncentrációkon ($[S]$) mérjük meg a kezdeti sebesség értékeket. Amennyiben megfelelően választottuk meg a szubsztrát koncentráció tartományt, úgy a kezdeti sebesség értékeket a szubsztrát koncentráció függvényében ábrázolva a mérési pontok egy telítési görbére illeszkednek, ahogy azt a 9.3. ábra jobboldalon szereplő grafikonja illusztrálja.

A kinetikai paraméterek minél pontosabb meghatározásához a kezdeti szubsztrát koncentrációt széles határok között érdemes változtatni. Az $[S]$ értékével érdemes a ~ 0,2 K_M – 5 K_M tartományt legalább 8 mérési ponttal lefedni. Azt, hogy pontosan milyen koncentráció tartományban kell mérni, természetesen csak előzetes próbálkozások alapján lehet kideríteni, amelyek során becslést adhatunk a K_M értékére.

Miután a fent említett összefüggések figyelembevételével meghatároztunk egy sereg $[S]$ értékhez tartozó V_0 értéket, minden információ rendelkezésünkre áll ahhoz, hogy ezeknek az elsődleges mérési adatoknak az alapján meghatározzuk a fő kinetikai paramétereket, azaz a V_{\max} , a k_{cat} , és a K_M értékét.

Az első kinetikai vizsgálatokra még olyan korszakban került sor, amikor nem léteztek számítógépek, így az adatsorok kiértékelése lényegesen nagyobb problémát jelentett. A 9.3. ábra jobboldalán látható grafikon esetében az $[S] - V_0$ függvény egy telítési görbe. Pusztán vizuális kiértékeléssel természetesen nem lehet megállapítani, hogy ez az érték milyen maximális, tehát V_{\max} értékhez tart. Ugyanilyen okból azt sem lehet ilyen módon megállapítani, hogy a $V_{\max}/2$ értékhez tartozó szubsztrát koncentráció, amely megegyezik a K_M értékével, mekkora. Számítógépek hiányában a hiperbolához való illesztés igen nehézkes volt.

Az ilyen nem lineáris összefüggések kiértékelésére, tipikus megoldásként a következő eljárást vezették be. A mért adatokra vonatkozó összefüggés egyenletét úgy alakították (transzformálták) át, hogy annak formája lineáris legyen, vagyis a származtatott adatok grafikus ábrázolásakor a pontok egyenesre essenek. Így a probléma leegyszerűsödött egy egyenes illesztési feladatra, amelyet számítógép nélkül is el lehetett végezni. A kinetikai paraméterek meghatározására ma már nem ezt a módszert alkalmazzák, mégis fennmaradt ez az eljárás, mert mint a későbbiekben látni fogjuk, enzim gátlások esetén a linearizált egyenletek grafikonjai világosan megmutatják, hogy a vizsgált inhibitor milyen mechanizmussal gátolja az enzimet.

A Michaelis-Menten kinetika 9.44 szám alatt szereplő egyenletének legelterjedtebb linearizálását Hans Lineweaver és Dean Burk vezette be. Az általuk javasolt transzformálás a róluk elnevezett Lineweaver-Burk egyenlethez vezet (9.52 egyenlet). A transzformálás a következőképpen történik.

Vesszük a 9.44 egyenlet mindkét oldalának reciprokát, ami a 9.50 egyenlethez vezet.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} [S]} \quad (9.50)$$

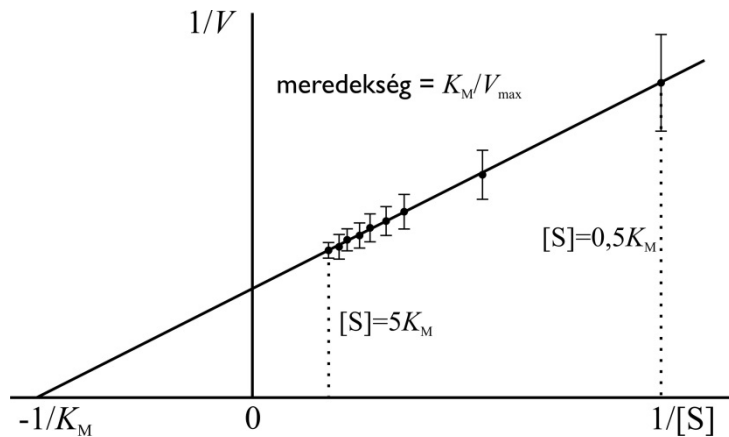
A 9.51 egyenletet úgy kapjuk, hogy felbontjuk a 9.50 egyenlet jobboldalán szereplő tört számlálóját.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]} \quad (9.51)$$

Ekkor a 9.51 egyenlet jobboldalán lévő második tagban szereplő törtet egyszerűsíteni lehet, ami a 9.52 egyenlethez vezet.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (9.52)$$

Az ehhez az egyenlethez tartozó grafikon nem más, mint a 9.3. ábra jobboldali részén található grafikon „kettős reciprok” formája. Míg ott a V_0 értékeket ábrázoltuk az $[S]$ függvényében, itt az $1/V_0$ értékeket ábrázoljuk a $1/[S]$ függvényében. Mint ahogy azt a **9.5. ábra** is illusztrálja, a 9.52 egyenlet grafikonja egy egyenes.



9.5. ábra. Lineweaver-Burk féle kettős reciprok ábrázolás.

Az egyenes általános egyenlete, $Y=a*X+b$ szerint itt $Y=1/V_0$; $X=1/[S]$; $a=K_M/V_{max}$ és $b=1/V_{max}$. Az egyenes meredeksége, „a” (ami nem más, mint az egyenes X-tengellyel bezárt szögének tangense) tehát megadja a K_M/V_{max} értéket, az Y tengely metszete (ahol X, tehát $1/[S]$ értéke 0) megadja az $1/V_{max}$ értéket, míg az X-tengely metszete, (ahol Y, tehát $1/V_0$ értéke 0) megadja a $-1/K_M$ értéket.

A meredekség, és bármelyik tengelymetszet alapján tehát mind a V_{max} , mind a K_M érték meghatározható. Ez a megoldás ugyan elegánsan egyszerű, de az ezzel az eljárással történő kiértékelés komoly hibákhoz vezethet. A kettős reciprok ábrázolásban a legkisebb szubsztrát koncentrációkhoz tartozó legkisebb, ezért óhatatlanul a legnagyobb mérési hibával meghatározott, kezdeti sebességadatok reciprokai lesznek a legnagyobb számértékű mérési adatok. Így ezek befolyásolják legnagyobb mértékben az illesztett egyenes paramétereit. Emiatt mind a K_M , mind pedig a V_{max} így meghatározott értéke pontatlan lehet.

A számítógépek elterjedésével új megoldás született az adatok kiértékelésére. Ez a nem-lineáris regresszió. Ennek során az elsődleges, $[S] - V_0$ adatsorhoz illesztünk megfelelő szoftver alkalmazásával a 9.44 egyenletnek megfelelően derékszögű hiperbolát. A program egy algoritmus alapján iteratív módon megkeresi azt a V_{max} ; K_M adatpárt, amelyek 9.44 egyenletbe történő behelyettesítésével kapott függvényre a mérési pontok a legkisebb eltéréssel illeszkednek.

A legtöbb kiértékelő program igényli, hogy megadjunk egy-egy V_{max} illetve K_M értéket, amellyel elindítja az iteratív optimumkeresést. Amennyiben tudjuk, hogy a mérés során mekkora volt a bemért enzim $[E]_T$ koncentrációja, úgy a kiértékelés során kapott V_{max} érték ismeretében a 9.43 egyenlet alapján a V_{max} értéket az $[E]_T$ értékével elosztva megkapjuk az átviteli számot, vagyis a k_{cat} értékét is.

Érdemes megjegyezni, hogy amennyiben csak a k_{cat}/K_M hányadost, tehát a katalitikus hatékonyságot kívánjuk megmérni, úgy az közvetlenül, akár egyetlen méréssel is meghatározható. A 9.48 egyenlethez vezető gondolatmenet alapján amennyiben a V_0 értéket a K_M értékénél nagyságrendekkel alacsonyabb szubsztrát koncentráción határozzuk meg ismert $[E]_T$ bemérési enzim koncentráción, úgy a 9.48 egyenlet alapján a k_{cat}/K_M hányados közvetlenül meghatározható. Ezt a fajta mérést azonban csak olyan enzim-szubsztrát pároknál lehet elvégezni, amelyeknél a keletkező termék nagyon nagy érzékenységgel mérhető, hiszen nagyon alacsony szubsztrát koncentráción mérve nagyon alacsony termék koncentrációkat kell pontosan meghatározni az idő függvényében.

9.4. Enzimgátlási típusok

Az enzimek központi szerepet játszanak az életfolyamatokban. A legtöbb enzim esetében igaz, hogy annak működésére csak bizonyos körülmények között van szükség, és amikor ezek a körülmények megszűnnek az enzim aktivitása felesleges, vagy akár káros is lehet. Ennek megfelelően a legtöbb enzim aktivitása szabályozás alatt áll. Ez a szabályozás rendkívül sok szinten megtörténhet, kezdve az enzim génjének transzkripció szabályozásától egészen az enzim szabályozott lebontásáig. Ebben a fejezetben kizárólag olyan reverzibilis, nem kovalensen kötődő inhibitorok eseteit vesszük sorra, amelyek az enzimek a szubsztrát kötését és/vagy katalitikus apparátusának működését gátolják. Az ilyen gátlószerek mechanizmusa három fő csoportba osztható: kompetitív, unkompetitív és kevert típus. Az utóbbi további két altípusra, a nonkompetitív és vegyes típusú gátlásokra osztható.

Azt, hogy egy adott gátlószer melyik típusba tartozik, kinetikai mérésekkel meg lehet határozni.

Az ilyen méréseknél a leggyakrabban úgy járunk el, hogy különböző, egy-egy kísérletben állandóan tartott bemérési inhibitor koncentráció mellett a 9.3 fejezetben leírt módon meghatározzuk a V_{\max} és K_m kinetikai paramétereket. Amennyiben a mérési adatokat a Lineweaver-Burk féle kettős reciprok ábrázolásban értékeljük ki, a kapott egyeneseknek a gátlóatlan reakcióra vonatkozó egyenestől való eltérése fényt derít arra, hogy az inhibitor melyik gátlási típus szerint működik.

9.4.1. Kompetitív gátlás

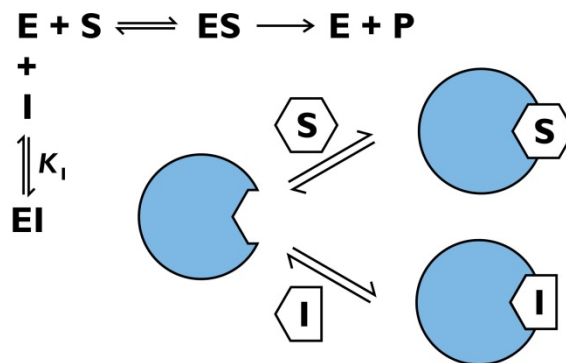
A kompetitív (versengő) inhibitorok versengenek a szubsztráttal az enzim szubsztrátkötő helyéért, mivel az inhibitor és a szubsztrát egymással átfedő (részben, vagy egészen megegyező) kötőhelyre kötődnek. Hármass komplex, tehát olyan, amelyben az enzimhez egyidejűleg a gátlószer és a szubsztrát is kötődne, nem jöhet létre. A kompetitív inhibitorral éppen komplexet alkotó enzim tehát tökéletesen inaktív.

Egyfajta köznyelvi kifejezéssel élve a kompetitív inhibitorok esetében gyakran úgy fogalmazzuk, hogy azok mintegy „leszorítják”, vagy „kiszorítják” a szubsztrátot az enzim kötőhelyéről. Ezek a szemléletesnek szánt kifejezések sajnos éppenséggel félrevezetőek. Szó sincs ugyanis arról, hogy az inhibitor az ES komplexhez kötődve valamilyen módon aktívan „kitúrná” a szubsztrátot az enzim kötőzsebéből. Ez már csak azért sem lehetséges, mert hármass komplex, mint említettük, itt nem alakul ki. Pusztán arról van szó, hogy két kötési egyensúly alakul ki párhuzamosan. A koncentrációviszonyoknak megfelelően az oldatban kialakul egy enzim – inhibitor kötődésre vonatkozó egyensúly, valamint egy enzim – szubsztrát kötődésre vonatkozó egyensúly. (Ez utóbbi a szubsztrát átalakítása miatt nem valódi egyensúly, hanem helyesebben megnevezve egy stacionárius állapot, lásd 9-4. ábra).

Az enzim és az inhibitor között kialakuló egyensúlyt a 9.53 egyenlet írja le, ahol a K_i egy disszociációs állandónak felel meg.

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (9.53)$$

A két egyensúly egymástól nem független, hiszen az azokban kialakuló ES és EI komplexek ugyanazzal a szabad E enzimmel tartanak egyensúlyt. Az inhibitor koncentráció növelésével az EI koncentráció növekedése csak az ES koncentráció csökkenésével valósulhat meg, és fordítva, a szubsztrát koncentráció növelése csak az EI komplex koncentrációjának rovasára növelheti az ES komplex koncentrációját. Ezt a mechanizmust a 9.6. ábra szemlélteti.



9.6. ábra. A kompetitív gátlás sémája.

A Michaelis – Menten egyenlet levezetésénél felhasználtuk azt a tényt, hogy a teljes enzimkoncentráció felírható a szabad enzim koncentrációjának és a szubsztráttal alkotott komplexben lévő enzim koncentrációjának az összegeként: $[E]_T = [E] + [ES]$. Kompetitív inhibitor jelenlétében azonban $[E]_T = [E] + [ES] + [EI]$. Amennyiben ennek az eltérésnek a figyelembevételével vezetjük le a Michaelis - Menten egyenletet, úgy egy itt részleteiben nem bemutatott levezetés végén a 9.54 egyenlethez jutunk.

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{(\alpha K_M + [S])} \quad (9.54)$$

A 9.54 egyenletben szereplő α jelentését a 9.55 egyenlet tartalmazza.

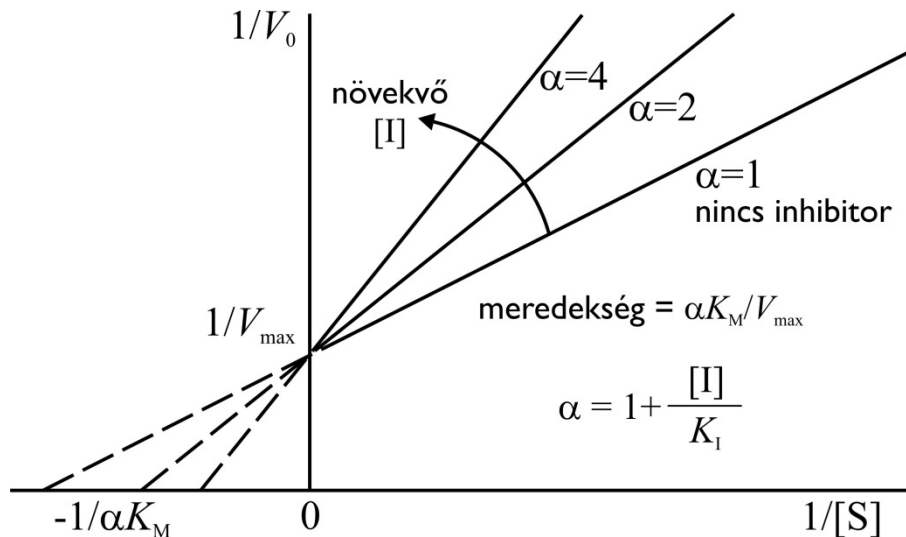
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad (9.55)$$

Jól látható, hogy inhibitor hiányában az α értéke 1, tehát visszakapjuk az eredeti egyenletet, míg inhibitor jelenlétében az α értéke egy egynél nagyobb szám. Minél nagyobb mértékben haladja meg az inhibitor koncentrációja a K_I disszociációs állandó értékét, annál nagyobb az α értéke. A 9.54 egyenlet világosan jelzi, hogy amennyiben a kinetikai paramétereket kompetitív inhibitor jelenlétében határozzuk meg, úgy az így kapott V_{\max} érték megegyezik majd az inhibitor távollétében zajló kísérletekből kapott értékkel, míg a K_M értéke magasabb lesz, mint inhibitor hiányában. Mivel ennél a gátlási típusnál az inhibitor verseng a szubsztráttal, intuitíven belátható, hogy kellően magas, „végtelen” szubsztrát koncentráción az inhibitor jelenléte elhanyagolható lesz, tehát a V_{\max} érték nem módosul, ugyanakkor a fél-maximális sebességhez tartozó szubsztrát koncentráció, amely megadja a K_M számértékét, magasabb lesz, mint inhibitor hiányában. A 9.54 egyenlet éppen ezt fejezi ki.

Amennyiben a kettős reciprok ábrázoláshoz átrendezzük a 9.54 egyenletet, a 9.52 egyenlet párjaként a 9.56 egyenlethez jutunk.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (9.56)$$

Az ehhez tartozó, a **9.7. ábrán** bemutatott grafikon világosan mutatja, hogy inhibitor jelenlétében a kettős reciprok ábrázolásban a gátolatlan esethez képest nagyobb meredekségű egyeneseket kapunk, de az Y-tengely metszete nem változik. A grafikon jól mutatja a kettős reciprok ábrázolás előnyét abban, hogy látványosan jelzi, milyen gátlási mechanizmusba tartozik az inhibitor.



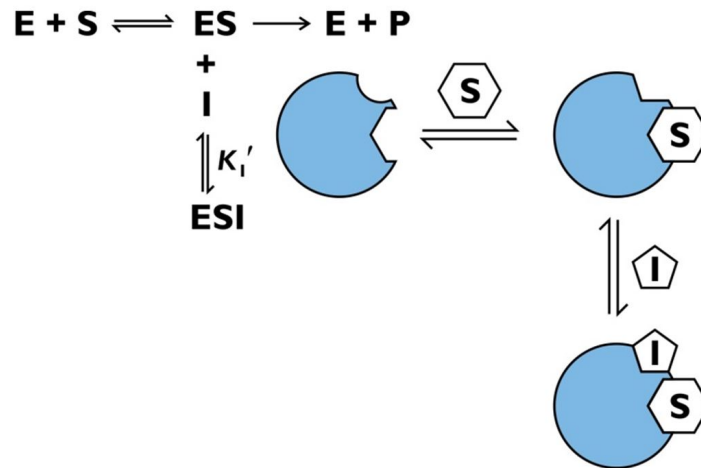
9.7. ábra. Kompetitív gátlás Lineweaver-Burk féle kettős reciprok ábrázolása.

Mivel azonos kötőhelyért versenyeznek, nem meglepő, hogy a kompetitív inhibitorok szerkezetükben, polaritás mintázatukban rendszerint hasonlítanak a szubsztráthoz. Ezen tulajdonságuk miatt kiválóan alkalmasak az enzim szubsztrátkötő mechanizmusának vizsgálatára. Számos kompetitív inhibitor és a szubsztrát szerkezetének összehasonlításával gyakran kikövetkeztethető, hogy az enzim a szubsztrátnak mely csoportjain keresztül létesít az ES komplexben kapcsolatot. Ez az indirekt megközelítés azért releváns, mert a csak rövid ideig létező, átmeneti jellegű ES komplex térszerkezetét igen nehéz közvetlenül meghatározni.

Érdekességként megemlítendő, hogy metanol mérgezés esetén azért adnak a páciensnek etanolt, mert az etanol egyfajta kompetitív inhibitorként (pontosabban versengő szubsztrátként) működik. Az alkohol dehidrogenáz enzimnek mindkét alkohol a szubsztrátja. Az enzimreakció során a metanolból formaldehid keletkezik, ami a metanolnál lényegesen mérgezőbb. Az etanol jobb szubsztrátja az enzimnek, így metanol adásával az érhető el, hogy időegység alatt kevesebb metanol alakuljon formaldehiddé. A szervezet így időt nyer arra, hogy a metanol egy részét még annak átalakulása előtt kiválasszthassa.

9.4.2. Unkompetitív gátlás

Olyan inhibitorok is ismertek, amelyek kizárólag az ES komplexhez kötődnek, a szabad enzimhez nem. Ezt a kölcsönhatási sémát a 9.8. ábra mutatja.



9.8. ábra. Az unkompetitív gátlás sémája.

Ennél a gátlási típusnál a kinetikai egyenlet a 9.57 egyenlet szerint módosul.

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{(K_M + \alpha' [S])} \quad (9.57)$$

A kölcsönhatási sémában jelzett K_1' jelentését a 9.58 egyenlet mutatja.

$$K_1' = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (9.58)$$

A 9.57 egyenletben szereplő α' jelentése a 9.55 egyenletben szereplővel analóg, és a 9.59 egyenlet mutatja.

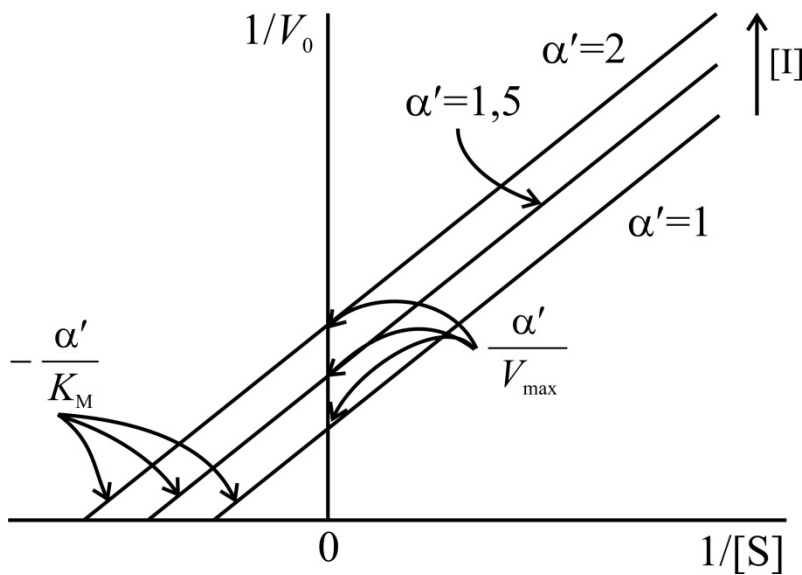
$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_1'} \quad (9.59)$$

A 9.57 egyenlet kettős reciprok átalakítása a 9.60 egyenletet eredményezi.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}} \quad (9.60)$$

A 9.60 egyenlethez tartozó grafikon a 9-9. ábrán szerepel.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

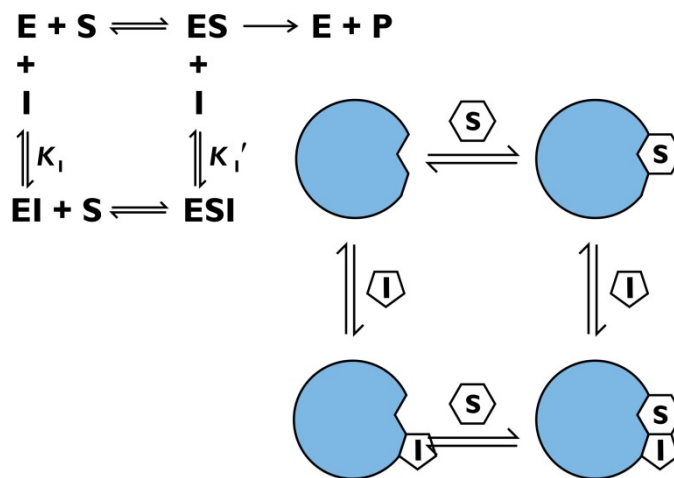


9.9. ábra. Unkompetitív gátlás Lineweaver-Burk féle kettős reciprok ábrázolása.

A grafikon elemzéséből látható, hogy mind a K_M , mind a V_{\max} értékek el vannak osztva α' értékével (tehát a reciprokok meg van szorozva α' értékével). Ez azt jelenti, hogy az inhibitor jelenlétében – szemben a kompetitív inhibitorokkal -, az eredetinél alacsonyabb maximális sebesség érhető el, és amilyen arányban csökken ez a V_{\max} érték, ugyanolyan arányban csökken a fél-maximális sebességhez tartozó szubsztrát koncentráció, azaz a K_M értéke is. Mivel mindkét kinetikai paraméter azonos arányban csökken, a hányadosuk értéke, tehát az egyenesek meredeksége nem változik. Megemlítendő, hogy, bár ez a gátlás is reverzibilis, az unkompetitív gátlószer hatása nem függeszthető fel a szubsztrát-koncentráció növelésével.

9.4.3. Vegyes típusú gátlás

A két említett gátlási típus egyfajta kombinációjaként olyan gátlószerek is léteznek, amik mind a szabad enzimhez, mind pedig az ES komplexhez képesek kötődni. Ennek a kevert típusú gátlásnak az általánosabb alosete a vegyes típusú gátlás. Ennek sémáját a 9.10. ábra mutatja.



9.10. ábra. Vegyes típusú gátlás sémája.

Ahogy azt a kölcsönhatási séma mutatja, a gátlószer nem azonos affinitással kötődik a szabad, illetve az ES komplexben lévő enzimhez.

Az ebből a sémából eredő egyenletek is a korábbi sémák kombinációjaként következnek. A kinetikai egyenletet a 9.61 egyenlet mutatja.

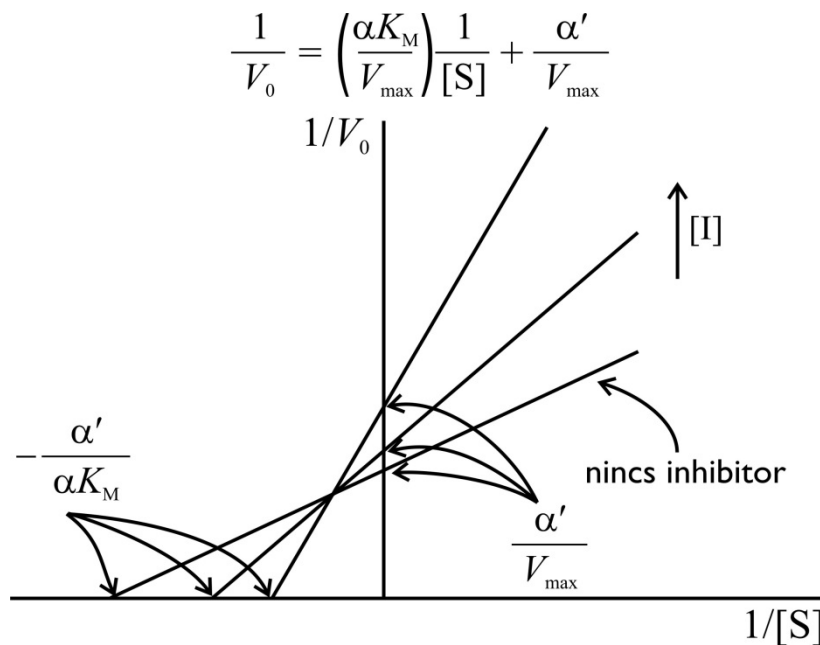
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{(\alpha K_M + \alpha' [S])} \quad (9.61)$$

Ennek kettős reciprok átalakítása a 9.62 egyenletet eredményezi.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}} \quad (9.62)$$

Az α és α' jelentése megegyezik azzal, amit a kompetitív illetve az unkompetitív inhibitoroknál láttunk.

A kettős reciprok függvényhez tartozó grafikus ábrázolást a **9.11. ábra** illusztrálja.



9.11. ábra. Vegyes típusú gátlás Lineweaver-Burk féle kettős reciprok ábrázolása.

Kettős reciprok ábrázolásban tehát mindhárom gátlási típushoz jellegzetesen eltérő grafikon tartozik.

Megjegyzendő, hogy a kevert típusú gátlás egy – inkább csak elméletben létező variánsa a non-kompetitív gátlás. Ez egy olyan eset, amikor az inhibitor azonos affinitással kötődik a szabad enzimhez és az ES komplexhez. Ekkor kétféle α érték helyett is csak egyetlen szerepel, így belátható, hogy a 9-11. ábrán szereplő grafikon úgy módosul, hogy a különböző inhibitor koncentrációkhoz tartozó egyenesek az X-tengelyt mind egy pontban metszik (hiszen a $-1/K_M$ szorzója $\alpha / \alpha=1$), míg az Y-tengely metszetek rendre az α / V_{\max} értékekre esnek.

Az egyes típusok esetében az α , illetve α' értékek természetesen az egyenletek, illetve grafikonok alapján meghatározhatók, és ezeken keresztül a megfelelő gátlási állandók is kiszámíthatóak.

10. fejezet - Géntechnológia

szerző: Kovács Mihály

10.1. Rekombináns DNS technikák (géntechnológia) és molekuláris klónozás

A rekombináns DNS (molekuláris klónozási) technikák módját adnak adott DNS-szakaszok (pl. gének) mennyiségi felszaporítására (amplifikációjára), szekvenciájának meghatározására, megváltoztatására, funkcióinak vizsgálatára illetve az általuk kódolt termékek (RNS-molekulák, fehérjék) kifejezésére, előállítására, vizsgálatára. A DNS-molekulák felszaporítása (amplifikációja) alapvetően kétféle módon történhet:

a) Rekombináns DNS-konstrukciók előállításával, amelyek lehetővé teszik a klónozott DNS-szakasz valamely gazdaszervezetben történő *in vivo* felszaporítását. A klónozás folyamata során egy sejt által felvett egyetlen (vagy kis számú) DNS-molekula felszaporítása történik a sejtek szaporítása (osztódása) révén. A rekombináns DNS-konstrukciók a klónozni kívánt DNS-szakasz (inszert) és a választott gazdaszervezetben történő felszaporításhoz szükséges vektor (hordozó) DNS összekapcsolásával jönnek létre. Az alábbi (10.2-10.6) fejezetek a rekombináns DNS-konstrukciók tervezésének, előállításának, amplifikációjának és vizsgálatának elvi alapjait foglalják össze.

b) Adott DNS-szakaszok *in vitro* amplifikációjával, polimeráz láncreakció (*polymerase chain reaction*, PCR) révén. A PCR leírására a 10.7 fejezetben kerül sor.

A rekombináns DNS technikák a korszerű biológiai és orvostudományi kutatás, valamint a biotechnológián alapuló ipar szinte valamennyi ágazatában nélkülözhetetlenek. Az alábbiakban felsorolunk néhány példát e technikák felhasználási területeire.

a) DNS- vagy RNS-molekulák, gének illetve teljes genomok szekvenciájának, szerveződésének vizsgálata, módosítása;

b) A gének által kódolt fehérjemolekulák (közvetve az azok által létrehozott anyagcsere-termékek) szerkezetének, szekvenciájának és funkciójának vizsgálata és módosítása (fehérjemérnökség, fehérjetervezés, *protein engineering*);

c) Génkifejeződési mintázatok térbeli (sejt-specifikus és szövet-specifikus) és időbeli vizsgálata;

d) Jelátviteli folyamatok, rákos (malignus) transzformáció, élettani folyamatok, örökletes és fertőző betegségek mechanizmusának felderítése, diagnosztikája;

e) Fejlődésbiológiai, evolúciobiológiai, ökológiai, környezettudományi kutatások;

f) Mezőgazdasági, energiaipari alkalmazások;

g) Fehérjék, gyógyszerek, vakcinák, hormonok ipari léptékű előállítása;

h) Transzgénikus élőlények előállítása kutatási vagy ipari célokra;

i) Génterápia (kiesett génfunkciók helyreállítása);

j) Minta-, eredet- és egyedazonosítás, törvényszéki vizsgálatok.

10.2. Plazmid vektorok

A plazmidok számos baktériumfajban megtalálható, extrakromoszomális, kétszálú, gyűrűbe záródó (cirkuláris) DNS-molekulák. Eredeti formájukban méretük 1 és 200 kilobázispár (kbp) között van. A plazmidok gyakran tartalmaznak olyan géneket, amelyek a gazdasejt számára valamilyen szelekciós előnyt biztosító enzimeket kódolnak. Ilyen előny lehet egyes antibiotikumok elleni rezisztencia; más esetekben éppen speciális antibiotikumok, esetleg különböző toxinok szintézise. Egyes restriktív-modifikációs rendszerek enzimeit szintén plazmidban kódolták.

A rekombináns DNS technikákban leggyakrabban az *Escherichia coli*-t (*E. coli*) 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 (pl. DNS polimeráz I, DNS polimeráz III). A replikáció kezdőpontját a replikációs origó jelöli ki. A replikációs origó környékén található szekvenciák szabályozzák a plazmid sejtenkénti kópiaszámát. Ezt a régiót a replikációs origóval együtt replikonnak nevezzük. A ma használatos plazmid vektorok replikációja független a sejtsztódástól, ún. relaxált kontroll alatt áll. Ezt például a pMB1 plazmidban megtalálható pMB1 replikon képes biztosítani. Az eredeti szekvenciájú pMB1 replikont tartalmazó vektorok kópiaszáma sejtenként 15-20.

Az *E. coli*-ban több különböző replikon-szekvenciát is találtak (pl. ColE1, p15A, pSC101). Két különböző szekvenciájú, különböző típusú replikont tartalmazó (kompatibilis) plazmid egymás mellett stabilan fenntartható ugyanabban a sejtben. Az azonos replikációs origót hordozó plazmidok azonban egymással inkompatibilisak: ezekből csak egyféle tartható fenn egy adott sejtben.

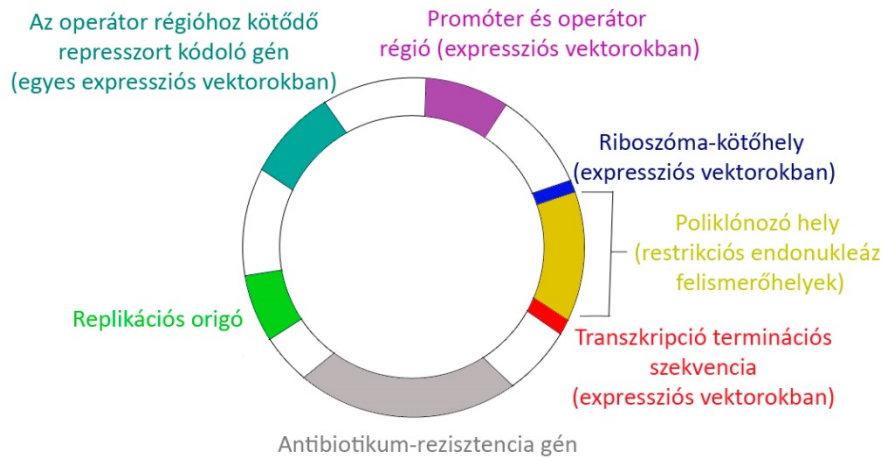
Mint ahogy a plazmidok replikációja nem függ fehérjék expressziójától (a szükséges enzimek hosszú életidejűek a sejtben), a gazdasejt fehérjeszintézisének kloramfenikollal történő gátlásával el lehet érni, hogy a sejt ne legyen képes a kromoszomális DNS-ét replikálni, de a plazmid szintézise tovább folyjék. Ezzel az eljárással tovább növelhető a plazmidok sejtenkénti kópiaszáma.

A felhasználás szempontjai szerint a vektorként (hordozó DNS-ként) alkalmazott plazmidokat két csoportra oszthatjuk. Beszélünk klónozó és expressziós vektorokról. A klónozó vektorok a beépített idegen DNS-szakasz vizsgálatát és manipulációját teszik lehetővé. Az expressziós vektorok olyan DNS-szekvenciákat is tartalmaznak, melyek lehetővé teszik a beépített idegen DNS-szakasz transzkripcióját és translációját.

A gyakorlatban felhasznált első, főként klónozásra használt vektorok a pMB1 replikon mellett több szelektív markert tartalmaztak. Ilyen vektor például a pBR322, melyben ampicillin-rezisztenciagén és tetraciklin-rezisztenciagén 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 forduljon elő a molekulában. Így lehetővé vált ezen enzimek használata a fenti plazmidok adott helyen történő egyszeri hasítására.

Az alábbiakban felsoroljuk a plazmid vektorok fejlesztése során figyelembe vett legfontosabb szempontokat, illetve a hatékony alkalmazásukat biztosító legfontosabb funkcionális DNS-szakaszokat (**10.1. ábra**).

- a) A plazmid méretének csökkentése. Kisebb plazmidba nagyobb idegen DNS-szakaszok építhetők be. A méretcsökkentés általában együtt jár egyes nem-esszenciális gének (pl. több antibiotikus-rezisztenciagén egyikének) eliminálásával.
- b) A kópiaszám növelése. A pMB1 replikon szekvenciájának módosításával a kópiaszám 500-700-ra növekedett (pl. pUC vektorcsalád).
- c) Az inszert beépítése céljából felhasználható restriktív hasítási helyek számának növelése. Szintetikus oligonukleotid-szakaszok, ún. polilinkerek vagy más néven poliklónozó helyek (MCS, *multiple cloning site*) beépítésével egy rövid szekvencia-szakaszra húsznál több különböző enzim felismerőhelyét vitték be a legújabb típusú plazmidokba (pl. pBluescript, pGEM).
- d) Virális, nagy hatékonyságú RNS-promóter-szekvenciák (pl. T3, T7, vagy az SP6 bakteriofágokból származókat) beépítése a poliklónozó hely két oldalán. Ez az elrendezés lehetővé teszi, hogy a klónozott DNS-szakasról *in vitro* RNS-kópiát készítsünk.
- e) A génkifejeződéshez és fehérje-termelődéshez szükséges promóter, operátor, represszor-kötőhely, riboszóma-kötőhely illetve terminátor szekvenciák beépítése az expressziós vektorokba.
- f) Filamentes fágok (pl. M13) replikációs origóját beépítése, ami *in vivo* egyszálú DNS-kópia termelését teszi lehetővé. Ezek az egyszálú DNS szekvenáláshoz és irányított mutagenézishez használhatók fel.



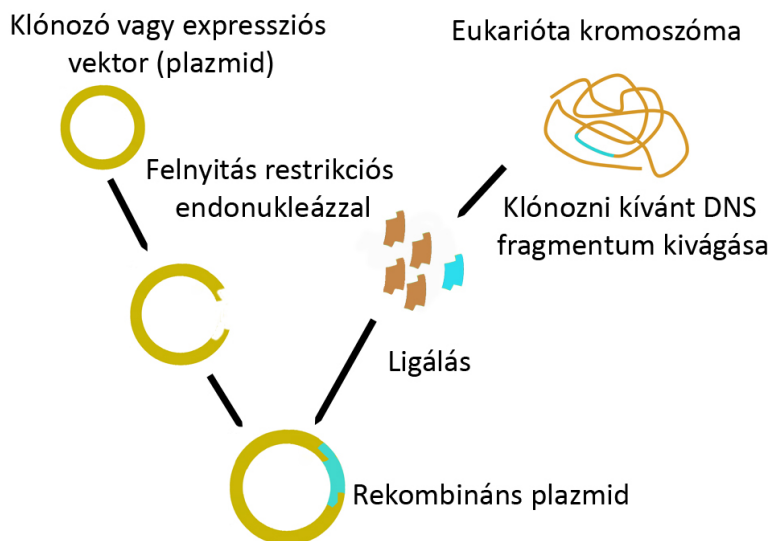
10.1. ábra. Plazmid vektor térképe.

10.3. Rekombináns DNS-konstrukciók elkészítése

A rekombináns DNS-konstrukciók elkészítésének lényegi eleme a klónozni kívánt DNS-szakasz (inszert) a vektor DNS-ébe történő beépítése. A klónozni kívánt inszert leggyakrabban valamely vizsgált szervezet genomi DNS-ének adott szakasza, vagy a vizsgált szervezet RNS-molekuláiról reverz transzkripcióval átírt cDNS (*complementary DNA*). A klónozni kívánt genomi DNS-szakaszt sok esetben a szervezet genomi DNS-ének restriktions endonukleázokkal történő fragmentálása és a fragmentumok izolálása révén állítják elő. cDNS klónozása esetén is gyakran szükség van annak restriktions enzimekkel történő hasítására (lásd alább).

A vektor DNS a rekombináns konstrukció gazdasejtben történő replikációját teszi lehetővé. Megjegyzendő, hogy a 10.2 fejezetben bemutatott plazmid vektorokon kívül más eredetű vektorok (pl. virális vektorok, mesterséges kromoszómák) is használatosak, amelyekkel a jelen fejezet keretei között nem foglalkozunk.

Az inszert és vektor DNS-molekulák megfelelő összekapcsolására leggyakrabban restriktions endonukleázok általi enzimatis hasítást, majd DNS-ligázzal történő összekapcsolást alkalmaznak (**10.2. ábra**).



10.2. ábra. Inszert beépítése plazmid vektorba.

A restriktív endonukleáz enzimek közül a klónozási műveletekhez a II. típusú enzimek a legalkalmasabbak, amelyek rövid (általában 4-8 bázispár (bp)) és specifikus felismerőhellyel rendelkeznek, és a felismerőhelyen belül vagy annak közelében, specifikus helyen hasítják a DNS-szálakat. A **10.3. ábrán** megfigyelhető, hogy egyes enzimek 5'-, mások 3'-egyszálú DNS-en túlnyúló végeket (*overhang*) generálnak, míg megint más enzimek tompa (*blunt*) DNS-végeket hoznak létre.

Endonukleáz	Hasítási helyek	Hasítási termékek
BamHI	$ \begin{array}{c} 5' \text{ G} \mid \text{GATCC} \text{ 3'} \\ 3' \text{ CCTA} \mid \text{GG} \text{ 5'} \\ \text{Hasítás helye} \end{array} $	$ \begin{array}{cc} \text{G 3'} & 5' \text{ GATCC} \\ \text{CCTAG 5'} & 3' \text{ G} \\ \text{Túlnyúló vég} \end{array} $
EcoRI	$ \begin{array}{c} 5' \text{ GAATTC} \text{ 3'} \\ 3' \text{ CTTAAG} \text{ 5'} \\ \text{Palindrom szekvencia} \\ \text{Szimmetria-középpontja} \end{array} $	$ \begin{array}{cc} \text{G 3'} & 5' \text{ AATTC} \\ \text{CTTAA 5'} & 3' \text{ G} \end{array} $
HaeIII	$ \begin{array}{c} 5' \text{ GG} \mid \text{CC} \text{ 3'} \\ 3' \text{ CC} \mid \text{GG} \text{ 5'} \\ \text{Hasítás helye} \end{array} $	$ \begin{array}{cc} \text{GG 3'} & 5' \text{ CC} \\ \text{CC 5'} & 3' \text{ GG} \\ \text{Tompá vég} \end{array} $
HhaI	$ \begin{array}{c} 5' \text{ GCG} \mid \text{C} \text{ 3'} \\ 3' \text{ C} \mid \text{GCG} \text{ 5'} \\ \text{Hasítás helye} \end{array} $	$ \begin{array}{cc} \text{GCG 3'} & 5' \text{ C} \\ \text{C 5'} & 3' \text{ GCG} \end{array} $
XhoI	$ \begin{array}{c} 5' \text{ CTCGAG} \text{ 3'} \\ 3' \text{ CAGCT} \mid \text{C} \text{ 5'} \\ \text{Hasítás helye} \end{array} $	$ \begin{array}{cc} \text{C 3'} & 5' \text{ TCGAG} \\ \text{CAGCT 5'} & 3' \text{ C} \end{array} $

10.3. ábra. Restriktív endonukleázok felismerő- és hasítóhelyei.

Két, egymással komplementer DNS-túlnyúlást (ún. „ragadós végeket”, *sticky ends*) tartalmazó DNS-szakasz végei egymással bázispárosodásokat képesek alkotni. Az ilyen túlnyúlásokat kompatibilis végeknek nevezzük. Az így összeállt végek DNS-ligáz enzim segítségével összekapcsolhatók (10.2. ábra). A DNS-ligáz enzim kovalens kapcsolatot alakít ki az egyik DNS-vég dezoxiribóz-egységének 3'-OH csoportja és a szomszédos DNS-molekula 5'-végének foszfátcsoportja között. A ragadós végekhez hasonlóan két tompa DNS-vég is összekapcsolható a DNS-ligáz enzim segítségével, így ezek is kompatibilis végeknek tekinthetők.

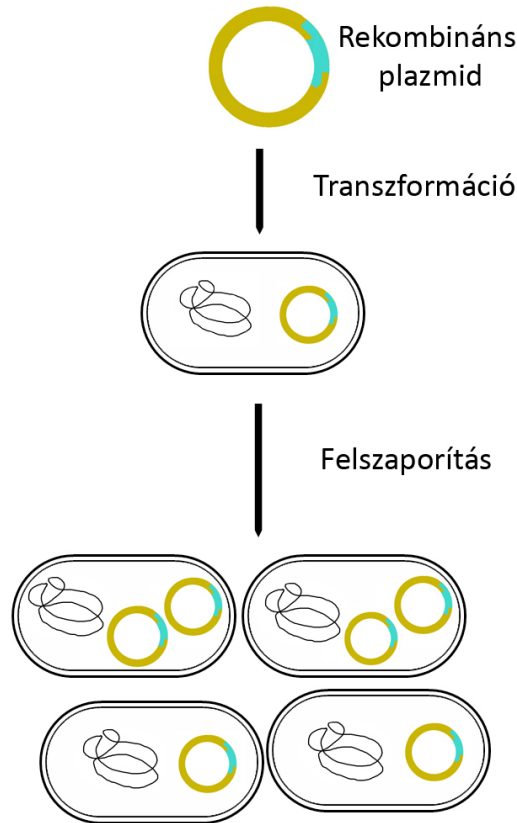
A fenti módon az egymással kompatibilis végeket tartalmazó inszert és vektor DNS-fragmentumok összekapcsolásával előáll a rekombináns DNS konstrukció (10.2. ábra). Ha a vektor fragmentum két vége egymással kompatibilis, akkor autoligáció révén „üres” (inszertet nem tartalmazó), nem-rekombináns cirkuláris vektormolekulák is létrejöhetnek. Az ilyen molekulák képződése (azaz az autoligáció) megelőzhető azzal, ha a felnyitott és izolált vektor-molekulákat a ligációs reakciót megelőzően foszfatáz enzimmel kezeljük, így eltávolítva azok 5'-foszfátcsoportjait. E csoportok híján a ligáz enzim nem lesz képes összekapcsolni egymással a vektor-DNS végeit.

10.4. A rekombináns DNS sejtbe juttatása és a rekombináns kolóniák azonosítása

Laboratóriumi körülmények között az izolált plazmidokat a transzformációnak nevezett folyamat során juttatjuk be a baktériumsejtekbe (10.4. ábra). A kísérletileg megfelelő transzformációs hatékonyság elérésére alapvetően kétféle módszer egyikét szokás alkalmazni:

- a) A baktériumsejtek a transzformációt megelőzően kétértékű kationok oldatával történő mosás útján "kompetenssé" tehetők. A plazmidokat ezek után a sejtekkel történő inkubálás és hő sokk alkalmazása révén juttatják be a sejtekbe.
- b) A plazmidok elektroporációval is bejuttathatók a sejtekbe. E művelet során rövid ideig elektrosokknak teszik ki a plazmiddal együtt inkubált sejteket.

A kompetencia – adott körülmények között definiálható – mértékét a transzformációt követően felnövő, plazmidot tartalmazó sejt kolóniák (cfu, *colony forming unit*) számával szokás jellemezni, amelyet a transzformáció során felhasznált plazmid tömeg egységére adunk meg (jellemzően cfu/μg plazmid mértékegységben).



10.4. ábra. Plazmidok sejtbe juttatása és felszaporítása.

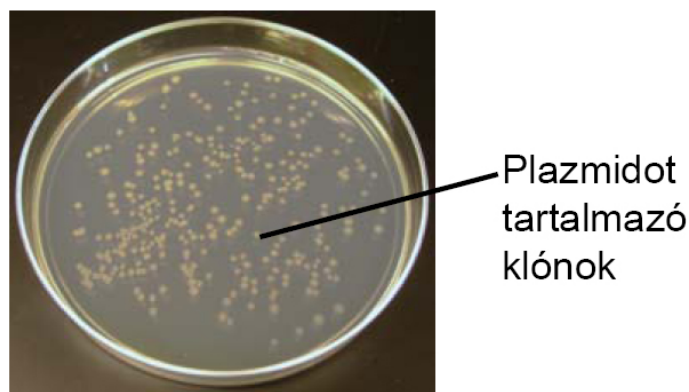
A transzformációt elősegítő fenti eljárások alkalmazása mellett is fennáll, hogy a baktérium-populációnak csak egy elhanyagolhatóan csekély hányada vesz fel stabilan plazmidot. A transzformált, azaz plazmidot tartalmazó sejtek azonosítását a plazmidon található szelekciós markergének teszik lehetővé (10.5. ábra). A leggyakrabban használt szelekciós markerek antibiotikum-rezisztenciát biztosítanak. A legelterjedtebben használt antibiotikumok és az azokat inaktiváló enzimek a következők:

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

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

c) 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, és acetil-koenzim A segítségével acetilálja a kloramfenikolt. A módosított kloramfenikol nem kötődik a riboszómához.

A transzformált baktériumokat a plazmid rezisztencia génjétől függően antibiotikumot tartalmazó agarlemezre szélesztik. Az agarlemezen csak a vektort felvevő, rezisztens baktériumok képesek kinőni. Ideális esetben az agarlemezen baktérium-kolóniákat figyelhetünk meg: teoretikusan egy kolóniában egy – a vektort felvevő – baktériumsejt leszármazottai (klónjai) találhatóak meg.



10.5. ábra. Plazmidot tartalmazó baktérium-kolóniák antibiotikum-tartalmú agarlemezen.

A plazmidot tartalmazó baktériumsejtek szelekcióját követő lépés a rekombináns, azaz az inszertet tartalmazó plazmidot hordozó sejt kolóniák azonosítása. Ennek legelterjedtebb módozatai a következők:

a) Inszerciós inaktiváció: ha az idegen DNS-szakaszt (inszertet) az antibiotikum-rezisztenciagénbe illesztjük, akkor a sikeres inszerció a megfelelő rezisztencia elvesztését eredményezi. A rekombináns sejt kolóniák azonosítása ezzel a módszerrel kissé nehézkes, mert az csak replika technika alkalmazásával valósítható meg.

b) α -komplementáció („kék-fehér szelekció”): Számos vektor tartalmazza az *E. coli lac* operonjának egy szakaszát, amely az operátor régióból és a β -galaktozidáz enzim első kb. száz aminosavát (az ún. α -peptidet) kódoló részből tevődik össze. Az enzimnek ez a szakasza, amelynek szintézisét izopropil-tio- β -D-galaktoziddal (IPTG) indukálni lehet, képes a gazdasejt genomjában lévő, első száz aminosavától megfosztott β -galaktozidáz enzim aktivitásának intraallélikus (α -) komplementálására. A módosítatlan vektort tartalmazó baktériumsejtek IPTG-indukció hatására az enzim mindkét fragmentumát szintetizálják, ami azt eredményezi, hogy 5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galaktozid (X-gal) kromogén szubsztrát jelenlétében kék színű telepeket adnak. Az α -komplementációra alkalmas vektorokba a poliklónozó helyet az α -peptidet kódoló régióba építették be. Idegen DNS-szakasz (inszert) bevitele így elrontja az α -peptidet kódoló részt, és megszünteti az α -komplementációt. A rekombináns plazmidot tartalmazó sejtek így fehér kolóniákat adnak, míg az inszertet nem tartalmazó plazmidot hordozó sejtek kék színű telepeket alkotnak.

c) A plazmidot tartalmazó kolóniákat DNS-szintézis templákként használva polimeráz lánreakció (10.7 fejezet) segítségével is azonosíthatók a rekombináns baktérium-kolóniák.

d) A kolóniákból izolált plazmid DNS restrikciós emésztéses mintázatának DNS agaróz gélelektroforézises vizsgálata révén az inszert beépülése a vektorba szintén egyszerűen ellenőrizhető.

e) Az inszert beépülése a kolóniákból izolált plazmid DNS szekvenálásával is vizsgálható.

10.5. Plazmid DNS izolálása

A különböző plazmid DNS-izolálási technikák három alapvető munkafázisra oszthatók:

- A baktérium-tenyészet növesztése,
- a baktériumsejtek összegyűjtése és lízise,
- a plazmid DNS tisztítása.

A plazmid DNS *in vivo* amplifikációjához leggyakrabban felhasznált bakteriális gazdasejtek egyike az XL1-Blue, amely az *E. coli* K12 törzsből kifejlesztett, plazmidokkal rendkívül jól transzformálható, az α -komplementáció analízist lehetővé tevő, a filamentes fágok által is fertőzhető sejt vonal. Az izolálni kívánt DNS mennyiségétől függően különböző tápoldat-térfogatban növeszthetők fel a baktériumsejtek, rázatott kultúrában, a megfelelő szelekciót biztosító antibiotikum jelenlétében. A leggyakrabban alkalmazott ún. „miniprep” plazmid-izolálási eljárásokkal 3-5 ml sejtszuszpenzióból 1-10 μ g izolált plazmid állítható elő.

A kultúra felnövesztését követően a baktériumsejteket mikrocentrifugálással ülepitjük. A tápoldatot tartalmazó felülúszó leöntése után a plazmid-izolálás alapvetően kétféle módon folytatható:

a) „Hagyományos” módon, amelynek során a plazmid-oldatból a fehérjéket fenol-kloroform eleggyel távolítjuk el, és az oldatból a plazmidot alkohollal csapjuk ki.

b) Plazmid-izoláló kittel, amely esetben a plazmid tisztítása miniatűr kromatográfiás oszlopon történik.

A hagyományos módon történő plazmid-izolálás lépései a következők:

a) A baktérium-üledék reszuszpendálása izotóniás oldatban. Ebben az oldatban a sejtek lízise még nem történik meg. Az oldatban található etilén-diamin-tetraacetát (EDTA) a Mg^{2+} -ionok komplexbe vitelével a sejt nukleáz enzimeinek aktivitását gátolja. Néhány régebbi eljárás ennél a lépésnél lizozimet is használt a sejttel lebontása céljából. A reszuszpenzióhoz használt oldat a fentiekén kívül DNáz-mentes RNáz enzimet is tartalmazhat a ribonukleinsavak lebontásának céljából.

b) A sejtek alkalikus lízise lúgos Na-dodecilsulfát (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) oldat segítségével, amely dezintegrálja a membránok lipidszerkezetét. Emellett ez a kezelés a fehérjéket és a DNS-t is denaturálja, és denaturált formában oldatban tartja.

c) A szolubilizált fehérjék, membrántörmelékek és a hozzájuk kapcsolódó genomiális DNS kicsapása savanyú K-acetát oldat segítségével. A dodecilsulfát káliumsója is oldhatatlan, így az is a csapadékba kerül. A plazmid DNS ennél a lépésnél is az oldatban marad.

d) A kicsapott komponensek ülepitése centrifugálással. A tiszta felülúszó tartalmazza a plazmid DNS-t.

e) A plazmid DNS tisztítása fenol-kloroform keverék alkalmazásával. A fehérjék nukleinsav-preparátumból történő eltávolításához gyakran használnak egy olyan elegyet, mely 1:1 arányban tartalmaz fenolt és kloroformot, ehhez képest 24:1 arányban tartalmaz izoamilalkoholt, és telítve van pH 8.0 TE (Trisz-hidroximetil-aminometán puffert és EDTA-t tartalmazó) oldattal. 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, illetve részben oldódnak az alsó szerves fázisban. Az izoamilalkohol csökkenti a szeparálást kísérő habzást.

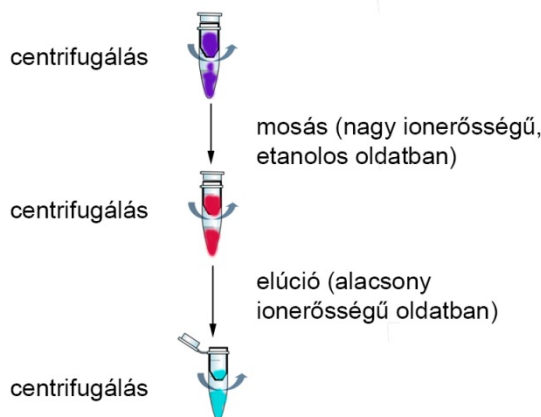
f) A plazmid DNS-t tartalmazó vizes fázishoz etanol adunk, ami a plazmid DNS kicsapódását eredményezi. A plazmid DNS így centrifugálással ülepithető.

g) A plazmidot tartalmazó csapadékot 70%-os etanollal mossuk a sók eltávolításának céljából.

h) Az ismételt centrifugálással ülepitett plazmid DNS-t TE oldatban (lásd fentebb az e) pontban) oldjuk fel, és jégen vagy fagyaszóban tároljuk. A TE oldat DNáz-mentes RNáz-t is tartalmazhat a ribonukleinsavak lebontása céljából.

A kittel történő plazmid-izolálás (**10.6. ábra**) során a reszuszpenzió, az alkalikus lízis, a savanyú K-acetátos kicsapás és az azt követő centrifugálásos ülepités lépései (fenti a)-d) lépések) a klasszikus módszernél leírtakhoz hasonlóan történnek azzal a különbséggel, hogy ezekhez a kit szállítója által biztosított oldatokat használjuk. Az e lépések nyomán keletkező, a plazmid DNS-t tartalmazó felülúszót ezután szilikátalapú membránt tartalmazó minioszlopra visszük, majd centrifugálás segítségével kötjük az oszlopra. Az oszlop magas ionerősség mellett megkötö a 100 bázispár-10 kilobázispár méretű DNS-molekulákat. Az oszlopot ezután mosópufferrel, valamint magas etanol-tartalmú oldattal mossuk, majd az etanolt többszöri centrifugálás segítségével távolítjuk el. A plazmid DNS-t végül TE (vagy hasonló összetételű), alacsony ionerősségű tárolópufferrel eluáljuk az oszlopról.

sejtek összegyűjtése, lízise; sejtörmelékek, fehérjék, genomi DNS kicsapása



10.6. ábra. Plazmid DNS izolálása DNS-kötő gyantát tartalmazó minioszlop segítségével.

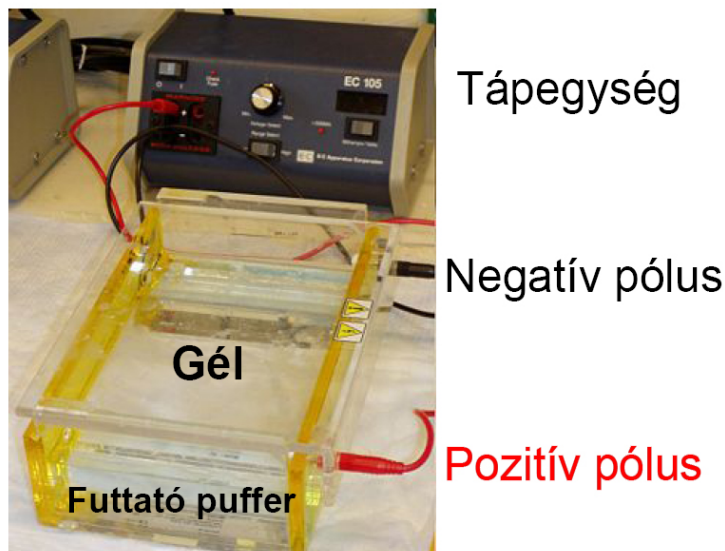
10.6. Plazmid DNS analízise agaróz gélelektroforézissel

A több száz bázispár méretű illetve ennél nagyobb DNS-molekulák – így többek között a plazmid DNS – méret (és alak) szerinti szeparálására és analízisére az agaróz gélelektroforézis terjedt el (**10.7. ábra**). Az agaróz a vörösalgák sejtfalából kivont agar egyik fő komponense, amely galaktóz- és anhidro-galaktóz-egységekből felépülő lineáris poliszacharid. Az agarózzal számos, az elektroforézis szempontjából előnyös tulajdonsággal rendelkezik. A gél hidrofíl, kémiaiilag inert, stabil, és nem köti meg azokat a festékeket, amelyeket a benne elválasztandó DNS-molekulák festésére használunk. Az agarózzal a poliszacharid-egységek között létrejövő másodlagos kötések alakítják ki a térhálós szerkezetet.

Mivel az agarózzal a szerkezetét nem-kovalens kötések tartják össze, a gél magas hőmérsékleten fázisátalakuláson megy keresztül, és folyadékszerű (szol) állapotba kerül. A gél úgy hozzuk létre, hogy agaróz port keverünk össze a futtató pufferrel, magas hőmérsékleten létrehozunk a szol állapotot, majd megfelelő formába töltve a hőmérséklet csökkentésével alakítjuk ki a gél végső formáját.

A kialakuló gél pórusmérete az agaróz koncentrációjától függ. A pórusméret dönti el, hogy a gél milyen méretű molekulák hatékony elválasztására alkalmas. Az agaróz gélelektroforézishez rendszerint 0,5-3 % koncentrációjú agarózt használunk. E koncentráció-tartomány alsó értékeit kisebb, míg a magasabb koncentrációkat nagyobb DNS-molekulák elválasztásához alkalmazzuk.

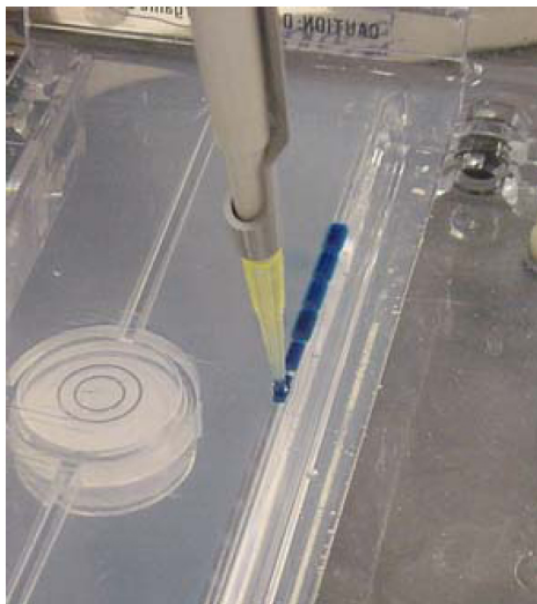
A DNS negatív töltésű molekula, ezért az elektroforézis során alkalmazott elektromos térerő hatására az anód (pozitív pólus) felé vándorol. A gél ezért olyan orientációban helyezük az elektroforézis-tankba, hogy a DNS-minták betöltése céljából kialakított „zsebek” a gél katód (negatív pólus) felőli oldalán helyezkedjenek el (lásd 10-7. ábra).



10.7. ábra. Gélelektroforézis-készülék.

A plazmid-mintákat a gélbe történő betöltés előtt mintafelvívő pufferrel kezeljük. A mintafelvívő puffer a felvitt minta viszkozitásának és sűrűségének növelése (és így a hatékony betöltés) céljából glicerint vagy nagy molekulású poliszacharidokat tartalmaz. E puffer jelzőfestéket (leggyakrabban brómfenolkéket) is tartalmaz, amely az elválasztani kívánt DNS-molekulákénál némileg magasabb mobilitással rendelkezik, így elősegíti az elektroforetikus futtatás optimális leállítási idejének megállapítását.

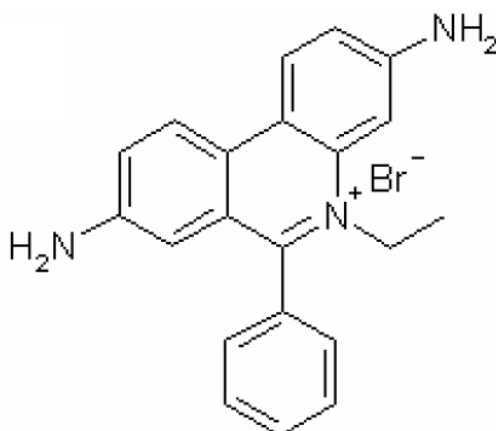
A mintafelvívő pufferrel kezelt mintákat a gél zsebeibe rétegezzük a tankpuffer folyadékfelszíne alá (**10.8. ábra**). A vizsgálni kívánt minták mellett általában DNS molekulású-markert is alkalmazunk az elektroforézis során, amely ismert méretű lineáris DNS-molekulákat tartalmaz.



10.8. ábra. Minták felvitele agaróz géltre.

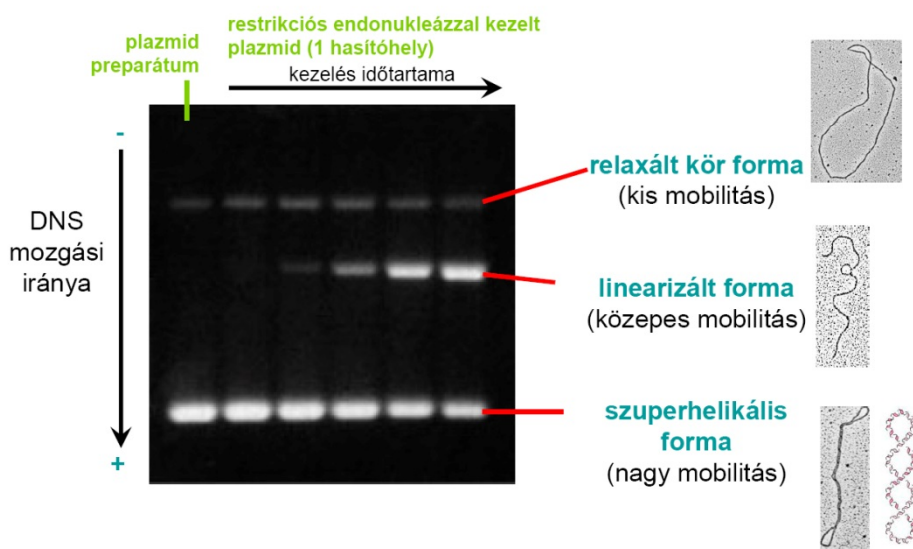
A DNS-molekulák gélben történő kimutatásához hagyományosan használt DNS-festék, az etídium-bromid (**10.9. ábra**) mutagén hatású ennél fogva használata során körültekintően kell eljárni. Az etídium-bromid gyűrűs vegyület, amelynek molekulája képes a DNS-kettőspirálban a bázisok közé beékelődni (interkalálódni). A replikáció során

ezért inszerciót vagy deléciót okozhat, tehát a leolvasási keret eltolódását eredményezheti. A SYBR Safe festék ezzel szemben nem toxikus. Mindkét festékre igaz, hogy DNS-sel alkotott komplexük ultraibolya fényvel megvilágítva narancsszínű fényt kibocsájtva fluoreszkál: ez az alapja a DNS gélben történő kimutatásának. A festett mintákat tartalmazó gélt UV-transzilluminátor készülékben fényképezzük le.



10.9. ábra. Etidium-bromid.

A DNS-molekulák elektroforetikus mobilitását – méretük mellett – alakjuk is jelentősen befolyásolja. A szuperhelikális formába feltekeredett cirkuláris plazmid DNS kompakt szerkezetű, és hidrodinamikai mérete jóval kisebb – elektroforetikus mobilitása pedig nagyobb –, mint a vele azonos méretű lineáris DNS-molekulaké, amelyek szabad mozgású entropikus láncot alkotnak (**10.10. ábra**). Ha a szuperhelikális plazmid DNS egyik szála elhasad, akkor ún. relaxált kör forma keletkezik, amelynek mobilitása még a lineáris formáénál is kisebb. E jelenségek jól megfigyelhetők a 10-10. ábrán látható elektroforetikus felvételen. A bal oldali sávban futtatott plazmid preparátumban megjelenő két csík mobilitásából és intenzitásából megállapítható, hogy a preparátumban a plazmid DNS nagyrészt a sejtekben jellemzően előforduló szuperhelikális formában, kisebb részben relaxált kör formában van jelen. A többi mintában egy, a plazmid DNS-t egyetlen helyütt hasító restrikciós endonukleáz enzimmel végzett kezelés hatására megjelenik a közepes mobilitású, mindkét szálan hasított lineáris kettőszálú DNS-forma.

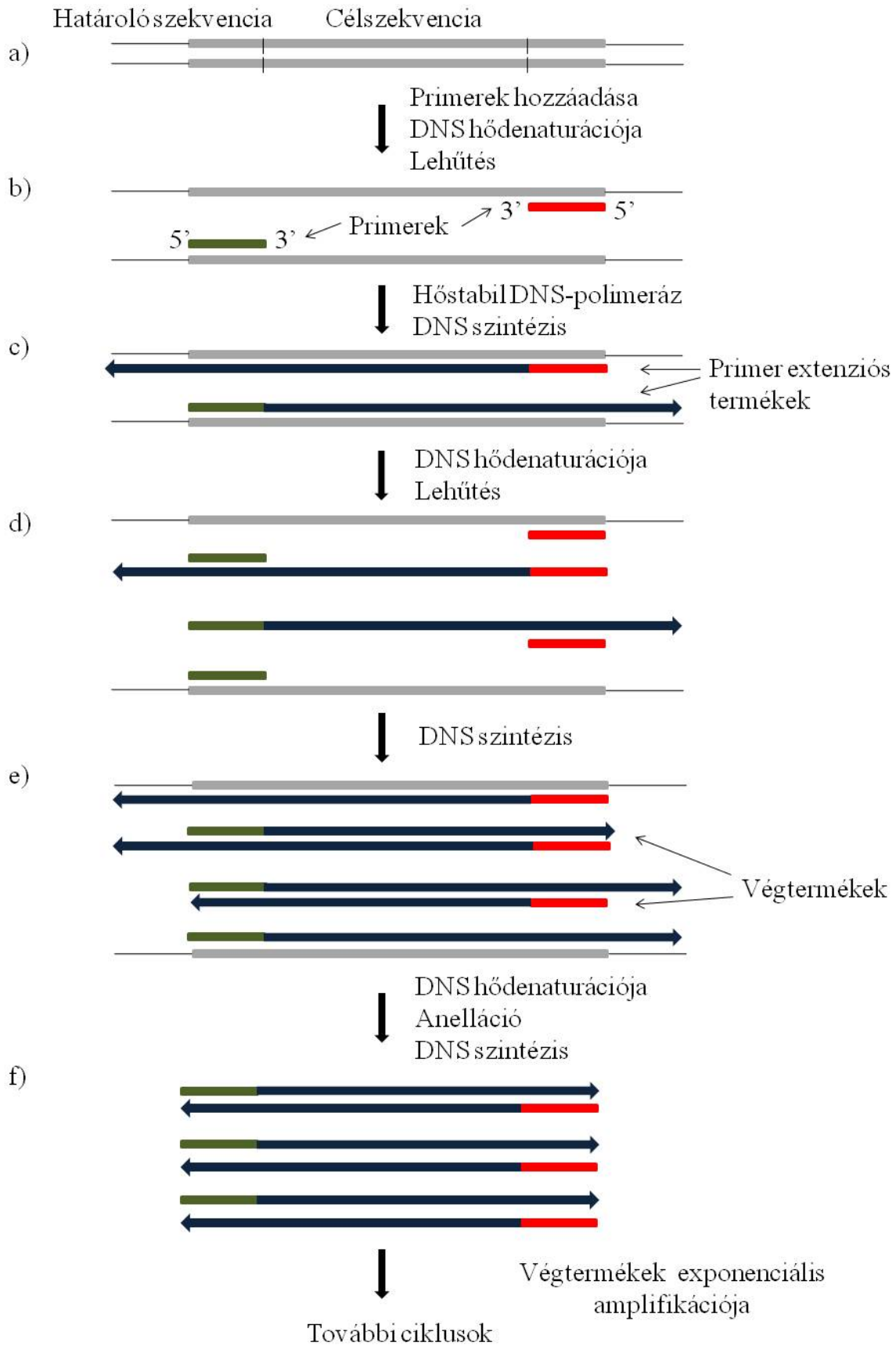


10.10. ábra. Plazmid DNS gélelektroforetikus képe.

10.7. Polimeráz láncreakció (PCR)

A polimeráz láncreakció (*polymerase chain reaction*, PCR) segítségével egyetlen vagy kis számú DNS-molekula meghatározott szakasza (célszekvencia, amplikon) amplifikálható *in vitro* enzimatis reakció révén, gazdaszervezet igénybevétele nélkül. A reakció során amplifikált DNS-szakasz mérete jellemzően a 100 bázispár és 10 kilobázispár közötti tartományba esik.

A PCR elve a következőkben vázolt és a **10.11. ábrán** bemutatott reakciósémán alapszik. Valamely DNS-célszekvencia (templát, „a” panel) hőindukált denaturációja (azaz a komplementer szálak szétválása) után a célszekvencia két oldalán elhelyezkedő (határoló) szekvenciákkal komplementer rövid egyszálú DNS-molekulák (oligonukleotidok, primerek) az oldat lehűtésekor bázispárosodás révén illeszkedni (anellálni) képesek a határoló szekvenciákhoz („b” panel). Az anellált primerek 3' végétől indulva a DNS-polimeráz enzim DNS-szálhosszabbító aktivitása (szintézis, elongáció) révén a célszekvenciákkal komplementer új szálak (ún. primer extenziós termékek) keletkeznek („c” panel). Újabb hődenaturációt és lehűtést követően a primerek az eredetileg jelenlévő DNS-molekulákon kívül a primer extenziós termékekhez is képesek anellálni („d” panel). Ez esetben a keletkező DNS-szál hosszát a másolási mintaként (templátként) szolgáló primer extenziós termék hossza limitálja. Az így keletkező „végtermék”-szálak ezért a célszekvencia és a határoló primerek szekvenciái által meghatározott szakaszt fogják tartalmazni („e” panel). A további denaturáció-anelláció-szintézis ciklusokban a végtermék-szálak további végtermék-szálak szintézisének templátjául is szolgálnak, ezért ezek mennyisége a ciklusok számának növelésével exponenciálisan ütemben növekszik („f” panel). A reakció végeredményeképpen tehát nagy mennyiségben, exponenciálisan keletkeznek a használt primerek által közrefogott DNS-szakaszt tartalmazó molekulák. A PCR-technika egyik sarkalatos előnye tehát, hogy a templát DNS amplifikálni kívánt szakasza a primerek tervezése révén – adott korlátok között – tetszőlegesen megválasztható.



10.11. ábra. Polimeráz láncreakció (PCR).

A fent vázolt reakció hatékony lebonyolításához az alábbi oldat-összetevők jelenlétére van szükség:

a) A reakció templátjául szolgáló DNS-molekulák. A templát mennyisége rendkívül alacsony lehet, a reakció elvben egyetlen templát-molekuláról is indulhat. A PCR további előnye, hogy heterogén összetételű DNS-mintákból is képes a kívánt szakasz szelektív amplifikálására.

b) Primerként szolgáló oligonukleotid-pár, amelyek 3'-végei a templát egyik illetve másik szálaihoz anellálási képesek. A PCR további előnye, hogy a használt primerek 5'-vége tartalmazhat az eredeti templáthoz nem anellálási szakaszokat (vagy jelölt molekularészeket) is, amelyek a végtermékben jelen lesznek, és megkönnyíthetik annak további analizését vagy feldolgozását (pl. restrikciós hasítóhelyek építhetők be a PCR-termék klónozására céljából).

c) A DNS-szintézist végző DNS-polimeráz enzim. Mivel az ismétlődő ciklusok mindegyikében szükség van a templát hőindukált denaturációjára, a PCR-reakcióban elsősorban termofil organizmusokból származó hőstabil DNS-polimerázokat (pl. *Thermus aquaticus* (Taq) vagy *Pyrococcus furiosus* (Pfu) DNS-polimeráz) használnak.

d) A szintetizálendő DNS-szálak építőköveiként szolgáló dezoxiribonukleotid-trifoszfát (dNTP) molekulák (azaz dATP (dezoxiadenozin-trifoszfát), dGTP (dezoxiguanozin-trifoszfát), dTTP (dezoxitimidin-trifoszfát) és dCTP (dezoxicitidin-trifoszfát) elegye).

e) A DNS-polimeráz optimális működését biztosító puffer, amely többek között kétértékű kationokat (pl. Mg^{2+} vagy Mn^{2+} ionokat) is tartalmaz.

A hatékony polimeráz láncreakcióhoz az oldat hőmérsékletének széles tartományban történő, gyors, ciklikus változtatása szükséges (lásd alább), ami Peltier-cellás termoblokkot tartalmazó programozható műszer segítségével érhető el. A polimeráz láncreakciót a hatékony hőcsere érdekében vékonyfalú műanyag mikrocövekben végzik, jellemzően 10-200 μ l reakcióterefogatban. A csövek tetejét fűtött tetőblokk segítségével tartják magas hőmérsékleten, hogy elkerüljék a reakcióelegynek a csövek tetején bekövetkező kondenzációját. Fűtött tetőblokk híján a párolgás a reakcióelegy tetejére rétegzett olaj vagy viasz segítségével kerülhető el.

A PCR-reakció programozott hőprofilja általában a következő lépésekből áll:

a) A templát kezdeti denaturációja magas hőmérsékleten (95°C körül).

A következő, b)-d) lépésekből álló ciklust alkalmazástól függően 20-35-ször ismétlik:

b) Denaturáció: a kétszálú DNS-molekulák szálainak szétválasztása magas hőmérsékleten (95°C körül).

c) Anelláció: a reakcióelegy lehűtése 45-65°C hőmérsékletre a primerek templáthoz történő anellálásának elősegítése érdekében.

d) DNS-szintézis: a DNS-polimeráz hőoptimuma (jellemzően 72°C) körüli hőmérsékleten, az amplifikálendő szakasz hossza által megkívánt ideig.

e) Végző DNS-szintézis lépés: a ciklusok befejeztével a d) lépéssel azonos hőmérsékleten, hogy a fennmaradó egyszálú DNS-molekulák mindegyikéről származó szálakat készíthessen.

A PCR-reakciót a biológia és az orvostudomány sok különböző területén alkalmazzák, amelyek közül az alább felsoroljuk a legjellemzőbbeket.

a) Klónozás, rekombináns DNS-konstrukciók és hibridizációs próbák előállítás, mutagenézis, szekvenálás;

b) Gének funkciójának és kifejeződésének vizsgálata;

c) Orvosi diagnosztika: genotípusok, öröklött rendellenességek, kórokozók kimutatása;

d) Törvényszéki vizsgálatok: egyének, minták azonosítása „DNS-ujjlenyomatok” (egyedi DNS-szekvenciák) alapján;

e) Evolúciókutatás: molekuláris evolúció, filogenetikai vizsgálatok, fosszilis minták vizsgálata.

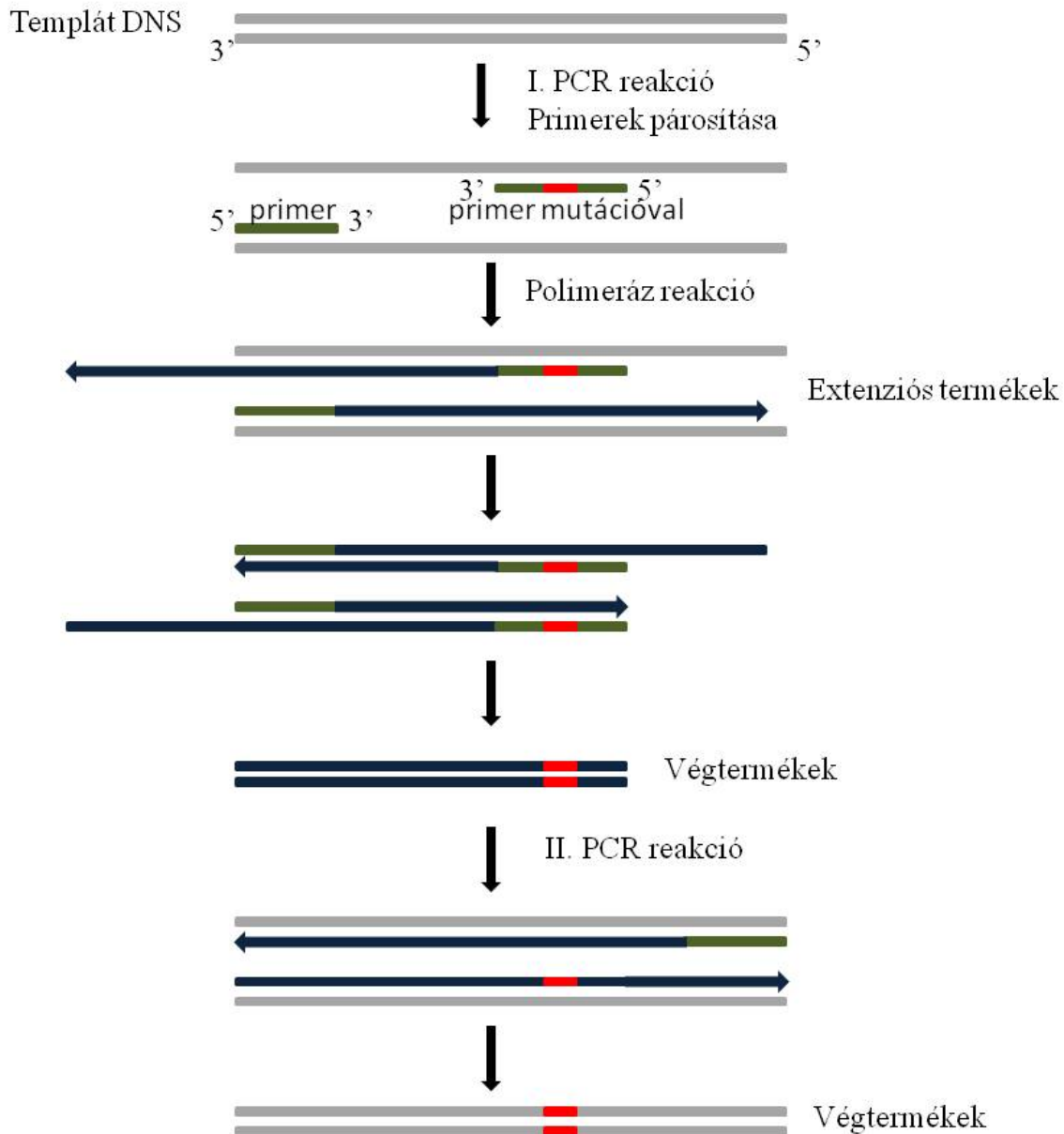
10.8. Irányított in vitro mutagenézis

A különféle genetikai, biokémiai és molekuláris sejtbiológiai vizsgálatok gyakran megkövetelik, hogy adott DNS-szakaszok információtartalmát tervezetten, irányítottan megváltoztassuk. A változtatás folyamatát mutagenézisnek nevezzük. E változtatásokat leggyakrabban a gének regulátor szakaszain vagy a gének kódoló régióján végzik. A mutagenézis célja a célzott gének működésének vagy adott gének által kódolt RNS-molekulák illetve fehérjék szekvenciájának, sajátosságainak módosítása. A DNS-en történő változtatásokat három csoportra oszthatjuk:

- a) deléció: egy adott DNS-szakaszból tetszőleges számú nukleotid eltávolítása;
- b) inszerció: egy adott DNS-szakaszba nukleotidok beillesztése;
- c) szubsztitúció: egy adott DNS-szakaszban nukleotidok másik nukleotidra való lecserélése anélkül, hogy a szakasz hossza változna.

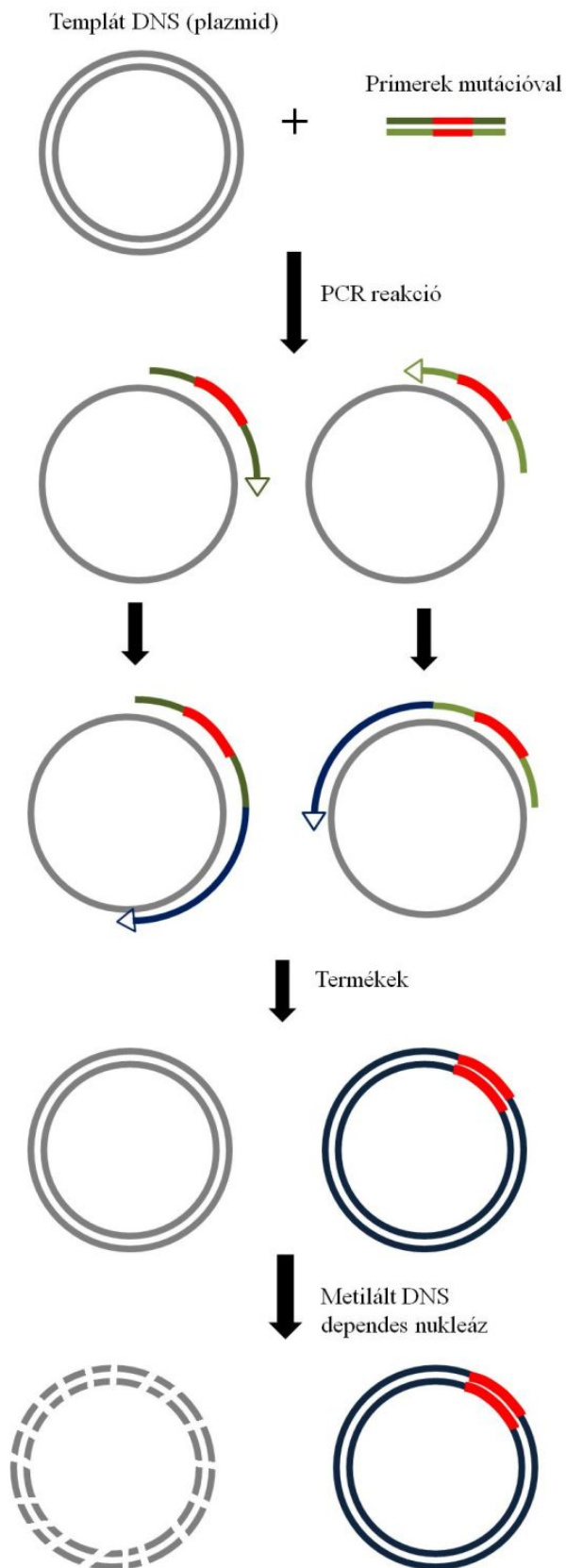
Az *in vitro* mutagenézis elvégzésére nagyszámú technika áll rendelkezésünkre. Az alábbiakban két lehetséges módszert mutatunk be:

a) Irányított mutagenézis PCR segítségével (**10.12. ábra**): A módszer segítségével mutációt hordozó lineáris DNS-szakaszok hozhatók létre. A mutagenézis PCR technika segítségével történik. A primereket úgy tervezik meg, hogy az egyik primer a felszorzozni és mutálni kívánt DNS-szakasz végéhez illeszkedjék, míg a másik primer, amely tartalmazza a mutáns szekvenciát, magához a mutálni kívánt régióhoz hibridizáljon. A PCR reakció során olyan termékek keletkeznek, melyek tartalmazzák a primerek szekvenciáját, azaz a mutációt is. Azonban e termékek az eredeti DNS-nek csak a primerek közé eső részét hordozzák. Amennyiben szükséges, a továbbiakban elvégezhető egy újabb PCR reakció is, amelyben egyik primerként az előző PCR reakció termékét használják, a másik primert pedig a fennmaradó felszaporítani kívánt DNS-régió végéhez illesztik. A kapott DNS-szakaszokat vektorba illesztik és baktériumsejtekbe transzformálják. A plazmidot tartalmazó baktérium-kolóniákat szelekciós eljárással izolálják. A különálló kolóniákból a plazmidokat újra izolálják és DNS-szekvenálás segítségével azonosítják a mutáns szekvenciát hordozókat.



10.12. ábra. Irányított mutagenézis PCR segítségével.

b) Szelektív templát-lebontásos módszer (10.13. ábra): E módszer segítségével plazmidba illesztett DNS-szakaszokon végezhetünk mutagenézist. A módszer kivitelezésének előfeltétele, hogy a használni kívánt plazmid guanin bázisai metiláltak legyenek. E feltétel teljesítése érdekében a plazmidokat olyan bakteriális törzsben szaporítják fel, amely a DNS-t metilálja. A mutagenézis eljárás PCR technika segítségével történik, azonban a klasszikus PCR eljárással szemben olyan primert párt alkalmaznak, amely ugyanazon DNS-szakasz két szálához hibridizál és tartalmazza a kívánt mutációt (tehát a primerek egymással komplementer szekvenciájúak). A PCR-t ezekkel a primerekkel olyan beállítások mellett végzik, hogy a teljes plazmid másolása megtörténjék. A reakció végeredményeképpen olyan keveréket kapnak, melyben jelen lesznek az eredeti szekvenciájú és a mutációt hordozó plazmidok is. A továbbiakban a PCR-termékhez egy speciális endonukleáz enzimet adnak (DpnI endonukleáz), mely csak a metilált DNS hasítására képes. Az endonukleáz enzimaktivitásának köszönhetően az eredeti plazmid fragmentumokra emésztődik, azonban a PCR-reakcióban keletkezett, mutációt hordozó plazmidok intaktak maradnak. A mutáns plazmidokat végül baktériumtörzsbe (leggyakrabban *E. coli*-ba) transzformálják. A felszaporított plazmidokat végül 10.4-10.6 fejezetekben leírtak szerint izolálják és analizálják.



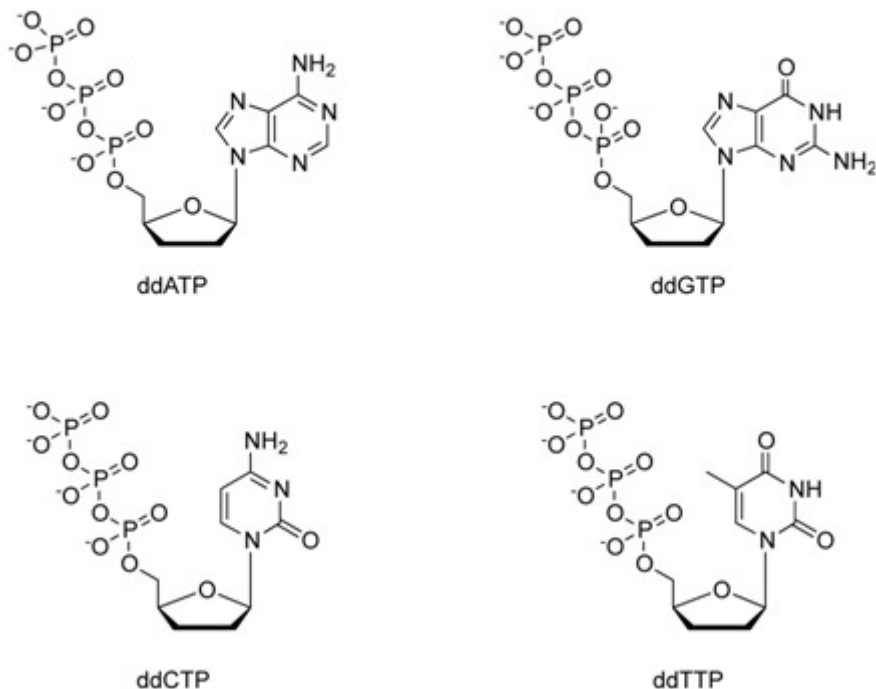
10.13. ábra. Szelektív templát-lebontásos mutagenézis.

10.9. DNS-szekvenálás

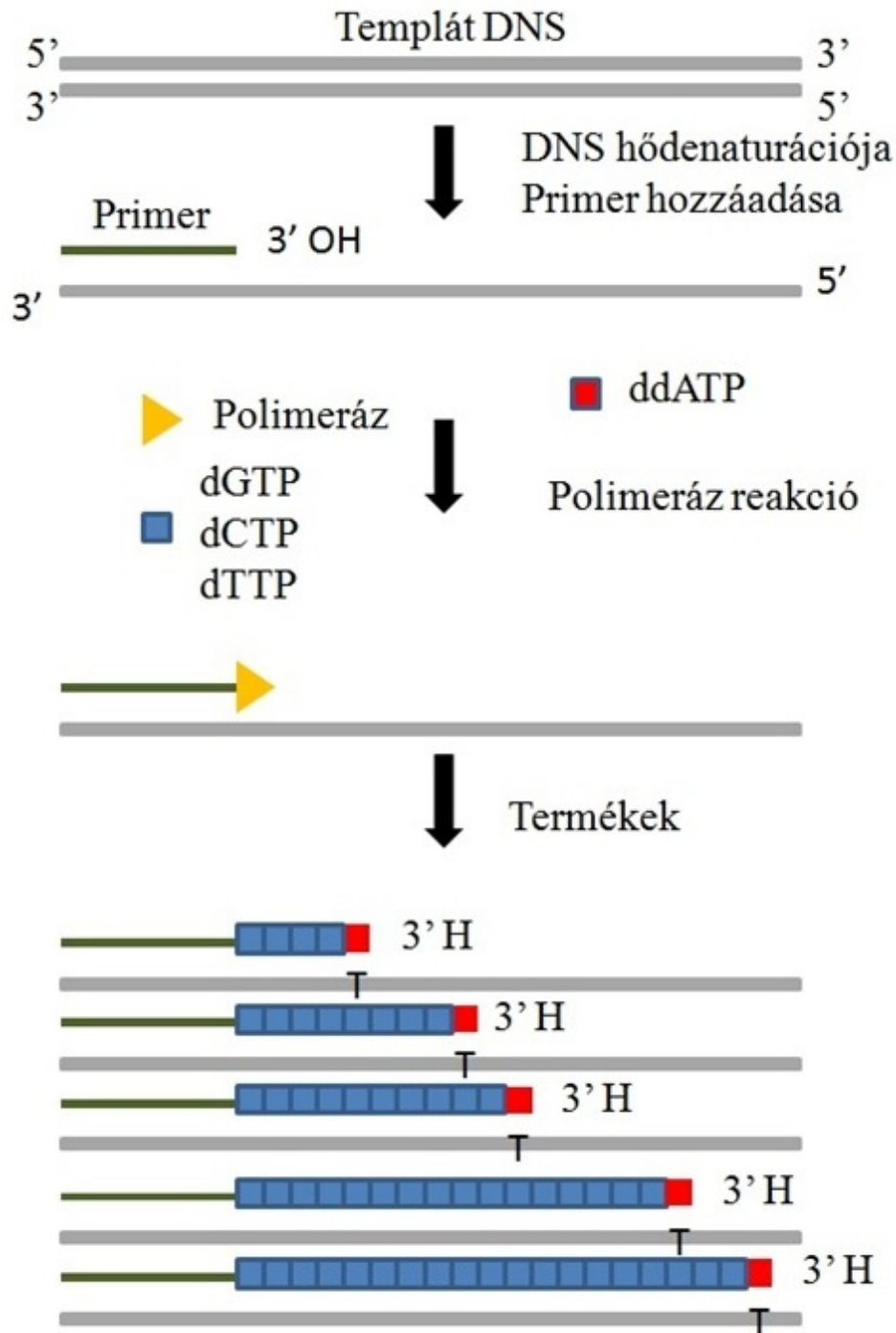
Számos esetben szükséges a DNS-molekula bázissorrendjének meghatározása (DNS-szekvenálás). Az alábbiakban bemutatjuk a DNS-szekvenálás módszertanát.

A láncterminációs DNS-szekvenálás elvi háttere: A Sanger-Coulson-féle DNS-szekvenálás elvét az 1970-es évek végén dolgozták ki annak érdekében, hogy könnyen kivitelezhető, a korábbi eljárásokhoz képest gyorsabb és – nem utolsósorban – olcsóbb módon lehessen DNS-molekulák bázissorrendjét meghatározni. Az eljárás során a szekvenálni kívánt kettőszálú DNS szárait magas hőmérsékleten denaturálják, majd a szétváló szálak közül az egyikhez az 5'-irányba leolvasni kívánt szakasz elé komplementer, rövid egyszálú DNS-szálat (primert, szekvenáló oligonukleotidot) párosítanak. Ezután négy párhuzamos szekvenáló reakciót állítanak össze. Minden reakcióelegybe kerül templát DNS és szekvenáló primer, polimeráz enzim és azonos mennyiségben négyféle dezoxinukleotid-trifoszfát (dNTP). A négy párhuzamos reakció mindegyikéhez négy különféle didezoxinukleotid-trifoszfát (ddNTP) molekula közül egyfélélet kevernek. A ddNTP-k ribóz gyűrűjének –szemben a dNTP-molekulákkal– 3'-szénatomjához az -OH csoport helyett -H atom kapcsolódik (**10.14. ábra**). Példaként vegyük a reakciót, mely ddATP-t tartalmaz. A polimeráz enzim a primer 3'-végétől indulva megkezdi a komplementer DNS-szál szintézisét, felhasználva egyaránt a dNTP- és ddATP-molekulákat. A leolvasni kívánt DNS-szakaszban található timin bázisokkal szemben a szintetizálódó új száalba dATP vagy ddATP épülhet be (a két nukleotid koncentrációjának arányától függő valószínűségekkel). Amennyiben dATP épül be, a szálszintézis folytatódik; viszont ha ddATP épül be, az új szál szintézise leáll a reaktív 3'-OH-csoport hiánya miatt. A reakció során tehát különböző hosszúságú új DNS-szakaszok keletkeznek, melyek hossza tükrözi a timin bázisok távolságát illetve pozícióját a primer 5' végétől (**10.15. ábra**). A ddGTP-vel, ddCTP-vel illetve ddTTP-vel végzett párhuzamos reakciók esetében a szintetizált szálak hossza rendre a citozin, guanin és adenin bázisok pozíciójától függ.

Didezoxi nukleotid trifoszfát



10.14. ábra. A didezoxi-nukleotid-trifoszfátok szerkezete.



10.15. ábra. Láncterminációs DNS-szekvenálás.

A DNS-láncok méret szerinti elválasztása poliakrilamid gélen: A négy különböző szekvenáló reakció során keletkező új DNS-láncok méreteinek ismeretében a templát DNS-szal bázissorrendjét meg lehet határozni. A 10.6 fejezetben bemutatásra került az agaróz gélelektroforézis technika. Az agaróz gélelektroforézis csak nagyméretű (többnyire kétszálú) DNS-láncok esetében használható; a technika a legalább 100 nukleotid hossznyi eltérések kimutatására alkalmas. A rövidebb, egyszálú DNS-láncok nagy felbontású, méret szerinti elválasztására az urea-denaturációt alkalmazó poliakrilamid gélelektroforézis (*polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE*) eljárást dolgozták ki. Az agaróz gélelektroforézishez hasonlóan az eljárás szintén a negatív töltéssel rendelkező DNS-molekulák elektromos térben zajló, az anód felé irányuló vándorlását használja ki. A vándorlás azonban az agaróz gélnél kisebb pórusmérettel rendelkező poliakrilamid gélben történik, lehetővé téve ezáltal kisebb (akár egyetlen nukleotid-egységnyi) méretbeli különbségek elkülönítését is. A poliakrilamid gélek szintetikus akrilamid és

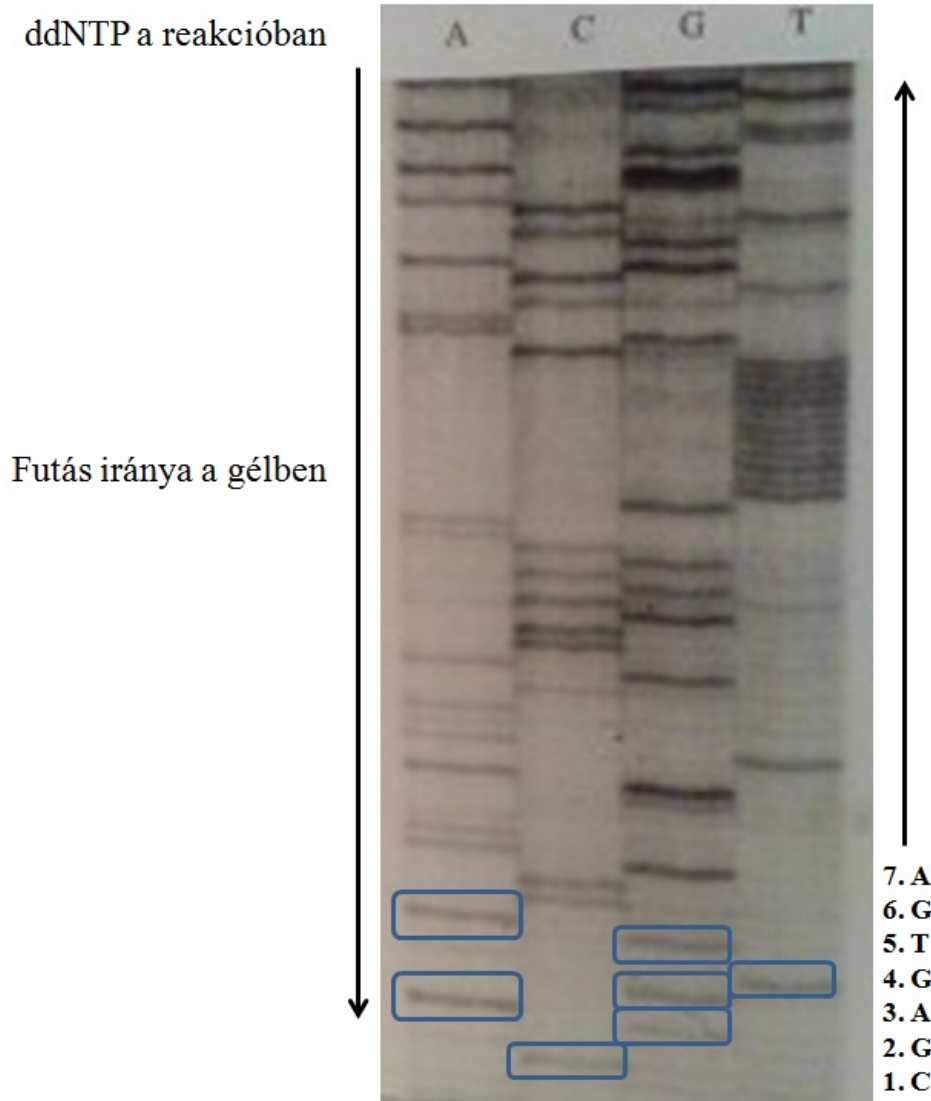
biszakrilamid (N,N'-metilén-bisakrilamid) keverékéből készülnek. Az akrilamid vizes közegben képes gyökös polimerizációra, amely során különféle méretű lineáris poliakrilamid-szálak jönnek létre. A bisakrilamid egy keresztkötő reagens, amely képes összekapcsolni a különálló poliakrilamid-szálakat. A keresztkötés során térhálós gélmátrix alakul ki. Az akrilamid polimerizációjának és a keresztkötések képződésének a sebességét a szabadgyökök jelenléte megnöveli, ezért a gél készítéséhez szabadgyök képző ammónium-perszulfátot (APS) és a szabadgyököket stabilizáló tetrametilén-diamint (TEMED) használnak. A poliakrilamid gélek pórusméretét – és ezáltal a gél elválasztó-képességet – az akrilamid és bisakrilamid koncentrációja határozza meg. A szekvenáló gélek esetében az akrilamid koncentrációja 4-8 vegyes%, míg a bisakrilamid koncentrációja 0,2 vegyes%. Ebben a koncentráció-tartományban a primer méretétől közel 600 bázisig egyetlen bázis felbontással elválaszthatóak egymástól az egyszálú DNS-láncok. Mivel az egyszálú DNS-láncok esetében felmerül a lehetőség, hogy komplementer régióikkal egymással vagy önmagukkal kapcsolódjanak és különféle másodlagos szerkezettel rendelkező struktúrákat alakítsanak ki, a gélbe 7 M koncentrációban ureát tesznek. Az urea a DNS-re nézve denaturálószer, jelenlétében szétválnak párosodott bázisok, ezzel biztosítva, hogy a gélben való futás során tisztán egyszálú, lineáris DNS-láncok vándoroljanak.

A szekvenáló géleket rendszerint vertikális irányban futtatják: a gél alsó része a pozitív töltésű anód, míg felső része a negatív töltésű katód felé irányul (**10.16. ábra**). A gél felső részén mintatöltő zsebek vannak kialakítva. A szekvenálási reakcióban keletkező mintákhoz felvitel előtt kezelőoldatot adnak, amely jelzőfestékeket (brómfenolkéket és xylénkéket), valamint formamidot tartalmaz. A formamid szerves oldószer, amely képes denaturálni a szekvenáló reakcióban résztvevő polimeráz enzimet, ezáltal leállítva a reakciót. Mivel a mintában az újonnan keletkezett DNS-láncok a templát DNS-hez párosodva vannak, futtatás előtt ezeket szét kell választani. A futtatni kívánt mintát ezért több percen keresztül 95°C-on hődenaturálják – a formamid jelenléte a kettősszálú DNS hőstabilitását jelentősen lecsökkenti, segítve ezzel a denaturációt és meggátolva a szálak újrapárosodását alacsonyabb hőmérsékleten. A négy párhuzamos, különböző ddNTP tartalmú szekvenáló reakcióból származó kezelt mintát négy egymás melletti gélzsebbe töltik pipetta segítségével. A betöltés után a gél TBE (TRIS (trisz-hidroksimetil-aminometán), borát, EDTA (etiléndiamin-tetraacetát)) pufferben 50°C hőmérsékleten magas elektromos térerősség mellett (5-20 V/cm) futtatják. A gélben a kisméretű DNS-láncok haladnak a leggyorsabban; a méret növekedésével a vándorlási sebesség csökken. A gél addig futtatják, míg a brómfenolkék festék el nem éri a gél alsó részét.



10.16. ábra. Poliakrilamid gélelektroforézis.

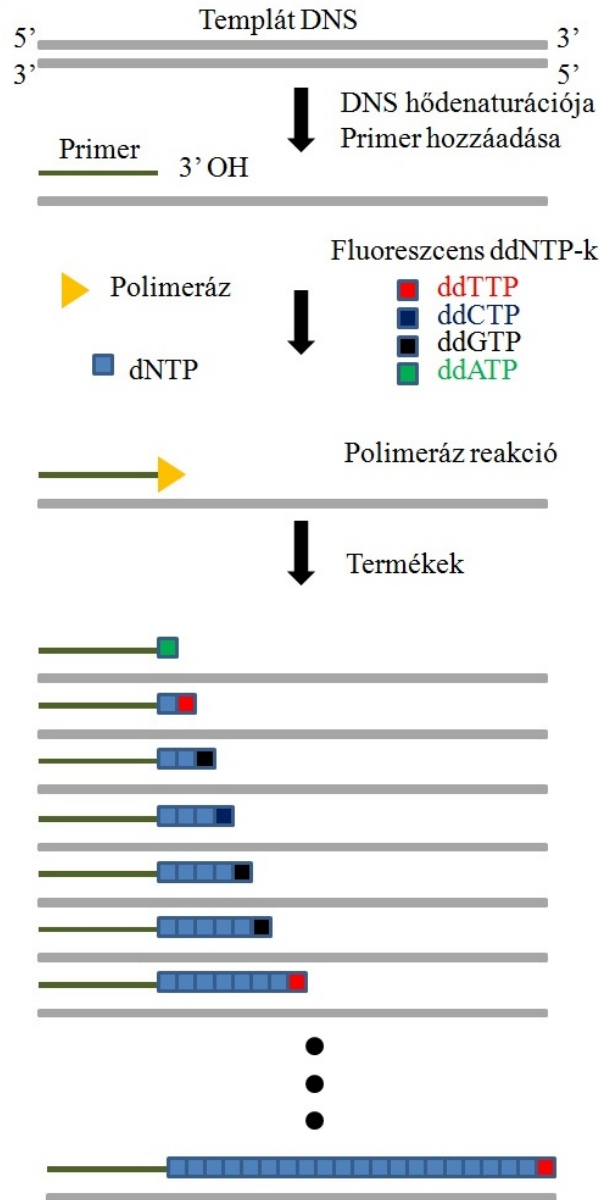
A DNS detektálása, a bázissorrend leolvasása: A szekvenálógélben a DNS érzékeny kimutatása radiometrikus módszerrel történik. A szekvenálási reakció során a DNS-láncokat α - ^{32}P -dATP (α - ^{32}P -dezoxiadenozin-trifoszfát) használatával jelölik. A gélt futtatás után kiszáritják, majd fotópapírra helyezik. A ^{32}P β -bomló radioaktív izotóp: a β -bomlás során elektron távozik az izotóp atommagjából. Ahol az elektronok kölcsönhatásba lépnek a fotópapírral, ott a papír filmrétege megfeketedik, ezáltal a DNS-láncok „lenyomata” láthatóvá válik a papíron (10.17. ábra). Manapság a fotópapír helyett úgynevezett *phosphorimager* készüléket használnak, mely a fotópapírral ellentétben újrahasználható és nagyobb érzékenységgel rendelkezik. A radioaktív izotópot alkalmazó technikák előnye – az alacsony költségek mellet – a nagyon magas érzékenység, azonban alkalmazásuk potenciális veszélyességük (sugárterhelés illetve karcinogén hatás) miatt különös odafigyelést és számos, a felhasználó védelmét szolgáló szabály és feltétel betartását igényli.



10.17. ábra. A bázissorrend leolvasása.

A DNS detektálására további lehetőséget nyújt, ha a szekvenáló reakcióhoz használt primer 5'-végére fluoreszcens festék van kovalensen kapcsolva. A fluoreszcens festékek (fluorofórok), amennyiben egy, a festékre jellemző, adott hullámhosszú fényel kerülnek megvilágításra, gerjesztett állapotba kerülnek. A gerjesztett állapotú molekulák a gerjesztés után visszatérnek alapállapotukba, miközben magukból fényt bocsátanak ki – ez az alapja a fluoreszcencia jelenségének. A kibocsátott fény hullámhossza magasabb (energiája alacsonyabb), mint a gerjesztő fényé. Amennyiben a gélt a használt festéktől függő gerjesztési hullámhosszal megvilágítjuk, a DNS-láncokat tartalmazó helyeken fluoreszcenciát tapasztalunk.

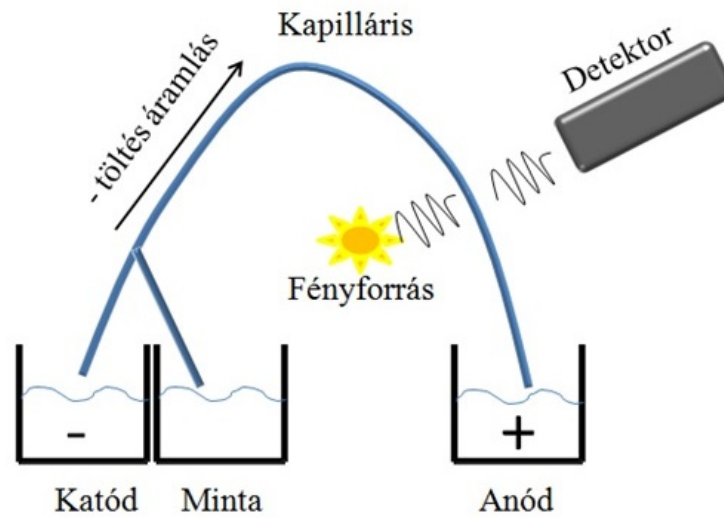
Automatizált szekvenálás (10.18. ábra): A manapság legelterjedtebb módszer során a primer helyett a ddNTP-molekulákhoz kapcsolnak fluoreszcens festékeket, oly módon, hogy az jelentősen ne befolyásolja a jelölt ddNTP-nek a szintetizálódó láncba való beépülését. A négy különböző ddNTP-hez négy egymástól különböző fluorofórt kapcsolnak, amelyek gerjesztési és kibocsátott fény-hullámhossza eltérő. E módszer feleslegessé teszi, hogy négy párhuzamos szekvenáló reakciót kelljen futtatnunk. A mintákhoz egyszerre adják hozzá a négy jelölt ddNTP-molekulát. A polimeráz reakció lezajlása után a mintát egy gél zsebbe töltik. A gélelektroforézis után a gél olyan leolvasóba teszik, mely képes mind a négy fluorofór különálló detektálására. A gél aljától a teteje felé haladva a templát DNS-szál bázissorrendje meghatározható annak ismeretében, hogy az adott csíkban mely fluorofórt detektáltuk.



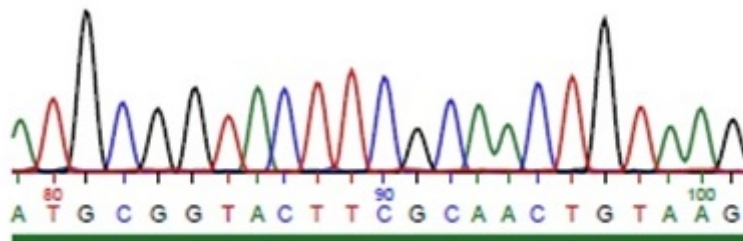
10.18. ábra. Automatizált szekvenálás fluoreszcensen jelölt ddNTP-k felhasználásával.

A fluoreszcens ddNTP-k használata lehetővé tette a szekvenálás folyamatának teljes automatizálását. A szekvenálási reakcióban létrejövő DNS-láncokat az automatizált eljárás során a „lap” kivitelű gélelektroforézis helyett kapilláris gélelektroforézissel választják el (10.19. ábra). A kapilláris gélelektroforézis során egy 50-70 cm hosszú, 50-100 μm belső átmérővel rendelkező kapillárisban található a térhálós gélmátrix. A futtatni kívánt mintát a kapillárisba töltik, majd a kapilláris végeire elektromos feszültséget kapcsolnak, így a DNS az anód felé fog vándorolni. A vándorlás közben érvényesül a gélmátrix szűrőhatása, így a kisméretű molekulák haladnak a leggyorsabban. A kapilláris anód felőli végén folyamatosan történik a négyféle dideoxinukleotidhoz kötött fluoreszcencia-jel

detektálása, amelyet számítógép rögzít. A folyamatos detektálás eredménye egy kromatogram lesz, melyen időben láthatjuk, hogy adott időpillanatban mely fluorofór haladt át a detektor előtt, így meghatározhatjuk a templát DNS szekvenciáját (10.20. ábra).



10.19. ábra. Kapilláris gélelektroforézis.



10.20. ábra. Kapilláris gélelektroforézisből származó kromatogram.

Második generációs szekvenálási módszerek: Az automatizált eljárás segítségével egy reakció elvégzésekor a leolvasható DNS-szakasz maximális hossza nagyjából 1000 bázis. Egy teljes kapacitással működő automatizált berendezéssel (amely általában 96 párhuzamos reakciót futtatására képes) egy nap alatt közel 5 millió bázis leolvashatósága lehetséges. Az emberi genom mérete közel 3,2 milliárd bázispár – ideális esetben, ha egyetlen szekvenátor üzemidejével számolunk, közel három évig tartana az emberi genom egyszeri leolvashatósága. Az elmúlt évek során megjelentek az úgynevezett második generációs szekvenálási technikák, amelyek nagy előrelépést jelentettek a genomszekvenálás területén azáltal, hogy lehetővé tették egy kísérletben akár 10^5 - 10^6 különböző DNS-minta párhuzamos és gyors, automatizált leolvashatóságát. Ezen eljárások során nincs szükség a DNS-láncok időigényes, méret szerinti elválasztására. A második generációs szekvenátorok gyártása és fejlesztése különálló iparággá nőtte ki magát. Számos biotechnológiai cég kínál egymástól eltérő módszereken alapuló szekvenátorokat.

11. fejezet - Bioinformatika

szerző: Nyitrai László

11.1. Bevezetés

Az utolsó tíz évben nagyobb mennyiségű biológiai ismeret halmozódott fel, mint a tudománytörténet elmúlt két és fél ezer éve alatt összesen. Ez az új keletű információ nagyrészt nukleinsav- és fehérjeszekvenciákat jelent, köszönhetően elsősorban annak a ténynek, hogy a „géntechnológiai forradalom” jóvoltából a DNS szekvenálás rutin eljárássá vált. 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 mai értelemben használt definíció szerint a bioinformatika mindazon matematikai algoritmusok és módszerek *in silico*, azaz számítógépes alkalmazása, amelyek segítségével kísérleti adatokból kiindulva biológia problémákra kívánunk választ kapni. Szélesebb értelemben bármilyen biológiai vonatkozású adat számítógépes feldolgozása a tárgykörébe tartozik, míg a molekuláris biológia szemszögéből nézve elsősorban a nukleinsav- és az általuk kódolt aminosav-szekvenciák tárolását, előhívását és analizését értjük alatt. Vannak specializáltabb részterületei is, például a makromolekulák térszerkezetével a szerkezeti bioinformatika foglalkozik. A szekvenáláson kívül ma már számos más, ún. nagy áteresztőképességű (HTP: *high-throughput*) módszerrel előállított adat is csak a bioinformatika segítségével kezelhető. Ide tartoznak többek között a génexpressziós, elektroforetikus, tömegspektrometriai adatok, és az ezek segítségével létrehozott genetikai, anyagcsere, jelátviteli, fehérje-fehérje kölcsönhatásokat leíró útvonalak, hálózatok.

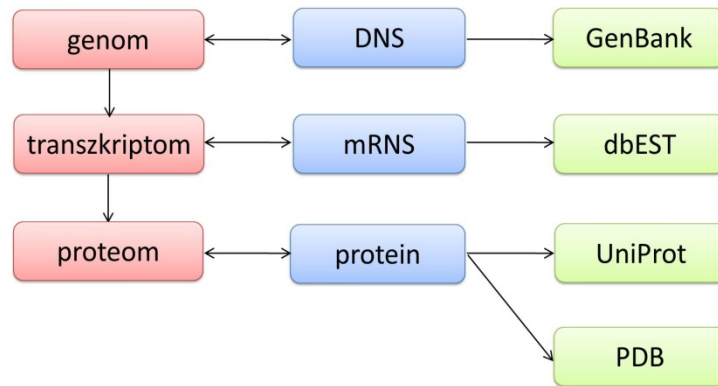
A bioinformatika a molekuláris biológián túl az egyik fő eszköztárát biztosítja a születőfélben lévő **rendszerbiológiának** is. Ez a diszciplína a természettudomány hagyományos redukcionista megközelítését kiegészítő, többek között a HTP módszerekkel hatalmas mennyiségben előállított és feldolgozható információra alapozva holisztikus kérdésfelvetéseket is lehetővé tesz. A rendszerbiológia részét képezik az „omika” tudományok, amely a genomikával (a **genom**, azaz egy organizmus teljes genetikai állományának vizsgálata) indult, majd ennek a kifejezésnek a mintájára született meg a proteomika (a **proteom**, egy faj vagy például egy sejttípus összes fehérjéjének leírása és vizsgálata), a transzkriptomika (a teljes átíródott RNS készlet, a **transzkriptom** feltárása), az interaktomika (egy faj vagy sejttípus összes fehérje-fehérje kölcsönhatását, az **interaktomot** feltáró kutatási terület). De folytatható a sor, hiszen vizsgálhatjuk az anyagcserében résztvevő összes metabolitot (metabolom), az összes biológia szereppel bíró lipidet (lipidom), az összes szénhidrátot (glikom), az összes protein-kináz enzimet (kinom) és így tovább.

Ebben a fejezetben bemutatjuk a nukleinsav és fehérje szekvenciákat valamint a térszerkezeteket tartalmazó, ún. elsődleges adatbázisokat. Utána röviden összefoglaljuk a szekvenciaelemzés alapjait. A géntechnológiai kísérleteknél, a molekuláris klónozás során felmerülő bioinformatikai feladatokat (restrikciós helyek térképezése, oligonukleotid primerek tervezése) röviden érintjük, további részletekkel a **Géntechnológia** e-jegyzet foglalkozik. A szekvenciaelemzés első lépései a hasonlóságvizsgálat és a szekvenciaillesztés. Az utóbbiból már molekuláris evolúciós következtetéseket is lehet vonni (például filogenetikai elemzés). A nukleotid és aminosav szekvenciákból predikciós (jósló) eljárásokkal a nukleinsavak és fehérjék szerkezeti és funkcionális elemeire lehet következtetni. Ne feledjük, ezek az *in silico* eredmények csak előrejelzések, amelyeket később kísérletesen is igazolni kell! Elvileg az aminosavak sorrendje meghatározza az adott fehérje térszerkezetét is (lásd az ezt bizonyító Anfinsen-kísérletet), de ezt az információt bioinformatikai módszerekkel ma még csak korlátozottan lehet kinyerni, a fehérjék térszerkezetét modellezni. Ezzel szemben egyszerű szerkezeti bioinformatikai feladat a fehérjék térszerkezetének ábrázolása. Ha az általunk ábrázolni kívánt fehérje térszerkezetét valamilyen kísérletes vagy *in silico* módszerrel (röntgenkristallográfia, NMR spektroszkópia, homológia modellezés) már meghatározták, akkor a vizualizációhoz mindössze az adott fehérje térszerkezeti koordinátáit standardizált formában tartalmazó fájlra és egy **molekuláris grafikai programra** van szükségünk. Ezek rövid bemutatásával zárul a fejezet.

11.2. Szekvencia és térszerkezeti adatbázisok

Egy biológus számára a leggyakoribb bioinformatikai alkalmazás az interneten szabadon hozzáférhető ún. elsődleges adatbázisokban való keresés. Ebbe a kategóriába elsősorban a szekvencia és térszerkezeti adatbázisok tartoznak, de ide sorolhatók az „omika” tudományok kísérleteken alapuló adatait tároló adatbázisok is (például az összes

ismert fehérje-fehérje kölcsönhatást, az összes lipidet, szénhidrátot vagy a metabolitokat tartalmazó adatbázisok). A DNS-szekvenciák legfontosabb adatbázisa, a **GenBank**, amely az **Entrez** bioinformatikai portál része. A legismertebb fehérjeszekvencia adatbázis az **UniProt**, amely az **ExpASY** portál része. A polipeptidláncok aminosav szekvenciáját döntő többségében a nukleinsavak szekvenálásával (és nem a technikailag jóval nehezebb fehérje szekvenálással), bioinformatikai úton, a genetikai kódszótár ismeretében *in silico* translációval határozzák meg. Ugyanakkor megemlítendő, hogy a kísérletes fehérjeszintű szekvenálás is egy elérhető lehetőség (pl. egy tömegspektroszkópián alapuló szekvenálós módszerrel vagy Edman degradáció révén). A makromolekulák (fehérjék, nukleinsavak és komplexeik) kísérletesen meghatározott térszerkezeti adatainak kizárólagos tárhelye a **Protein Data Bank (PDB)**. A szekvencia és/vagy térszerkezeti információ feldolgozásából származó adatokat tartalmaznak a másodlagos adatbázisok, amelyek közül néhányat szintén röviden tárgyalunk. A bioinformatika által vizsgált szekvenciák/szerkezetek és az adatbázisok összefüggését a **11-1. ábra** foglalja össze.



11.1. ábra. Az információhordozó makromolekulák és az elsődleges adatbázisok összefüggése.

11.2.1. Genbank

A **GenBank** (ncbi.nlm.nih.gov/genbank) DNS szekvencia adatbázis, amelyet az USA Nemzeti Egészségügyi Hivatalához (NIH: National Institutes of Health) tartozó NCBI (National Center for Biotechnology Information) tart fenn. A GenBank jelenleg ~150 Gbp (milliárd bázispár) szekvenciát tartalmaz (2012 ősz). Redundáns adatbázis, tehát egy-egy DNS szekvencia többször is megtalálható benne (pl. egyedi klónozás vagy genom szekvenálás keretében is meghatározták). A DNS szekvencia adatbázisok méretét manapság elsősorban a genom projektek (egy organizmus teljes DNS állományának szekvenálása) növelik. Jelenleg már több mint ezer faj teljes genomját ismerjük, köztük a saját fajunkét is. 2003-ben fejeződött be a **Humán Genom Program** (www.ornl.gov/Human_Genome), azaz a 3,2 Gbp méretű emberi genom szekvenálása (pontosabban csak a genom ~90%-át kitevő, génekben gazdag eukromatint szekvenálták), amely a GenBank-ben és más publikus adatbázisokon keresztül mindenki számára szabadon hozzáférhető. A GenBank annotált adatbázis, ami az jelenti, hogy a „nyers” szekvencia adatokhoz hozzárendelt információkat is tartalmaz (a szekvencia forrása, a szekvenciával kapcsolatos tudományos közlemények, gének illetve kódoló szekvenciák). Nukleinsav szekvenciákat és a bioinformatikai analízisükből levont következtetéseket csak a GenBank-be történő feltöltésük, azaz a tudományos közösség számára történő szabad hozzáférés biztosítása után szabad tudományos közleményben megjelentetni. Az NCBI honlap főoldalát a **11.2. ábra**, egy GenBank fájl (a Taq polimeráz gén szekvenciáját tartalmazó fájl egy részlete) pedig a **11.3. ábra** mutat be. Ismeretlen nukleinsav szekvencia azonosítására vagy hasonlóságvizsgálatára (a későbbiekben ismertett **BLAST** programmal) leggyakrabban a GenBank adatbázist használjuk, s az eredmények az adatbázisban található szekvencia fájlok lesznek, amelyeket egy hozzáférési kóddal (*accession number*) azonosítuk (pl. D32013 a 11.3. ábrán).

The screenshot shows the NCBI homepage with the following elements:

- Header:** NCBI logo, "Resources" and "How To" dropdown menus, and a "Sign in to NCBI" link.
- Search Bar:** A search input field with a "Search" button and a "All Databases" dropdown menu.
- Left Navigation Menu:**
 - NCBI Home
 - Resource List (A-Z)
 - All Resources
 - Chemicals & Bioassays
 - Data & Software
 - DNA & RNA
 - Domains & Structures
 - Genes & Expression
 - Genetics & Medicine
 - Genomes & Maps
 - Homology
 - Literature
 - Proteins
 - Sequence Analysis
 - Taxonomy
 - Training & Tutorials
 - Variation
- Main Content Area:**
 - Welcome to NCBI:** A paragraph stating the center's mission to advance science and health through biomedical and genomic information, with links for "About the NCBI", "Mission", "Organization", "Research", and "RSS Feeds".
 - Get Started:** A list of links: "Tools" (Analyze data using NCBI software), "Downloads" (Get NCBI data or software), "How-To's" (Learn how to accomplish specific tasks at NCBI), and "Submissions" (Submit data to GenBank or other NCBI databases).
 - NCBI YouTube channel:** A video player showing a thumbnail for "Learn how to get the most out of NCBI tools and databases with video tutorials on the NCBI YouTube Channel." with a "GO" button.
- Right Side:**
 - Popular Resources:** A list of links including PubMed, Bookshelf, PubMed Central, PubMed Health, BLAST, Nucleotide, Genome, SNP, Gene, Protein, and PubChem.
 - NCBI Announcements:** A section titled "New version of Genome Workbench available" dated "06 Sep 2012", describing an integrated, downloadable application for viewing and analyzing sequence data.

11.2. ábra. Az NCBI honlapja (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Megjelöltünk a szövegben szereplő néhány adatbázist illetve programot.

Thermus aquaticus gene for DNA polymerase, complete cds

GenBank: D32013.1

```

LOCUS       TTHDNAP                3026 bp    DNA    linear    BCT 26-JAN-2008
DEFINITION Thermus aquaticus gene for DNA polymerase, complete cds.
ACCESSION   D32013
VERSION     D32013.1  GI:507890
KEYWORDS    .
SOURCE      Thermus aquaticus
  ORGANISM  Thermus aquaticus
             Bacteria; Deinococcus-Thermus; Deinococci; Thermales; Thermaceae;
             Thermus.
REFERENCE   1
AUTHORS     Ishino,Y., Ueno,T., Miyagi,M., Uemori,T., Imamura,M., Tsunasawa,S.
             and Kato,I.
TITLE       Overproduction of Thermus aquaticus DNA polymerase and its
             structural analysis by ion-spray mass spectrometry
JOURNAL     J. Biochem. 116 (5), 1019-1024 (1994)
PUBMED      7896728
CDS         1..2499
             /EC_number="2.7.7.7"
             /db_xref="GI:507891"
             /translation="MRGMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVQAV
             YGFAKSLKALKEDGDAVIVVFDKAPSPFRHEAYGGYKAGRAPTPEDFPRLALIKEL
             VDLGLARLEVPGEADDVLAASLAKAEKEGYEVRIILTADKDYQLLSDRIHALHEG
             YLITPAWLWEKYGLRDPQWADYRALTCDES DNLPGVKIGERTARKLLEEWGSLEALL
             KNLDRLKPAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPRERLRAPLERL
             EFGSLLEHFEGLLESPKALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHR
             APEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLLPPGDDPMLLAYLLDPSNTTPEGVAR
             RYGGWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAMHEATGVR
             LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERLVFDELGLPAIGKTEK
             TGRKRTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNO
             TATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAPIAEEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG
             DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGVPREAVDPLMRAAKTINFGVLYGMSAHLRSLQEL
             AIPYEEAQAFIERVYFQSFPKVRAWIEKTLLEGRRRGVVEFLFGRRRYVPDLEARVKS
             REAAERMAFMFVQGTAADLMKMLAVKLFPRLEEMGARMLLQVHDELVLEAPKERAEA
             VARLAKEVMEGVYPLAVPLEVEVIGEDWLSAKE"
ORIGIN
1 atgaggggga tgctgcccct ctttgagccc aagggccggg tcctcctggt ggacggccc
61 caccctggct acgcacactt ccacgccctg aagggcctca ccaccagccg gggggagccg
121 gtgcagggcg tctacggctt cgccaagagc ctcctcaagg ccctcaagga ggacggggac
181 gcggtgatcg tggcttttga cgccaaggcc ccctccttcc gccacgagcc ctacgggggg
241 tacaagggcg gccggggccc cagccgggag gactttcccc ggcaactcgc cctcatcaag
301 gagctggtgg acctcctggg gctggcgccg ctcgaggtcc cgggctacga ggcggacgac

```

11.3. ábra. Példa egy GenBank fájlra.

A GenBank az **Entrez** portál (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery) része, amely egy olyan integrált, adatbázisokat összefogó keresőfelület, ahonnan a molekuláris biológiával kapcsolatos szinte összes információ valamilyen formában elérhető. Ide tartozik a **PubMed** (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) publikációs adatbázis is, amelyen keresztül a biomedicina tárgykörébe tartozó (a biokémia és a molekuláris szintű biológia szinte összes folyóiratát lefedő) >20 millió tudományos cikk bibliográfiai adatai és összefoglalója (*abstract*) olvasható. Egyre több esetben, többek között az ún. nyílt hozzáférésű (*open access*) folyóiratoknál, a teljes közlemények is ingyenesen olvashatók vagy letölthetők pdf formátumban. A **Bookshelf** online könyvtárban számos tankönyv (bár nem minden esetben a legújabb kiadás) teljes terjedelmében hozzáférhető (pl. **Stryer: Biochemistry**, **Lodish et al.: Molecular Cell Biology**, **Alberts et al.: Molecular Biology of the Cell**). A portálon elérhető adatbázisok keresőoldalát a **11.4. ábra** mutatja be.

NCBI Resources How To

GQuery

Global Cross-database NCBI Search

Search NCBI databases

Literature

- PubMed : scientific & medical abstracts/citations
- PubMed Central : full-text journal articles
- NLM Catalog : books, journals and more in the NLM Collections
- MeSH : ontology used for PubMed indexing
- Books : books and reports
- Site Search : NCBI web and FTP site index

Health

- PubMed Health : clinical effectiveness, disease and drug reports
- MedGen : medical genetics literature and links
- GTR : genetic testing registry
- dbGaP : genotype/phenotype interaction studies
- ClinVar : human variations of clinical significance
- OMIM : online mendelian inheritance in man
- OMIA : online mendelian inheritance in animals

11.4. ábra. Az Entrez portál adatbázis kereső oldala (kiemelve azok, amelyek a szövegben említésre kerülnek).

Az Entrez portálon keresztül elérhető adatbázisok közül megemlítjük a **Genome** adatbázist, amely teljes genom szekvenciákat tartalmaz; a **dbEST** (*Expressed Sequence Tag*) adatbázist, amely cDNS szekvencia részleteket, azaz transzkriptumokat, a génekről átírt szekvenciákat tartalmaz; s végül az **OMIM** (*Online Mendelian Inheritance in Man*) adatbázist, amely az összes, humán betegségekkel kapcsolatba hozható génről tartalmaz részletes genetikai és biokémiai információkat. Genom szekvenciákat tárol az **Ensembl** (<http://www.ensembl.org>) adatbázis is, amelyet az Európai Molekuláris Biológiai Laboratóriumhoz (EMBL) tartozó Európai Bioinformatikai Intézet (EBI, <http://www.ebi.ac.uk/>) és a brit non-profit kutatóintézet, a Wellcome Trust Sanger Intézet tart fenn. Az EMBL egy nukleotid szekvencia adatbázist is fenntart, amely a GenBank-kel azonos adatokat tartalmaz.

11.2.2. UniProt

Az **UniProt** (uniprot.org) annotált, nem-redundáns, aminosav szekvencia adatbázis, amely két részadatbázisból épül fel. A Swiss-Prot adatbázis kizárólag kísérletesen is igazolt, fehérjékre vonatkozó, manuálisan annotált, szakmai hivatkozásokból összegyűjtött információt (jelenleg >500.000 annotált fájlban ~200 millió aminosav), a TrEMBL pedig az EMBL DNS adatbázisából automatikus translációval generált polipeptidlánc szekvenciákat (jelenleg ~8 milliárd aminosav 24 millió szekvenciában) tartalmaz. Az annotáció tartalmazza az adott fehérje alternatív változatait (amelyek alternatív splicing-gal jönnek létre), a szekvencia variációkat, a fehérjecsáládra vonatkozó információkat, szerkezeti és funkcionális elemeket, poszt-transzlációs módosításokat, kereszthivatkozásokat nukleotid, szerkezeti és másodlagos adatbázisokra, szakirodalmi hivatkozásokat. Fontos annotáció az ún. **gén ontológia** (GO: [Gene Ontology](http://www.geneontology.org)), a génekre és géntermékekre vonatkozó standardizált funkcionális „szótár”, amely az adott fehérje biológiai szerepét (*Biological process*), molekuláris funkcióját (*Molecular function*) és lokalizációját (*Cellular component*) írja le. Egy UniProt mintafájl (humán vázizom α -aktin, UniProt kód: P68133) a **11.5. és 11.6. ábra** mutat be. Tudományos közleményekben a fehérjék szekvenciáira az UniProt kódjuk (6 alfanumerikus karakter) vagy a GenBank elérési kódjuk (1 betű és 5 szám vagy 2 betű és 6 szám) alapján szokás hivatkozni. Az adatbázis használatát a honlapján elérhető angol nyelvű animált [oktatóprogram](#) segítségével könnyen megérthetjük.

P68133 (ACTS_HUMAN) Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot
 Last modified October 3, 2012. Version 95. [History...](#) Contribute
[Send feedback](#)
[Read comments \(0\)](#) or [add your own](#)

← **A fehérje UniProt kódja: P68133**

Clusters with 100%, 90%, 50% identity | Documents (6) | Third-party data [text](#) [xml](#) [rdf/xml](#) [gif](#) [fasta](#)

Names Attributes General annotation Ontologies Sequence annotation Sequences References Web links Cross-refs Entry info Documents Customize order

Names and origin

Protein names	Recommended name: Actin, alpha skeletal muscle Alternative name(s): Alpha-actin-1	← A fehérje neve: vázizom α-aktin
Gene names	Name: ACTA1 Synonyms: ACTA	← A gén hivatalos neve: ACTA1
Organism	Homo sapiens (Human) [Reference proteome]	← A faj amiből származik: humán
Taxonomic identifier	9606 [NCBI]	
Taxonomic lineage	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria › Euarchontoglires › Primates › Haplorhini › Catarrhini › Hominoidea › Homo	← Taxonómia

Protein attributes

Sequence length	377 AA	← A szekvencia hossza: 377 aminosav
Sequence status	Complete.	
Sequence processing	The displayed sequence is further processed into a mature form.	
Protein existence	Evidence at protein level	

General annotation (Comments)

← **Annotáció: fehérje funkciója, alegyszerszerkezete, sejten belüli lokalizációja, betegségekkel való kapcsolata stb.**

Function	Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells.
Subunit structure	Polymerization of globular actin (G-actin) leads to a structural filament (F-actin) in the form of a two-stranded helix. Each actin can bind to 4 others. Interacts with TTID. Interacts (via its C-terminus) with USP25; the interaction occurs for all USP25 isoforms but is strongest for isoform USP25m in muscle differentiating cells. [Ref.3] [Ref.8]
Subcellular location	Cytoplasm › cytoskeleton.
Post-translational modification	Oxidation of Met46 by MICALs (MICAL1, MICAL2 or MICAL3) to form methionine sulfoxide promotes actin filament depolymerization. Methionine sulfoxide is produced stereospecifically, but it is not known whether the (S)-S-oxide or the (R)-S-oxide is produced. [By similarity]
Involvement in disease	Defects in ACTA1 are the cause of nemaline myopathy type 3 (NEM3) [MM 161800]. A form of nemaline myopathy. Nemaline myopathies are muscular disorders characterized by muscle weakness of varying severity and onset, and abnormal thread- or rod-like structures in muscle fibers on histologic examination. The phenotype at histological level is variable. Some patients present areas devoid of oxidative activity containing (cores) within myofibers. Core lesions are unstructured and poorly circumscribed. [Ref.3] [Ref.14] [Ref.15] [Ref.17] [Ref.18] [Ref.20] [Ref.21] [Ref.22] [Ref.23] [Ref.25]

11.5. ábra. Egy UniProt fehérje szekvencia mintafájl (név, általános annotáció).

Secondary structure

1 377
 Helix Strand Turn
 Details...

A humán vázizom aktin másodlagos szerkezete

Sequences

Sequence	Length	Mass (Da)	Tools
<input type="checkbox"/> P68133 [UniParc].	FASTA	377	42,051 Blast go

Last modified July 21, 1996. Version 1.
 Checksum: DF2A3A046346A179

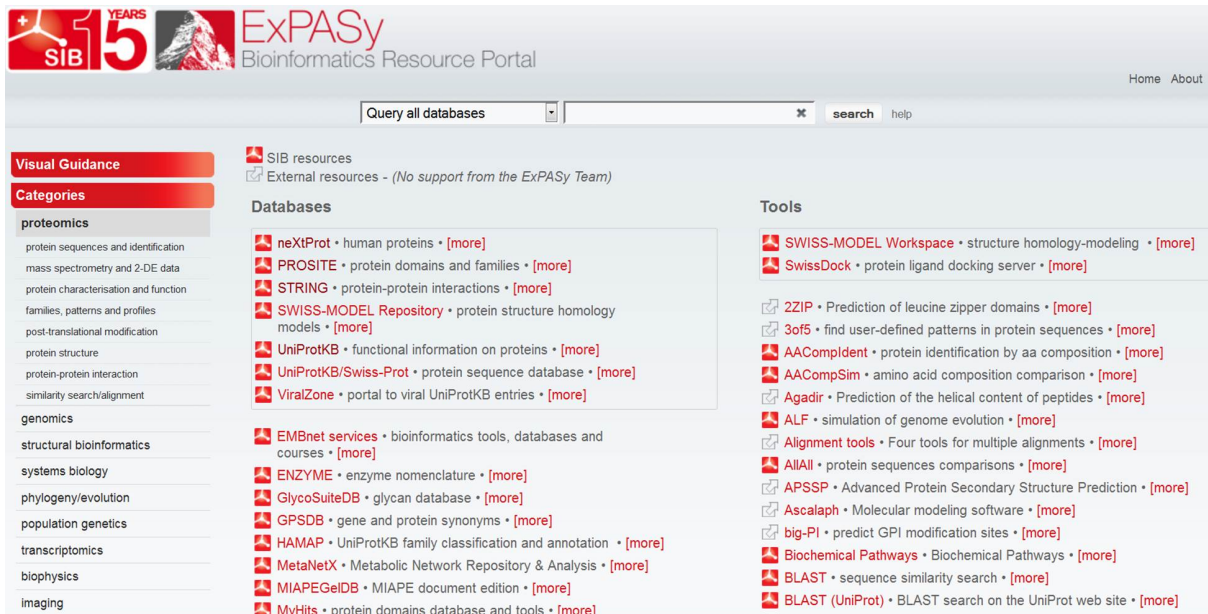
```

10      20      30      40      50      60
MCDEDETTAL VCDNGSGLVR AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHQGMVGMG QKDSYVGDEA
70      80      90     100     110     120
QSKRGLLRLR YPIEHGIITN WDMEKIWHH TFYNELRVAP EEHPTLLTEA PLNPKANKER
130     140     150     160     170     180
MTQIMFETFN VPAMYVAIQV VLSLYASGRV TGIVLDSGDG VTHNVPIYEG YALPHAIMRL
190     200     210     220     230     240
DLAGRLDLDY LMKILTERGY SFVPTAEREI VRDIKEKLCY VALDFENEMA TAASSSSLER
250     260     270     280     290     300
SYELPDGQVI TIGNERFRCP ETLFQPSFIG MESAGIHETT YNSIMKCID IRKDYANNV
310     320     330     340     350     360
MSGGTTMYPG IADRMQKEIT ALAPSTMKIK IIAPPERKYS VWIGGSILAS LSTFQQMWIT
370
KQEYDEAGPS IVHRKCF
    
```

A P68133 elérési kódú humán vázizom aktin (α-aktin) szekvenciája . 377 aminosavból áll, molekulatömege 42.051 Dalton

11.6. ábra. Egy UniProt fehérje szekvencia mintafájl (szekvencia, másodlagos szerkezet).

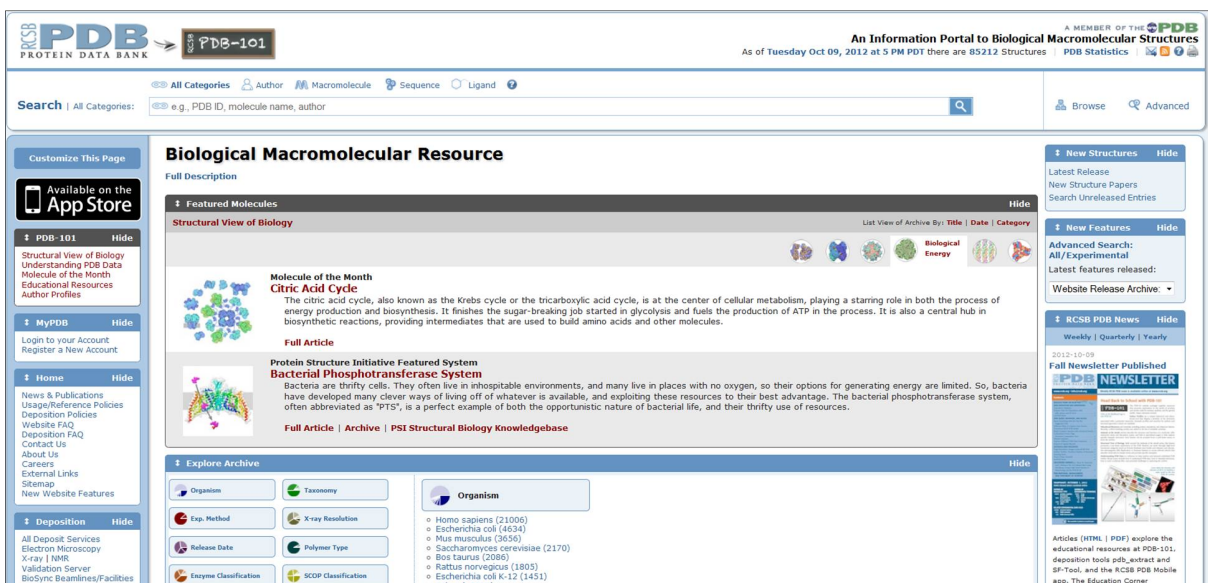
Az UniProt adatbázis az **ExPASy** (*Expert Protein Analysis System*; expasy.org/) portálhoz kapcsolódik, amelyen keresztül számos proteomikai adatbázist, másodlagos adatbázisokat és online bioinformatikai programot (DNS→fehérje transláció, molekulatömeg és izoelektromos pont számolás, szerkezeti és funkcionális motívum, poszt-transzlációs módosítások keresése, szerkezeti predikciók stb.) lehet elérni. A portál egy részletét a **11.7. ábrán** mutatjuk be (adatbázisok és szekvencia analízis programok keresőfelülete).



11.7. ábra. Az ExPASy bioinformatikai portál egy részlete.

11.2.3. Protein Data Bank (PDB)

A PDB (www.rcsb.org/pdb) adatbázisban jelenleg 75.000 röntgen-krisztallográfiai és közel 10.000 NMR szerkezetet tárolnak (ezzel a két módszerrel lehet a makromolekulák térszerkezetét atomi felbontásban meghatározni). Az annotált fájlok a térszerkezeti koordináta adatokon kívül számos további információt is tartalmaznak. Az adatbázis kezdőoldalát és egy szerkezeti fájl részletét a **11.8. és 11.9. ábra** mutatja be. Az egyes térszerkezeteket egy számból és három betűből álló kód alapján lehet azonosítani (pl. 1GFL a GFP fehérje egyik térszerkezeti modellje). A szerkezeti modelleket online a [Jmol](#) elnevezésű kisalkalmazással (applet) vagy a koordináta fájlok letöltése után egyéb molekuláris grafikai programokkal lehet vizualizálni. A PDB főoldaláról érhető el a „Hónap molekulája” oldal ([Molecule of the Month](#)), amely egy-egy biológiai szempontból izgalmas fehérje szerkezetét és működését mutatja be röviden és közérthetően. Kitűnő oktatási segédanyagok is elérhetők a PDB honlapon keresztül, mint például az a poszter ([Tour of the Protein Data Bank](#)), amely több tucat fontos fehérje (enzimek, motor-, membrán- és DNS-kötő fehérjék, fehérjekomplexek) térszerkezetét ábrázolja, méretarányosan. Az oktatási anyagok a [PDB-101](#) weboldalon találhatóak (An Educational Resource for Exploring a Structural View of Biology).



11.8. ábra. A PDB adatbázis (dinamikusan változó) honlapja.

The screenshot shows the PDB website interface for the entry 1GFL. The main content area displays the title "STRUCTURE OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN" and the DOI "10.2210/pdb1gfl/pdb". It includes a primary citation: "The molecular structure of green fluorescent protein." by Yang, F., Moss, L.G., Phillips Jr., G.N. (1996) Nat. Biotechnol. 14: 1246-1251. The abstract states: "The crystal structure of recombinant wild-type green fluorescent protein (GFP) has been solved to a resolution of 1.9 Å by multiwavelength anomalous dispersion phasing methods. The protein is in the shape of a cylinder, comprising 11 strands of beta-sheet with...". The molecular description section lists: Classification: Fluorescent Protein; Structure Weight: 53783.00; Molecule: GREEN FLUORESCENT PROTEIN; Polymer: 1; Type: protein; Length: 238; Chains: A, B; Mutation: Q80R; Organism: Aequorea victoria; UniProtKB: P42212. On the right, there is a 3D ribbon diagram of the protein structure, labeled "1GFL", and a "Biological Assembly" section with a "View in Jmol" button.

11.9. ábra. A PDB adatbázisból egy mintafájl (GFP) részlete.

11.3. Bevezetés a szekvenciák bioinformatikai analízisébe

11.3.1. Bioinformatikai feladatok a molekuláris klónozás során

Egy **rekombináns DNS** konstrukció (lásd 10. fejezet) megtervezése során a vektorban illetve az inszertben található potenciális restriktációs endonukleáz felismerőhelyeket ismernünk kell. Megtalálásuk, amely a restriktációs térképezés része, a legegyszerűbben online elérhető programokkal lehetséges. Erre példák a **NEBCutter** vagy a **RestrictionMapper** programok. Célszerű a készülő rekombináns DNS konstrukcióról géntérképet rajzolni, amely célra szintén számos letölthető vagy online program alkalmas (pl. **pDRAW**, **BioEdit**). Egy másik gyakori bioinformatikai feladat például a PCR reakciókhoz, *in vitro* mutagenézishez vagy szekvenáláshoz oligonukleotid primereket tervezni. Ezt a feladatot is könnyen megoldhatjuk online elérhető programok segítségével (pl. **Primer3**, **Oligo**). A polimeráz láncreakciók és számos más géntechnológiai feladat (szekvenálás, hely-specifikus mutagenézis, génkiütés, géncsendesítés stb.) kivitelezése előtt sokszor magunknak kell megterveznünk a kísérlethez szükséges oligonukleotid primereket. Erre a célra is számos szintén vagy letölthető vagy online elérhető program áll rendelkezésünkre (pl. **Primer3**, **OligoCalc**).

11.3.2. Hasonlóságvizsgálat és szekvencia-illesztés

A DNS szekvenciák hasonlóságvizsgálata segítségével megtudhatjuk, hogy például az általunk szekvenált DNS megtalálható-e már az adatbázisokban, másrészt hogy milyen szekvenciákkal áll evolúciós rokonságban (**homológia** vizsgálat). Az egyszerű hasonlóságvizsgálatnál egyetlen szekvenciát hasonlítunk össze egy teljes szekvencia adatbázissal (lásd **BLAST program**), míg a homológia vizsgálatára a többszörös szekvencia-illesztés módszer a legalkalmasabb (lásd **ClustalW program**). Akár nukleotid, akár aminosav szekvenciákat hasonlítunk össze, a különböző fajokban található, azonos funkciójú DNS/RNS vagy fehérjelánc egymás **ortológia**, egy fajon belül génduplikációval keletkező, hasonló funkciójú gének és géntermékek pedig **paralógok**. Evolúciós törzsfák készítésével ebben a jegyzetben nem foglalkozunk, azokkal bioinformatikai kurzusokon ismerkedhetnek meg.

11.3.2.1. A BLAST program

Egy ismeretlen nukleotid-, vagy aminosav szekvencia azonosítását hasonlóságvizsgálattal kezdjük. Az interneten hozzáférhető programok közül a **BLAST** (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) nevű programot ismertetjük, s ezt fogják használni a gyakorlaton is (az NCBI BLAST programja itt érhető el: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>,

de számos más bioinformatikai szerver is tartalmazza). Ez a program 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. Fontos, hogy a kereső szekvenciát az ún. FASTA formátumban (**11.10. ábra**) kell bevinni a keresőprogramba.

```
>gi|5524211|gb|AAD44166.1| cytochrome b [Elephas maximus maximus]
      (az első sor kimaradhat)
LCLYTHIGRNIYYGSYLYSETWNTGIMLLITMATAFMGYVLPWGQMSFWGATVITNLFSAIPYIGTNLV
EWIWWGFSVDKATLNRFFAFHFILPFTMVALAGVHLTFLHETGSNNPLGLTSDSDKIPFHPYYTIKDFLG
LLILILLLLLLLALLSPDMLGDPDNHMPADPLNTPHLIKPEWYFLFAYAILRSVPNKLGGVLALFLSIVIL
GLMPFLHTSKHRSMMLRPLSQALFWTLTMDLLTLTWIGSQPVEYPYTIIGQMASILYFSIILAFLPIAGX
IENY
```

11.10. ábra. A FASTA szekvencia formátum.

Amennyiben nukleotidszekvenciával keresünk, akkor a BLASTN alprogramot kell használnunk. Ha proteinszekvenciánk van, akkor a BLASTP alprogrammal fehérje adatbázisokban kereshetünk. A BLASTX alprogram a kereső nukleinsav szekvenciát mind a hat leolvasási keretben lefordítja és ezzel keres a fehérje adatbázisban. A TBLAST alprogramok segítségével lefordított nukleinsav adatbázisokban kereshetünk fehérje- (TBLASTN) vagy lefordított nukleinsav szekvenciákkal (TBLASTX). A keresési lehetőségeket az alábbi táblázat foglalja össze:

<i>Program</i>	<i>Kereső szekvencia</i>	<i>Célszekvencia</i>
BLASTN	Nukleotid	Nukleotid
BLASTP	Protein	Protein
BLASTX	Nukleotid, 6 leolvasási keretben	Protein
TBLASTN	Protein	Nukleotid, 6 leolvasási keretben
TBLASTX	Nukleotid, 6 leolvasási keretben	Nukleotid, 6 leolvasási keretben

11.I. táblázat: A BLAST részprogramjai.

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. Ezek közül leggyakrabban az ún. **BLOSUM** (**BLO**cks **SUB**stitution **MAT**rix) mátrixokat használják. Ha $E < 0,01$, akkor a két szekvencia minden bizonnyal homológ (azaz evolúciós rokonságot mutat, közös ősből származik). 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 információhoz jutunk, ha az eddig fellelt adatok alapján megkeressük a fehérjénket az UniProt adatbázisban, ahonnan linkeken keresztül még számos adatbázist is felkereshetünk. Egy BLAST futtatás eredményét (részlet) a **11.11. ábra** mutatja be (a BLASTP programmal UniProt fehérje adatbázison futtattuk le a humán vázizom aktin szekvenciáját).

Alignments	Entry	Entry name	Status	Protein names	Organism	Length	Identity	Score	E-value	Gene names
	M7AKZ6	M7AKZ6_CHEMY	★	Actin, alpha skeletal muscle	Chelonia mydas (Green sea-turtle) (Chelonia agassizi)	377	100.0%	1,975	0.0	UY3_17810
	L7MZF2	L7MZF2_ANOCA	★	Uncharacterized protein	Anolis carolinensis (Green anole) (American chameleon)	377	100.0%	1,975	0.0	ACTA1
	K7F4I9	K7F4I9_PELSI	★	Uncharacterized protein	Pelodiscus sinensis (Chinese softshell turtle) (Trionyx sinensis)	377	100.0%	1,975	0.0	ACTA1
	J3SBR4	J3SBR4_CROAD	★	Actin, alpha skeletal muscle	Crotalus adamanteus (Eastern diamondback rattlesnake)	377	100.0%	1,975	0.0	
	I3N266	I3N266_SPETR	★	Uncharacterized protein	Spermophilus tridecemlineatus (Thirteen-lined ground squirrel) (Ictidomys tridecemlineatus)	377	100.0%	1,975	0.0	ACTA1
	H0VGS3	H0VGS3_CAVPO	★	Uncharacterized protein	Cavia porcellus (Guinea pig)	377	100.0%	1,975	0.0	LOC100716933
	H0XEG0	H0XEG0_OTOGA	★	Uncharacterized protein	Otolemur garnettii (Small-eared galago) (Garnett's greater bushbaby)	377	100.0%	1,975	0.0	ACTA1
	G3WM41	G3WM41_SARHA	★	Uncharacterized protein	Sarcophilus harrisii (Tasmanian devil) (Sarcophilus lanianus)	377	100.0%	1,975	0.0	ACTA1
	G3SXX7	G3SXX7_LOXAF	★	Uncharacterized protein	Loxodonta africana (African elephant)	377	100.0%	1,975	0.0	LOC100661558
	F7HM15	F7HM15_MACMU	★	Uncharacterized protein	Macaca mulatta (Rhesus macaque)	377	100.0%	1,975	0.0	ACTA1
	F7CZ92	F7CZ92_HORSE	★	Uncharacterized protein	Equus caballus (Horse)	377	100.0%	1,975	0.0	ACTA1

11.11. ábra. BLAST programmal történő szekvencia hasonlóságvizsgálat eredménye (részlet).

Fontos megjegyezni, hogy a **térszerkezetek összehasonlítása alapján könnyebb a távolabbi fehérje rokonságokat feltárni, mint a szekvenciák vizsgálatából** (bár mint láttuk, sokkal több szekvencia, mint térszerkezeti információval rendelkezünk, tehát a fehérje evolúció kutatói többen foglalkoznak az elsődleges szekvenciák összehasonlításával). A térszerkezeti hasonlóság vizsgálatával mesterszintű bioinformatikai kurzusokon ismerkedhetnek meg.

11.3.2.2. Többszörös szekvencia-illesztés

A hasonlóságvizsgálat „kifinomultabb” módja, ha több nukleinsav vagy fehérje szekvenciát megpróbálunk úgy egymás alá illeszteni, hogy a lehető legtöbb pozícióban azonos vagy egymáshoz hasonló nukleotidok/aminosavak legyenek. Az optimális illesztés érdekében megengedünk az egymás alatti sorokban „szóközöket” is (gap). Amennyiben konzervatív régió(ka)t találunk a szekvencián belül, azok jó eséllyel valamilyen szerkezeti elem vagy funkcionális motívum jelenlétére utalnak. A többszörös illesztésre leggyakrabban a **ClustalW** programot és származékait használjuk, amely elérhető az ExpASy portálon (embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html) vagy az Európai Bioinformatikai Intézet portálján keresztül (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). A **11.12. ábrán** a humán hemoglobin alfa és béta alegységeit és a mioglobint illesztettük a ClustalW program segítségével. A szekvenciaillesztés legelső sorában a csillag azonos (invariáns) aminosavakat jelöl az adott pozícióban, míg a kettőspont erősebben, a egyszeres pont pedig gyengébben konzervatív pozíciókat jelöl. Az illesztésen belül a kötőjelek a „rések”, amelyeket a program az optimális illesztés érdekében szűrt be a szekvenciákba.

```

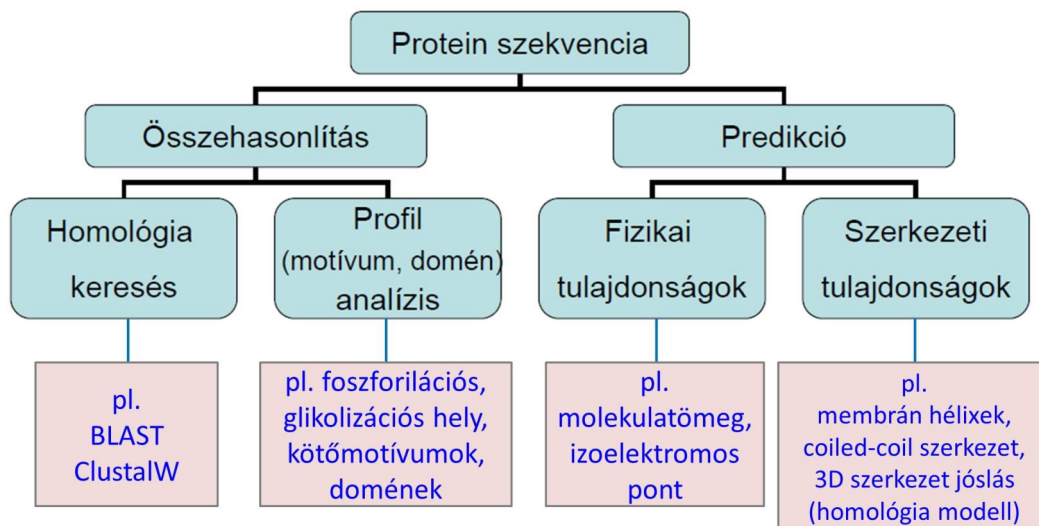
P69905 (HBB_HUMAN)  MV-LSPADKTNVKAAGKVGGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHF-DLSH-----GS 53
P68871 (HBB_HUMAN)  MVHLTPPEKSAVTALWGKV--NVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDVAMGN 58
P02144 (MYG_HUMAN)  -MGLSDGEWQLVLNVWGVKVEADIIPGHGQEVLIIRLRFKGPETLEKFKDKFKHLKSEDEMKAS 59
      : * : * * * * * * * * * * * * * * *
P69905 (HBB_HUMAN)  AQVKGHGKQVADALTNVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAH 113
P68871 (HBB_HUMAN)  PKVKAHGKKVLGAFSDGLAHLDNLKGTFTATLSELHCDKLVDPENFRLLGNVLVCVLAH 118
P02144 (MYG_HUMAN)  EDLKKHGATVLTALGGILKKKGHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISECIIQVLQSK 119
      : * * * * * : : : * * : : : : * :
P69905 (HBB_HUMAN)  LPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR----- 142
P68871 (HBB_HUMAN)  FGKEFTTPVQAAAYQKVVAGVANALAHKYH----- 147
P02144 (MYG_HUMAN)  HPGDFGADAQGAMNKALELFRKDMASNYKELGFG 154
      :* : : :* : : : *
    
```

11.12. ábra. A globin családba tartozó három fehérjelánc ClustalW programmal történő szekvencia illesztésének eredménye.

11.3.3. Fehérjeszekvenciák analízise

A fehérjeszekvenciákkal végezhető bioinformatikai elemzések lehetőségeit vázlatosan a **11.13. ábra** foglalja össze (a legtöbb analízist nukleinsav szekvenciákkal is el lehet végezni). Egyrészt a szekvenciákat egymással és az adatbázisokban megtalálható szekvenciákkal hasonlíthatjuk össze, másrészt a polipeptidlánc fizikai és szerkezeti (valamint a belőle következő funkcionális) tulajdonságaira nézve tehetünk jóslásokat. Az összehasonlításokkal az

előző fejezetben foglalkoztunk (BLAST és ClustalW programok). Az ún. profil analízis során a vizsgálandó szekvenciánkat olyan másodlagos adatbázisokkal hasonlítjuk össze, amelyekben a fehérjecsaládokra, szerkezeti és funkcionális doménekre, modulokra, foszforilációs, glikolizációs és egyéb poszttranszlációs módosulások konszenzus szekvenciáira vonatkozó információkat és szekvenciákat tárolnak. Erre a célra is számos online program alkalmas, amelyeket a korábban ismertetett bioinformatikai portálokon lehet elérni. Például az EBI portálon keresztül elérhető InterPro másodlagos adatbázis (valójában számos másodlagos adatbázist összefogó „szuperadatbázis”) az InterProScan programmal végezhető profil analízis, a PhosSitePlus adatbázisban pedig poszttranszlációs módosítások (foszforiláció, acetiláció) potenciális helyei kereshetők az analizálandó szekvenciában.



11.13. ábra. Fehérje szekvenciák bioinformatikai vizsgálatának lehetőségei.

11.4. Fehérjék térszerkezetének molekuláris grafikai ábrázolása

11.4.1. RasMol

A RasMol egy ingyenes, „standalone” molekuláris grafikai program. Segítségével egy atomi koordinátákat tartalmazó térszerkezeti fájl tartalma vizualizálható (*rendering*). Két ablakból áll. Az egyikben a modellezett fehérjeszerkezet jelenik meg, a másik az ún. parancsablak. A beolvasandó fájlnak megfelelő, pl. pdb formátumban kell lennie, amit a PDB adatbázisból tölthetünk le. Az először megjelenő ábrázolás a makromolekula szerkezetét „drót” modellként mutatja. Áttekinthetőbb a szerkezet, ha a „display” menüből a „backbone” (polipeptid gerinc) ábrázolást választjuk. Választható még a térkitöltő („spacefill”), pálcika („stick”), golyó-pálcika („ball & stick”) vagy a szalagábrázolás („ribbon”, „cartoon”) is. Az utóbbinál az α -héliceket szalag, míg a β -lánc másodlagos szerkezeti egységeket lapos nyíl reprezentálja.

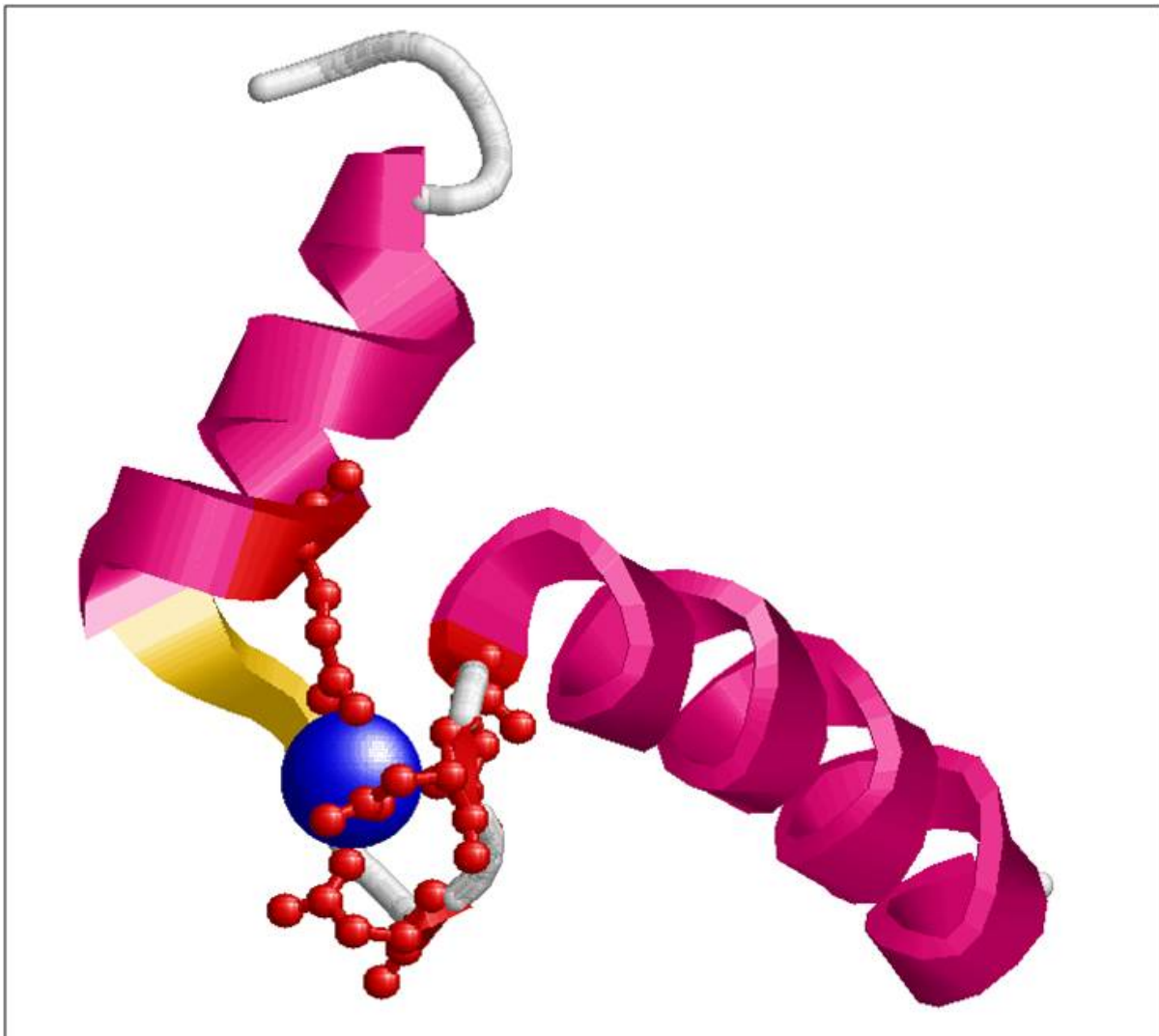
A modellt színezzhetjük a standard CPK atomszínekkel, az egyes láncokat külön színnel („chain”), az aminosavakat tulajdonságuk alapján („shapely”), a kristályon belüli mozgékonyaságuk alapján („temperature”) stb jelölhetjük. A CPK színskálában (az ezt kitaláló három kutató nevének első betűjéből származik az elnevezés) a hidrogén atomok fehérek, a szén atomok feketék (szürkék), a nitrogén atomok kékek és az oxigén atomok piros színűek.

A molekulát különböző síkokban el lehet vágni („slab” mód), sztereóban ábrázolni, a kristályban egyébként nem látható H-atomokat ábrázolni.

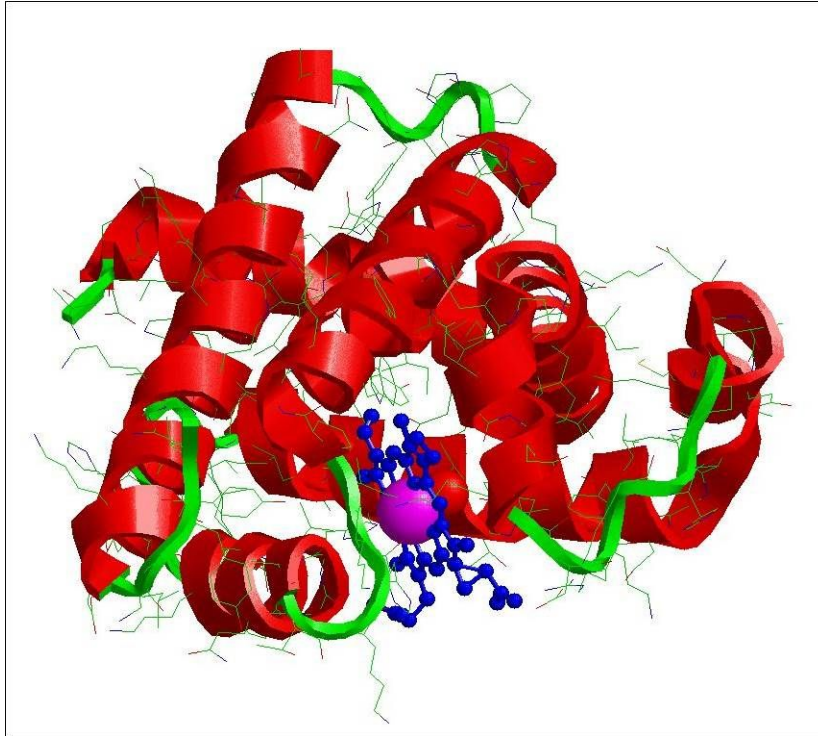
Az egér bal gombbal a molekula az 'x' és 'y' tengely mentén forgatható, a jobb gombbal balra-jobbra tologatható. A bal-shift gombbal nagyítható, kicsinyíthető. a jobb-shifttel a 'z' tengely mentén forgatható. A lánc bármely részletére rákattintva az egérrel, a parancsablakban megjelenik a kérdéses aminosav sorszáma az adott láncon belül, illetve az aminosav maradék atomtípusa és az atom sorszáma. Molekularészek kijelölése a parancsablakból

lehetséges. Az aminosavakat vagy sorszámukkal (pl. „select 25A”, a 25. aminosav az „A” láncban) vagy az aminosav névvel 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 (koenzim, szubsztrát, fémion), az „hetero” néven vagy a rövidített nevével szelektálható (pl. „ca” = 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” parancssal és az utána írt színnel (pl. „red”, „green”, „magenta” stb.) lehet. A hátteret a „background color” parancssal lehet átszínezni. Molekularészletek eltüntethetők a „restrict” parancs kiadásával: „restrict 1-56” az 56-os aminosavtól eltüntet mindent. A megváltoztatott modellt a „write script” parancssal és egy fájlnev megadásával egy ún. script-fájlban el lehet menteni. Ez utóbbi a parancsablakba beírt „script” és fájlnev parancssal 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, mutációk szerkezeti hatásainak vizsgálata, energia-minimalizálás, molekuláris dinamikai számítások) NEM alkalmas, arra más (általában nem ingyenes) programok ill. programcsomagok szolgálnak. További segítséget a RasMol használatáról az olvasó itt talál: <http://www.openrasmol.org/doc/>. A **11.14. és 11.15. ábrán** mutatunk be két RasMol programmal készült molekuláris grafikai képet. Az elsőn a kalmodulin EF-kéz Ca^{2+} -kötő doménjét ábrázoltuk (az α -hélixek magenta színűek, egy rövid β -lemez a Ca^{2+} -kötő hurok elején sárga, a Ca^{2+} kék, az ion koordinálásában résztvevő oldalláncokat golyó-pálcika modellel ábrázoltuk), a másodikon a mioglobin fehérje térszerkezetét szalagmodellel („cartoon”) ábrázoltuk (α -hélix: piros, hurok: sárga, hem: golyópálcika ábrázolással kék, a Fe^{2+} térkitöltő magenta).



11.14. ábra. Kalmodulin EF-kéz motívum RasMol ábrázolása.

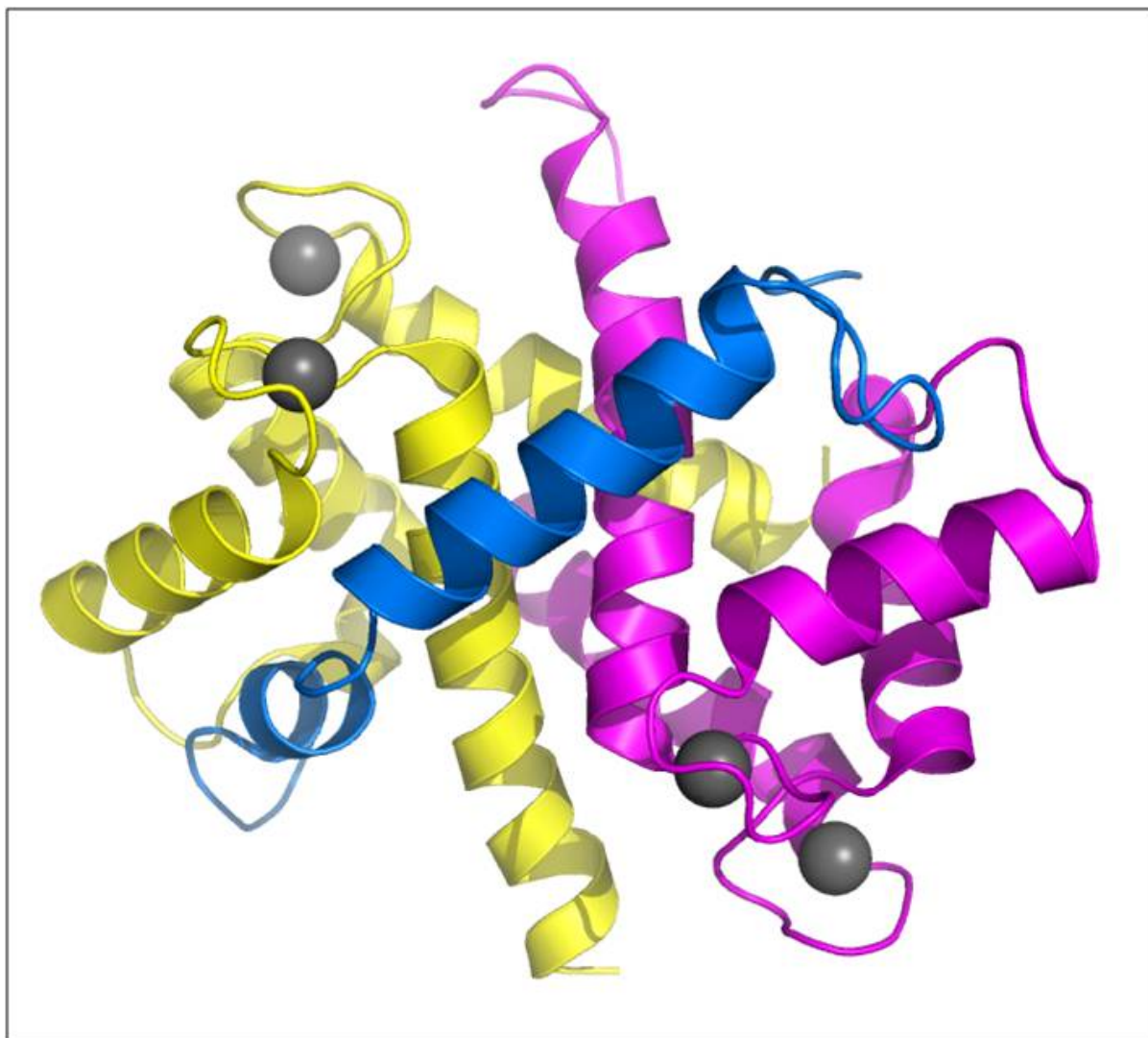


11.15. ábra. Miogloblin RasMol ábrázolása.

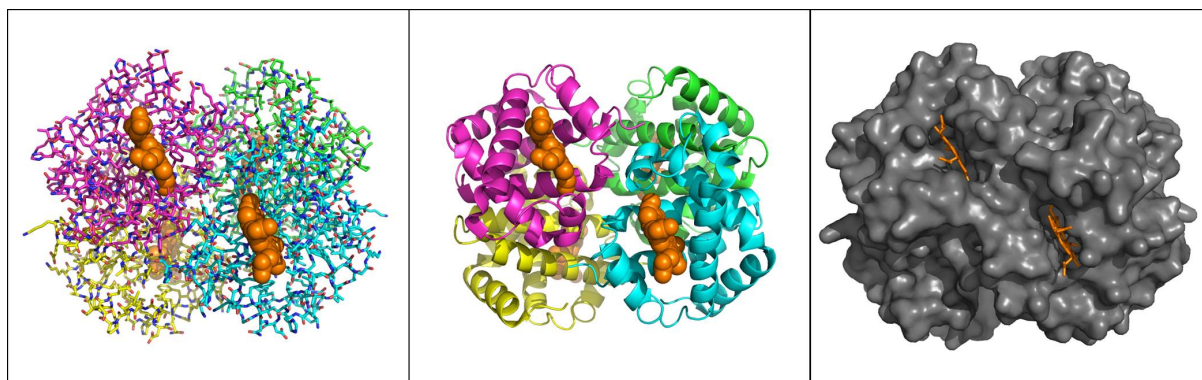
11.4.2. PyMOL

A PyMOL szintén nyílt forráskódú molekuláris grafikai program, amelyet jelenleg a leggyakrabban használnak tudományos publikációkban makromolekula térszerkezetek ábrázolására. Egyetemi hallgatók regisztráció után ingyenesen letölthetik és használhatják (a molekuláris modellező funkciókat kivéve). A RasMol-hoz képest nagy előnye, hogy az elkészített szerkezeti ábrákat közvetlenül el lehet menteni nyomdai minőségű grafikai fájlokba. A **11.16. ábrán** egy ilyen „publikációs minőségű” szerkezeti modellt mutatunk be (egy gerinces-specifikus homodimer Ca^{2+} -kötő fehérje, az S100A4 és egy miozin fragmentum komplexét ábrázoltuk szalagmodellel). A **11.17. ábrán** a hemoglobin térszerkezetét háromféle ábrázolásban tüntettük fel. A bal oldali modell a polipeptidlánc összes atomját pálcika ábrázolásban, míg a nem-kovalens módon kötött négy hem prosztetikus csoport atomjait térkitöltő módon (narancs színnel) mutatja. A középső modell a négy alegységet szalagmodellel (és négyféle színnel) jeleníti meg, míg a jobb oldali modell a fehérje felszínét ábrázolja (a két „kilátszó” hem pálcika ábrázolással készült).

A program részletes használatát a mesterszakos képzés során ismerhetik meg.



11.16. ábra. Az S100A4 Ca^{2+} -kötő fehérje és egy miozin peptid (kék) komplexének térszerkezete, PyMOL ábrázolással. (Ca^{2+} ionok szürke golyókkal, az S100A4 dimer két alegysége pedig sárga és bíbor színekkel vannak ábrázolva.

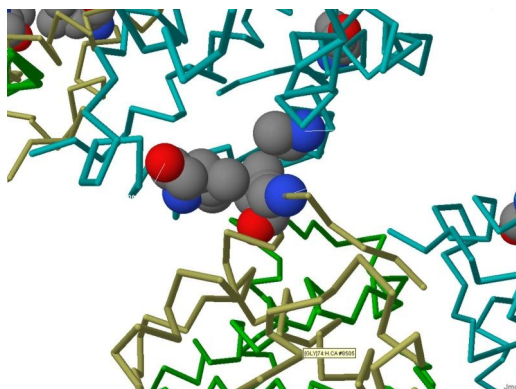


11.17. ábra. A dezoxi-hemoglobin térszerkezete, többféle PyMOL ábrázolással: a négy alegység külön színnel pálcika modellként, a hemek golyó modellként ábrázolva (bal oldal); a négy polipeptidlánc különböző színekkel szalag modell ábrázolással (középen); a fehérje felszíni ábrázolással (van der Waals-felszín), a hemek pálcika ábrázolással látszanak (jobb oldal).

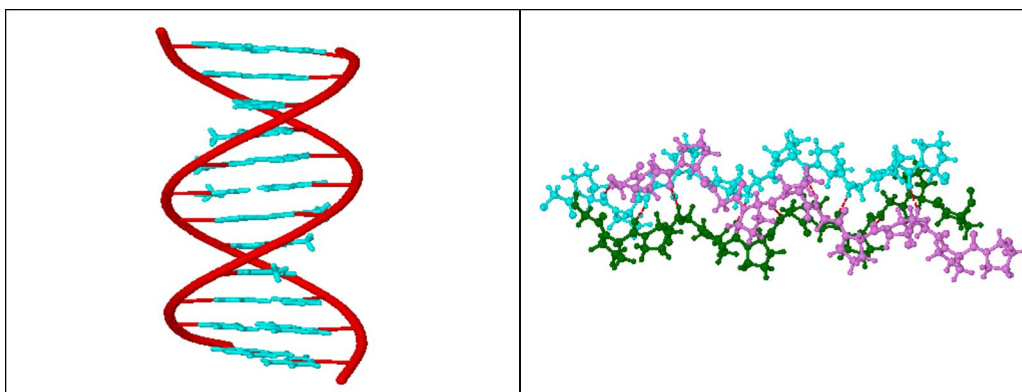
11.4.3. Jmol

A **Jmol** is egy szabadon fejleszthető, Java programozási nyelven íródott molekuláris grafikai, böngésző program ún. kisalkalmazás (applet), amely azonban letölthető programként („standalone” alkalmazás) is használható. Bemeneti adatként a PDB fájl formátumon kívül számos más, a szerkezeti biológiában és a szerves kémiában használatos, atomi koordinátákat tartalmazó formátumot elfogad. A térszerkezetek molekuláris vizualizációjához szükséges parancsok a RasMol programhoz hasonlóak, ugyanazt a „logikát” követik. Egyszerűbb molekulamodellelési feladatokat is el lehet végezni vele (atomok hozzáadása, törlése stb.) A parancsablakot a jobb egér gombbal lehet megnyitni. A közelmúltban elkészült a magyar verziója is. A Jmol-lal kapcsolatos nagyon sok hasznos információ elérhető a [Wiki](#) oldalán.

A Jmol alkalmazással nagyon gyakran találkozhatunk oktatási céllal készült szakmai honlapokon, de a PDB adatbázisban található összes szerkezetet is interaktív módon ábrázolni lehet vele. A **11.18. ábrán** a hemoglobin működését és a sarlósejtes vérszegénységet okozó hemoglobin mutációt és hatását bemutató angol nyelvű interaktív oktatási segédanyag egy kimerevített ábrája látható. Ez az interaktív molekuláris grafikai animáció az interneten itt érhető el: <http://molviz.org/> A **11.19. ábrán** Jmol programmal ábrázolt B-DNS részletet és a három láncból álló kollagén-hélixet mutatjuk be.



11.18. ábra. A hemoglobin működését bemutató animáció részlete (alegység felszínének közötti kölcsönhatás). Az alegység felszínének közötti kölcsönhatás és a golyó modellként kiemelt aminosav oldalláncok szerepét az eredeti animáció tanulmányozásával lehet megérteni.



11.19. ábra. A B-DNS (bal) és kollagén (jobb) térszerkezete Jmol programmal ábrázolva.

12. fejezet - Számolási és problémamegoldó feladatok

szerző: Radnai László

A feladatgyűjtemény tagolódását tekintve nagyrészt igazodik a jegyzet fejezeteihez. Minden fejezetcím után megtalálható néhány példa részletes levezetése, illetve megoldása. Az ilyen feladatokat „(MINTAFELADAT)” felírat jelöli. A „(*)” jelölésű, számításokat igénylő példák megoldásait elkülönítve, a „Megoldások” fejezetben találjuk. Egyes kérdések nem kaptak semmilyen jelölést; ezek pusztán a tananyag átismétlésére, a tudás elmélyítésére szolgálnak, így a megoldás „megtalálása” itt az olvasó feladata.

Néhány hasznos előismeret:

I. Relatív molekulatömeg (M_r) és Moláris tömeg (M):

- A relatív molekulatömeg (M_r) tulajdonképpen dimenzió nélküli szám, mely megmutatja, hogy az adott molekula tömege hányszorosa a szén 12-es izotóp tömege 1/12-ed részének. Biokémiában elterjedt jelölése a Dalton (Da), vagy kilodalton (kDa).
- A moláris tömeg (M) dimenziója tömeg / mol, és általában g/mol mértékegységben használatos.
- Egy molekula daltonokban megadott relatív molekulatömegének számértéke megegyezik ugyanazon vegyület g/mol mértékegységben kifejezett moláris tömegével.

II. Koncentráció dimenziók – százalékok:

- Vegyes százalék: hány g oldott anyag van a 100 ml végtérfogatú oldatban?
- Térfogat százalék: hány ml adott folyadékot mértünk be a 100 ml végtérfogatú oldatba?
- Tömeg százalék: hány g oldott anyag van a 100 g-nyi oldatban?

III. Koncentráció dimenziók – molaritás: hány mol oldott anyag van 1 liter oldatban? (Mértékegysége: mol/dm³, vagy másképp: M)

IV. Koncentráció dimenziók – mg/ml: Gyakori „önkéntes” koncentráció a laborban. Vegyük észre, hogy ez azonos a g/l kifejezéssel, hiszen 1 g/l = 1000 mg / 1000 ml = 1 mg/ml, továbbá, hogy azonos az SI rendszerben szereplő kg/m³ koncentrációval.

V. A biokémiában gyakorta használt nagyságrendek:

- milli... egy-ezred (jele: m) pl. 1 mM = 10⁻³ M
- mikro... egy milliomod (jele μ), tehát pl. 1 mikroliter = 1/10⁶ liter = 10⁻⁶ liter
- nano... egy milliárdod (jele n), tehát pl. 1 nanométer = 10⁻⁹ méter

Mértékegységek és oldatok

1. Hány mol illetve hány mg nátrium-klorid van 15 μ l 0,5 M nátrium-klorid oldatban? ($M_{NaCl} = 58$ g/mol) (MINTAFELADAT)

Ha	1l oldatban	0,5 mol NaCl,
akkor	1ml-ben	0,5mmol NaCl,
illetve	1 μ l-ben	0,5 μ mol NaCl van.

Ha 1 μ l-ben 0,5 μ mol, akkor 15 μ l-ben 15-ször több, vagyis 7,5 μ mol.

Ez $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol.

A feladat megoldható egyszerű aránypárral is:

$$1: 0,5 = 1,5 \cdot 10^{-5}: x \qquad x = 7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

Ezután a moláris tömeggel szorozva megkapjuk az NaCl mennyiségét grammban, amit átváltunk mg-ra:

$$7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot 58 \text{ g/mol} = 4,35 \cdot 10^{-4} \text{ g} = 0,435 \text{ mg}$$

2. Egy fehérjeoldat koncentrációja 5 mg/ml, a fehérje molekulatömege 25000 Da. (A) Hány mólos [M] ez a fehérje oldat? (B) Hány vegyes százalékos ez az oldat? (MINTAFELADAT)

(A) Könnyen belátható, hogy 5mg/ml = 5g/l, hiszen: 1g/l = 1000 mg / 1000 ml = 1 mg/ml. Az egy liter (1 dm³) oldatban található 5 g fehérje anyagmennyisége:

$$5/25000 = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol, vagyis a koncentráció } 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 (=2 \cdot 10^{-4} \text{ M})$$

Megfordítva a logikát: a moláris tömeg 25000 g/mol, tehát 25000 g/l, azaz 25000 mg/ml lenne az 1 M-os oldat koncentrációja. Akkor az 5 mg/ml-es oldat hány M-os?

Egyszerű aránypárral számolva:

1M-os	25000 mg/ml
x M-os	5 mg/ml

$$x = (5 \text{ mg/ml} \cdot 1 \text{ M}) / 25000 \text{ mg/ml} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

(B) Ha 1 g feloldott anyag van 100 ml oldatban, akkor az oldat 1 vegyes %-os. Esetünkben az oldat 5 mg/ml-es (= 5 g/l), tehát 5 g feloldott anyag van 1000ml oldatban. Száz milliliterben ennek a tizede, vagyis: 0,5 g. Az oldat 0,5 vegyes %-os.

3. Egy gömb alakúnak tekinthető eukarióta sejt átmérője 50 μm . Egy átlagos méretű (kb. 40 kDa molekulatömegű) globuláris fehérje átmérője $\approx 3,6 \text{ nm}$. (A) Hány ilyen molekula férne el a sejtben, feltételezve, hogy nincs jelen más sejtalkotó komponens és a rendelkezésre álló teret a lehető legszorosabban töltjük fel a kicsi, közelítőleg gömb alakú fehérjemolekulákkal? (Ekkor a tér kb. 74%-át töltenék ki a fehérjemolekulák, köztük pedig kb. 26%-nyi „üres” hely maradna.) (B) A fenti feltételezett sejtben a glükóz koncentráció 1mM (mmol/dm³), Számítsa ki, hogy hány darab glükóz molekula van a sejtben. (C) A hexokináz egy fontos enzim a glükóz anyagcseréjében, ennek koncentrációja a fenti sejtben 20 μM . Számítsa ki, hogy hány glükóz molekula áll egy hexokináz molekula rendelkezésére! (A gömb térfogata: $4r^3\pi/3$.) (*)
4. Az *E. coli* sejt rúd alakú, 0,8 μm átmérőjű, 2 μm magasságú hengernek tekinthető. (A) Az *E. coli* sejt átlagos sűrűsége $1,1 \cdot 10^3 \text{ g/l}$. Mi a tömege egyetlen *E. coli* sejtnek? (B) Az *E. coli* sejt sejtfa 10 nm vastag. Hány százalékát teszi ki a sejtfa a sejt teljes térfogatának? (C) Az *E. coli* sejtben intenzív fehérje szintézis folyik, ezt sejtenként mintegy 15000 riboszóma teszi lehetővé. A riboszóma 18 nm átmérőjű gömb alakúnak tekinthető sejtalkotó. A sejt térfogatának hány százalékát foglalják el a riboszómák? (D) Az előbbi térfogatokat figyelembe véve, tekintsük az *E. coli* sejt fennmaradó térfogatát vizes oldatnak, amelynek pH-ja pH=7, Hány darab H⁺ (H₃O⁺) van egyetlen *E. coli* sejtben? (E) Ha az *E. coli* sejtben egy adott fehérje molekulából 2 db van, akkor mi a moláris koncentrációja (mol/dm³) a fehérjének? (F) Hány *E. coli* sejt fér el egy tű hegyén? (A tűhegy átmérője legyen 0,3 mm és tekintsük laposnak, azaz kör alakúnak! A sejteket „állítva” pakoljuk a tű hegyére, így vetületük kör lesz. Azonos körökkel a síkot hexagonális elrendezésben lehet megtölteni úgy, hogy a lehető legkisebb hely maradjon a körökön kívül. Ekkor a sík 90,69 %-át töltik ki a körök.) (*)
5. Az *E. coli* sejtben egyetlen kör alakú kettős szálú DNS molekula található, ennek relatív molekulatömege $3,1 \cdot 10^9$ Da. A DNS kettős szálában egyetlen nukleotid pár átlagos molekulatömege 660 Da, és minden egyes nukleotid pár 0,34 nm-rel járul hozzá a DNS molekula hosszához. (A) Számítsa ki az *E. coli* DNS hosszát! Hasonlítsa össze a DNS hosszát az *E. coli* sejt dimenzióival! Hogyan fér bele a sejtbe a DNS molekula? (B) Tétélezzük fel, hogy az *E. coli* sejtben található fehérjék átlagosan 400 aminosavból épülnek fel. Hány fehérje molekulát

- kódolhat az *E. coli* DNS, ha egyszerűség kedvéért a szabályozó szakaszokat nem vesszük figyelembe és teljes DNS szálat kódoló régióknak tekintjük? (*)
6. A mitokondrium 1,5 μ m hosszú 0,6 μ m átmérőjű hengernek tekinthető, térfogatának 35%-át a membrán rendszer teszi ki, a maradék térfogatot tekintjük vizes oldatnak. A mitokondriumokban az oxálecetsav koncentráció 0,03 μ M. Hány darab oxálecetsav molekula van a mitokondriumban? (Avogadro szám: $6,022 \cdot 10^{23}$) (*)
 7. A tropomiozin egy 70 kDa molekulatömegű izomfehérje, amely két egymásra tekeredő α -helikális láncból épül fel, ezt nevezzük coiled-coil szerkezetnek. Az α -helix méretadatai (3,6 aminosav/fordulat; menetemelkedés: 5,4 \AA) alapján számítsa ki a tropomiozin molekula hosszát! (Egy aminosav átlagos tömege: 110 Da) (*)
 8. 0,35%-os tropomiozin oldat 1 ml-e 10^{15} latex szemcsét tartalmaz. Az oldat kis részét beszárítjuk és elektronmikroszkóppal vizsgáljuk. Adott területen 300 db fehérjemolekulát és 10 db latex szemcsét számolunk meg. Mennyi a tropomiozin molekulatömege? (*)
 9. 0,1 %-os miozin oldat 1 ml-e 10^{14} latex részecskét tartalmaz. Az oldat kis részét beszárítjuk és elektronmikroszkóppal vizsgáljuk. Adott területen 120 db fehérje molekulát és 10 db latex szemcsét számolunk meg. Mennyi a miozin molekulatömege? (*)
 10. A haj növekedési sebessége 15-20 cm/év. A haját felépítő α -keratin szintézise a hajhagymák epidermális sejtjeiben történik. Az α -keratin szerkezete α -hélix, amiben 3,6 aminosav alkot egy fordulatot és a menetemelkedés 5,4 \AA . Feltételezve, hogy a hajnövekedés sebesség-meghatározó lépése az α -keratin peptidlánc szintézisének sebessége, számítsa ki, hogy másodpercenként hány peptidkötés jön létre a haj növekedése során! (*)
 11. Egy réztartalmú fehérje grammonként 320 μ g rezet tartalmaz. Mi a fehérje molekulatömege, ha a fehérjében egyetlen egy Cu^{2+} -ion van? (A rézatom tömege: 64 Da.) (*)
 12. A ribonukleáz aminosav analízise szerint 2,47% izoleucint és 1,65% leucint tartalmaz. Mindkét aminosav molekulatömege 131 Da. Mekkora a ribonukleáz (minimális) molekulatömege? (*)
 13. A citokrom-C 0,423% vasat tartalmaz (súly %). A vas atomtömege: 55,84. Mekkora a citokrom-C molekulatömege? (Egy molekula citokrom-C-ben egy hem-csoporthoz kötött vas található.) (*)
 14. Hány femtomol ($\text{fmol} = 10^{-15}$ mol) alanin van egy májsejtben, ha egy májsejt térfogata kereken 10^{-8} ml és az alanin koncentráció 1 mM? Ha 1 g májszövet 10^9 májsejtet tartalmaz, számítsa ki hány % (súly/súly) alanint tartalmaz a máj! (Az alanin molekulatömege: 89 Da.) (*)
 15. Egy ember 3g vasat tartalmaz, melynek 75%-a hemoglobinban található. (A) Számítsa ki a hemoglobin mennyiségét! (B) Ez a hemoglobin mennyiség hány mol oxigént képes kötni? (C) Hány liter 25 °C-os, 1 atm nyomású levegő tartalmazza ezt az oxigén mennyiséget? (A hemoglobin tetramer, molekulatömege: 68000 Da, aegységenként tartalmaz egy hemhez kötött vasat és aegységenként képes 1 molekula O_2 -t megkötni. A vas atomtömege 55,8, a levegő 20% (V/V) O_2 -t tartalmaz és a tökéletes gázok 1 mólnyi mennyisége 1 atm nyomáson 0 °C-on 22,4 liter.) (*)
 16. Egy ismeretlen koncentrációjú oldat 100 μ l-hez 4,9 ml vizet adunk. Meghatározzuk a hígított oldat koncentrációját, ami 20 μ M-nak adódik. Mi az eredeti oldat koncentrációja, és milliliterenként hány μ mol anyagot tartalmaz? (*)
 17. Egy C-vitamin tabletta 350 mg aszkorbinsavat tartalmaz. Az aszkorbinsav molekulatömege 175 Da. 10 mM-os aszkorbinsav oldatot kívánunk készíteni. Milyen térfogatú oldat készíthető 1 tabletta feloldásával? (*)
 18. Tegyük fel, hogy egy 2 dl-es bögrébe két kockacukrot dobunk, majd teljesen feltöltjük teával. Egy fél kilós dobozban 250 db kockacukor van. A szacharóz molekulatömege: 342 Da. (A) Mennyi a cukor koncentrációja a teában? (B) A jól ismert aszpartám édesítőszer az aszpartil-fenilalanin dipeptid metilészter származéka. Rajzold fel a dipeptidet! (C) Az aszpartám tömegegységre számolva 180-szor édesebb a cukornál. Hány mM a koncentrációja abban a teában, amely ugyanolyan édes, mint a fenti cukros tea? (Az aszpartám molekulatömege: 294 Da.) (*)
 19. Egy fehérje molekulatömege 25000 Da. (A) Mekkora a moláris koncentrációja az 1 mg/ml-es oldatának? (B) Milyen egyes-százalékos ez az oldat? (*)

20. A NADH molekulatömege 709,43 Da. Hány ml 50 μM -os NADH oldat készíthető 1 mg NADH felhasználásával? (*)
21. Egy fehérje molekulatömege 50000 Da. (A) Mekkora a fehérje 40 μM -os oldatának mg/ml-ben kifejezett koncentrációja? (B) Milyen vegyes-százalékos ez az oldat? (*)
22. Számolja ki, hogyan készítené 100 ml-nyi, az alábbi végkoncentrációkkal jellemezhető oldatot: 20 mM kálium-foszfát puffer, 150 mM NaCl, 50 μM szérumalbumin! Az oldatkészítéshez rendelkezésre álló anyagok: 1M káliumfoszfát puffer, szilárd NaCl (moláris tömeg: 58,44 g/mol), 13 mg/ml szérumalbumin (65000 Da) és desztillált víz. (*)
23. Tejsav-dehidrogenáz enzim aktivitását kívánjuk mérni. A meghatározáshoz 4 ml térfogatú reakció keverékre van szükségünk, amiben a komponensek koncentrációja a következő: 5 mM tejsav, 20 mM foszfát puffer, 0,5 mM NAD, 10 pM tejsav dehidrogenáz. A következő törzsoldatok állnak rendelkezésre: 0,1 M tejsav, 0,1 M foszfát puffer, 0,1 M NAD. A tejsav-dehidrogenáz (146 kDa) törzsoldat koncentrációja 0,544 $\mu\text{g/ml}$. Az egyes komponensekből hány ml illetve μl bemérése szükséges a fenti összetételű és térfogatú keverék elkészítéséhez? (*)

Ionizációs egyensúlyok

24. Mi a pH-ja a következő oldatoknak: (A) 0,35 M HCl; (B) 200 ml desztillált víz + 50 ml 1 mM HCl; (C) 0,35 M ecetsav; (D) 0,035 M ecetsav? (Vegyük figyelembe, hogy a sósav erős sav, vizes oldatában gyakorlatilag teljes a disszociáció, míg az ecetsav gyenge sav, disszociációs állandója: $K_a=1,74 \cdot 10^{-5}$!) (MINTAFELADAT)

(A)

$$[\text{H}^+] = 0,35 \text{ mol/dm}^3$$

$$\text{pH} = -\log 0,35 = \underline{0,46}$$

(B)

$$250/50 = 5\text{-szörös hígítás}$$

$$[\text{H}^+] = 10^{-3}/5 = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$\text{pH} = -\log(2 \cdot 10^{-4}) = \underline{3,7}$$

(C)

$$K_a = 1,74 \cdot 10^{-5} = [\text{H}^+][\text{Ac}^-]/[\text{HAc}] = [\text{H}^+]^2/(0,35-[\text{H}^+]) \text{ (hiszen ekkor } [\text{H}^+]=[\text{Ac}^-])}$$

$$1,74 \cdot 10^{-5} = [\text{H}^+]^2/(0,35-[\text{H}^+])$$

$$[\text{H}^+]^2 + 1,74 \cdot 10^{-5}[\text{H}^+] - 6,09 \cdot 10^{-6} = 0$$

Másodfokú egyenlet. Egyik gyöke negatív, másik:

$$[\text{H}^+] = 2,46 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$$

$$\text{pH} = -\log(2,46 \cdot 10^{-3}) = \underline{2,61}$$

(D)

A fenti logika szerint:

$$[\text{H}^+] = 7,72 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$$

$$\text{pH} = -\log(7,72 \cdot 10^{-4}) = \underline{3,11}$$

25. 50 ml 2.0 M K_2HPO_4 és 25 ml 2.0 M KH_2PO_4 oldatot összekeverünk, majd feltöltjük 200 ml-re desztillált vízzel. Mi a pH-ja a kapott oldatnak? ($\text{p}K_2 = 7,2$) (A $\text{p}K_1$ és a $\text{p}K_3$ ismerete nem szükséges, mert a teljesen

protonált és teljesen deprotonált formák egyensúlyi koncentrációját elhanyagolhatónak vehetjük ebben a rendszerben.) (MINTAFELADAT)

K_2HPO_4 : $200/50 = 4$ -szeres hígítás, a végső koncentráció: $2/4 = 0,5$ M

KH_2PO_4 : $200/25 = 8$ -szoros hígítás, a végső koncentráció: $2/8 = 0,25$ M

$pH = pK_2 + \lg([HPO_4^{2-}]/[H_2PO_4^-]) = 7,2 + \lg(0,5/0,25) = 7,2 + \lg 2 = 7,5$

26. Mi a pH-ja a következő puffer oldatoknak: (A) 0,5 M ecetsav + 0,1M nátrium-acetát; (B) 0,5 M ecetsav + 0,2 M nátrium-acetát; (C) 0,5 M ecetsav + 0,4 M nátrium-acetát? ($K_a=1,74 \cdot 10^{-5}$) (*)
27. Hány gramm Na-H-szukcinát (molekulatömege 140 Da) és hány gramm Na₂-szukcinát (molekulatömege 162 Da) szükséges 1 liter oldathoz, amelyben a szukcinát koncentráció 50 mM és a pH=6,0? A borostyánkősav második disszociációs állandója $K_{d2}=2,3 \times 10^{-6}$. (A K_{d1} ismerete nem szükséges, mert a teljesen protonált borostyánkősav egyensúlyi koncentrációját elhanyagolhatónak vehetjük ebben a rendszerben.) (*)
28. Hány ml 5M NaOH oldat szükséges 100 ml 0,1 M foszforsavhoz, hogy az oldat pH-ja 4-ről 9-re emelkedjen? (Foszforsav: $pK_1=2,15$, $pK_2= 7,2$, $pK_3=12,37$) (*)
29. Egy adott gyenge sav 0,02 M oldatának pH-ja 4,6. (A) Mi az oldatban a $[H^+]$? Számítsa ki: (B) a disszociációs állandót és (C) a pK -t! (*)
30. Az ecetsav savi disszociációs állandója: $K_a= 1,74 \cdot 10^{-5}$. (A) Mennyivel változik a pH-ja 10 ml 0,05 M-os ecetsav oldatnak, ha 4 ml 0,05 M-os NaOH oldatot öntünk hozzá? (B) Hány ml 0,5 M-os Na-acetát oldatot kell a fenti ecetsav oldathoz tölteni, hogy a pH-ja éppen 1 egységgel változzon? (*)
31. Az ecetsav savi disszociációs állandója: $K_a= 1,74 \cdot 10^{-5}$. (A) Mennyivel változik a pH-ja 10 ml 0,05 M-os ecetsav oldatnak, ha 40 ml $1,25 \cdot 10^{-2}$ M-os Na-acetátot öntünk hozzá? (B) Hány ml 0,05 M-os NaOH oldatot kell a fenti ecetsav oldathoz tölteni, hogy a pH-ja éppen 1 egységgel változzon? (*)
32. (A) Hány százalékban protonált az arginin oldallánca, ha a pH=11,5? (B) Mekkora töltése van ekkor az arginin oldallancának? ($pK_a=12$) (*)
33. (A) Hány százalékban protonált az tirozin oldallánca, ha a pH=10,5. (B) Mekkora töltése van ekkor a tirozin oldallancának? ($pK_a=10$) (*)
34. Egy aminosav oldallánca pH=6.8-on 14%-ban protonált. (A) Számítsa ki az oldallánca jellemző pK_a értéket! (B) Melyik fehérjealkotó aminosav lehet ez? (*)
35. A szelenocisztein nevű aminosav oldallancának töltése pH=6.5-ön -0,91. Számítsa ki az oldallánca jellemző pK_a értéket! (*)
36. Hány ml 1,0 M NaOH-val lehet 50 ml 50mM hisztidin oldat pH-ját pH=2-ről pH=9-re titrálni? (karboxil-csoport $pK=4$, imidazol-csoport $pK=6$, amino-csoport $pK=9$) (*)
37. A glicin izoelektromos pontja éppen az amino- és karboxil-csoportok pK_a értékeinek számtani közepe. Bizonyítsuk az állítást!

Biomolekulák spektrofotometriája

38. Az LDH (laktát-dehidrogenáz) enzim molekulatömege: 140 kDa; moláris extinkciós koefficiense $\epsilon_{280}=1,6 \times 10^5$ $M^{-1}cm^{-1}$. Egy LDH oldat fényelnyelése 280 nm-en $E_{280}=0,8$. (A) Adja meg az oldat moláris koncentrációját (μM egységben)! (B) Számítsa ki a koncentrációt vegyes %-ban; illetve (C) mg/ml ben is! (MINTAFELADAT)

(A)

$$E = \epsilon c l \quad c = E / \epsilon = 0,8 / (1,6 \cdot 10^5) \quad c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M} = 5 \mu M$$

(B)

$$100 \text{ ml-ben: } 0,1 \cdot 5 \cdot 10^{-6} = 5 \cdot 10^{-7} \text{ mol LDH}$$

$$\text{Ez } 140000 \cdot 5 \cdot 10^{-7} = 0,07 \text{ g}$$

$$\underline{0,07 \text{ v\%}}$$

(C)

$$1 \text{ literben: } 10 \cdot 0,07 = 0,7 \text{ g}$$

$$\text{g/l} = \text{mg/ml}$$

$$\underline{0,7 \text{ mg/ml}}$$

39. Hány százaléka redukálódott a NAD^+ -nak abban az oldatban, amelynek abszorbanciája a redukció előtt 260 nm-en 0,9, a reakció után 340 nm-en 0,11 volt? (A NAD^+ moláris extinkciós koefficiense: $E_{260}=18000$, $E_{340}=\text{elhanyagolható}$. A NADH moláris extinkciós koefficiense: $E_{260}=18000$, $E_{340}=6200$.) (MINTAFELADAT)

260 nm:

$$c = E/\epsilon = 0,9/18000 = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M (a } \text{NAD}^+ \text{ teljes mennyisége)}$$

340 nm:

$$c = E/\epsilon = 0,11/6200 = 1,77 \cdot 10^{-5} \text{ M (ennyi } \text{NAD}^+ \text{ alakult } \text{NADH-vá)}$$

$$(1,77 \cdot 10^{-5} / 5 \cdot 10^{-5}) \cdot 100 = \underline{35,5\%}$$

40. Írja fel és értelmezze a Lambert-Beer egyenletet! Egy spektrofotometriás analízisnél mit határozunk meg, mikor „spektrumot veszünk fel”, és a kapott spektrumot mire lehet használni?
41. Definiálja az extinkció és a transzmittancia fogalmát! Hogyan határozható meg, hogy egy DNS minta mennyire szennyezett fehérjével? Ehhez milyen küvettában mérünk és miért ilyenben?
42. A vázizom miozin SH-csoportjainak számát Ellmann-reagenssel (ditionitrobenzoesav, DTNB) határozzuk meg. Az SH csoport reakciója során felszabaduló tionitrobenzoát 412 nm nél mért moláris extinkciós koefficiense, $\epsilon^M = 12000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. A miozinból 0,3 ml-t, foszfátpufferből 2,6 ml-t, míg a reagensből 0,1 ml-t mérünk a küvettába. $E_{412\text{nm}} = 0,36$. A miozin törzsoldat koncentrációját 100x-os hígításban, UV fotométerben határozzuk meg. $E_{280\text{nm}} = 0,2$; $\epsilon\% = 8$ (vegyes százalékos extinkciós koefficiens). Mennyi reaktív ciszteint tartalmaz az $5 \cdot 10^5$ Da molekulatömegű enzim? (*)
43. Egy 50 kDa molekulatömegű fehérje reaktív Lys oldalláncait danzil-kloriddal módosítjuk. 1 ml térfogatban zajlik a reakció, amibe 0,1 ml fehérjét mérünk egy törzsoldatból. A módosított lizin származék fényelnyelését 335 nm-en mérjük; $E_{335\text{nm}} = 0,48$. A lizin származék (danzil-lizin) moláris extinkciós koefficiense $\epsilon^M = 3000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$; $l = 1 \text{ cm}$. A fehérjeoldat koncentrációját 0,2 ml törzsoldatból 2 ml-es biuret reakcióban határoztuk meg; $E_{540\text{nm}} = 0,25$. 1E megfelel 4 mg/ml fehérjekoncentrációnak. Mekkora a jelölés mértéke (mol Lys/mol fehérje). (*)
44. A mioglobín moláris abszorpciós koefficiense $\epsilon_{580\text{nm}} = 1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, vastartalma 0,33%. Számítsa ki, hogy 0,5 mg/ml koncentrációjú mioglobín oldatnak mekkora a fényelnyelése 580 nm hullámhosszon, 1 cm-es küvettában mérve! (A vas atomtömege: 55,8.) (*)
45. Egy fehérje törzsoldat koncentrációját biuret-reakcióval mérjük. A 3,00 ml végtérfogatú tesztbe 0,05 ml fehérjeoldatot mérünk. $\Delta E = 0,4$. A kalibráló egyenes egyenlete: $y = 2x$ (mg/teszt). (A) Mennyi a törzsoldat koncentrációja? (B) A fenti fehérje törzsoldatot négyszeresre hígítjuk desztillált vízzel, és megmérjük az elnyelését 280 nm-nél. A kapott érték 0,5. A fehérje szekvenciájának ismeretében tudjuk, hogy 2 triptofánt tartalmaz, és nincs benne sem tirozin, sem fenilalanin. Mennyi a fehérje molekulatömege, ha a triptofán moláris extinkciós koefficiense $5000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. (*)
46. Egy fehérjeoldat koncentrációját Folin-reakcióval kívánjuk meghatározni. Az ismeretlen fehérjeoldat térfogata 0,2 ml, míg a teszt végtérfogata 1,0 ml. A reagens kontroll elnyelése: $E = 0,1$, az ismeretlent tartalmazó mintáé

- $E = 0,54$. A reagens kontrollal korrigált kalibráló egyenes egyenlete: $y(A) = 0,5x$ (mg). (A) Mennyi az ismeretlen fehérjeoldat koncentrációja? (B) A most már ismert koncentrációjú fehérjeoldatot négyszeres végtérfogatra hígítjuk desztillált vízzel, és megmérjük az elnyelését 280 nm-nél. A kapott érték $E = 0,25$. Ismerjük a fehérje szekvenciáját, így tudjuk, hogy 2 db triptofánt tartalmaz, és nincsen benne sem tirozin, sem fenilalanin. Mennyi a fehérje molekulatömege, ha a triptofán moláris extinkciós koefficiense $5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ és feltételezzük, hogy a fehérjében ez a koefficiens nem változik? (*)
47. A vazopresszin nevű peptid hormon szekvenciája a következő: Asp Tyr Phe Glu Asn Cys Pro Lys Gly. (A) Számítsa ki közelítőleg a peptid molekulatömegét! (B) A 280 nm-nél mérhető fényelnyelése az aromás aminosavak fényelnyeléséből adódik. Mekkora a vazopresszin moláris extinkciós koefficiense (ϵ_{280}), ha a tirozin moláris extinkciós koefficiense $1,2 \cdot 10^3$, a fenilalanin extinkciós koefficiense pedig $1,1 \cdot 10^2$? (C) Egy vazopresszin oldat koncentrációját mérjük 280 nm hullámhosszon 1 cm-es küvettában. A mért érték 1,3 A. Mi az oldat koncentrációja mg/ml-ben megadva? (*)
48. Egy fehérje molekulatömege 40000 Dalton. Aminosav analízis alapján a fehérje mólonként 16 mól tirozint tartalmaz. Mivel a fehérje triptofánt nem tartalmaz a 280 nm-nél mérhető fényelnyelése gyakorlatilag a tirozin oldalláncok fényelnyelésének tulajdonítható, eltekintve az egyéb kromofórok jelentéktelen elnyelésétől. A tirozin aminosav moláris abszorptivitása vagy moláris extinkciós koefficiense $\epsilon_{280} = 1,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. (A) Mi a fehérje moláris abszorptivitása (ϵ_{280})? (B) A fenti fehérje híg oldatát mérjük 280 nm-nél, a mért abszorbancia (extinkció) = 0,6. Számítsa ki a fehérjeoldat koncentrációját mg/ml egységekben megadva! (*)
49. A metilvörös próbát mikrobiológusok használják annak eldöntésére, hogy egy vizsgált baktérium erősen vagy gyengén savtermelő-e. A baktérium tiszta tenyészetével be kell oltani egy glükóztartalmú levestáptalajt, majd a megfelelő inkubáció után a táptalajhoz néhány csepp metilvörös indikátort adni. Ha a baktérium erősen savtermelő, akkor az indikátor piros színt mutat. A metilvörös (MV) tulajdonképpen egy szerves sav, melynek pKa értéke: 5,1. A savforma (H MV) moláris tömege 269 g/mol, míg a metilvörös nátriumsójának (NaMV) moláris tömege 291 g/mol. A metilvörös színes anyag, pH indikátorként azért használhatjuk, mert színe (elnyelési spektuma) függ a protonáltságától, vagyis a $[\text{H}^+]$ -től. A protonált forma elnyelési maximuma 520 nm-en van (az oldat színe piros), míg a deprotonált forma elnyelési maximuma 425 nm (az oldat színe sárga). 500 nm-en mindkét forma elnyelést mutat. Ezen a hullámhosszon meghatároztuk a protonált (H MV) és deprotonált (MV-) forma moláris extinkciós koefficiensét: $\epsilon_{\text{H MV}, 500\text{nm}} = 260000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{MV-}, 500\text{nm}} = 65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. (A) Hány százalékban protonált a metilvörös, ha a pH=5,8? (B) Mekkora abszorbanciája lenne egy $10 \mu\text{M}$ koncentrációjú metilvörös oldatnak 500 nm-en 5,8-as pH-n, 1cm-es küvettában mérve? (C) Rendelkezésünkre áll szilárd por formájában metilvörös (savforma, H MV) és a metilvörös nátriumsója (NaMV), továbbá desztillált víz. Ezekből az anyagokból a fenti paraméterekkel jellemezhető ($c_{\text{MV}} = 10 \mu\text{M}$, pH=5,8), oldatot készítettünk. Hány μg H MV-t és NaMV-t tartalmaz 100 ml ilyen oldat? (*)

Sejtek feltárása és fehérjék izolálása

50. Egy enzim preparálása során először a kiindulási szövethomogenizátumból mérjük az enzim aktivitását: 0,2 ml homogenizátum 5 perc alatt 0,15 μmol szubsztrátot alakít át. A feldolgozandó szövethomogenizátum térfogata 200 ml és összfehérje-tartalma 6 mg/ml. (Vigyázat! Ez nem a keresett enzim mennyisége!) Több tisztítási lépés után a homogén formában izolált enzimet tartalmazó oldat térfogata 0,5 ml és az enzim koncentrációja 2 mg/ml. 2 μl tisztított enzim 5 perc alatt 0,18 μmol szubsztrátot alakít át. Hányszorosára tisztult a preparátum és hány %-os a kitermelés? (MINTAFELADAT)

Szövethomogenizátum:

200 ml, 6 mg/ml \rightarrow 1200 mg fehérje

0,2 ml, 6 mg/ml \rightarrow 1,2 mg fehérje

5 perc alatt 1,2 mg fehérje 0,15 μmol szubsztrátot alakít át:

Specifikus aktivitás: $0,15 / (1,2 \cdot 5) = 0,025 \mu\text{mol S} / \text{mg Fehérje} / \text{min}$

Teljes aktivitás (1200 mg fehérje): $1200 \cdot 0,025 = 30 \mu\text{mol S} / \text{min}$

Tiszta enzim:

2 µl, 2 mg/ml → 0,004 mg fehérje

0,5 ml, 2 mg/ml → 1 mg fehérje

5 perc alatt 0,004 mg fehérje 0,18 µmol szubsztrátot alakít át:

Specifikus aktivitás: $0,18 / (0,004 \cdot 5) = 9 \mu\text{mol S} / \text{mg Fehérje} / \text{min}$

Teljes aktivitás (1 mg fehérje): $1 \cdot 9 = 9 \mu\text{mol S} / \text{min}$

Specifikus aktivitás 360 szorosára nőtt, tehát a preparátum 360-szorosára tisztult.

Kitermelés: $100 \cdot (9/30) = 30\text{-os}$ (A teljes enzimaktivitás 70%-a elveszett.)

51. Mi a specifikus aktivitás?

52. Mi a kisózás elvi alapja és milyen más módszerrel lehetne frakcionálni a mintánkat?

53. Egy enzim tisztítása során az alábbi táblázat szerint alakul a preparátum fehérje tartalma és enzimaktivitása. Számítsa ki, hogyan változik a preparátum tisztulását jelző specifikus aktivitás és tisztítás során a kitermelés! Írja be a hiányzó adatokat a táblázatba! (*)

Tisztítási lépés	Fehérje (mg)	Aktivitás alapján számított enzim egység	Specifikus aktivitás egység/mg fehérje	Kitermelés (%)
Szövetkivonat	20000	4000000		100%
NH ₄ SO ₄ csapadék	5000	3000000		
Ioncserélő kromatográfia	1500	1000000		
Gélszűrés	500	750000		
Affinitás kromatográfia	45	675000		

54. Enzimpreparálás során a kiindulási szövethomogenizátumból is mértünk aktivitást. 0,25 ml homogenizátum 10 perc alatt 0,060 µmol szubsztrátot alakított át. A minta teljes térfogata 100 ml. A homogenizátum fehérjekoncentrációját megmértük 0,2 ml mintából, 2 ml-es Bradford-reakcióval. Eredmény: E=0,2. (Kalibráló görbe alapján E=1 megfelel 2 mg/ml fehérje koncentrációnak.) A tisztítási eljárások végén 0,5 ml enzimoldatunk van, a koncentrációja 2 mg/ml. Aktivitásméréshez ebből 30 µl-t használunk fel. 3 perc alatt 0,16 µmol szubsztrát alakult át. Számítsa ki a kiindulási homogenátum és a tisztított enzim specifikus aktivitását, a tisztulás mértékét és a kitermelést (%-ban)! (*)

Peptidek és fehérjék

55. Mi közelítőleg annak a fehérjének a molekulatömege, ami 682 aminosavból álló egyetlen polipeptid láncból épül fel? (MINTAFELADAT)

Egy aminosav átlagos molekulatömege 110 Da.

$$110 \cdot 682 = 75020 \text{ Da}$$

A fehérje molekulatömege közelítőleg 75 kDa.

56. Egy peptid tripszines emésztése után az alábbi peptidek voltak izolálhatók: Phe Arg / Ser Gly Val / Pro Glu Ala Lys / Ala Gly Tyr Lys. Az eredeti peptid kimotripszines emésztése során, pedig az alábbi három peptidet izolálták: Arg Ala Gly Tyr / Lys Ser Gly Val / Pro Glu Ala Lys Phe. Mi a peptid teljes szekvenciája? (MINTAFELADAT)

A tripszin Arg és Lys, míg a kimotripszin Phe és Tyr után tudta elhasítani ezt a peptidet.

Átfedéseket keressük a fragmentumok között, így összerakhatjuk a teljes szekvenciát:

Tripszin:	Pro-Glu-Ala-Lys/Phe-Arg/Ala-Gly-Tyr-Lys/Ser-Gly-Val
Kimotripszin:	Pro-Glu-Ala-Lys-Phe/Arg-Ala-Gly-Tyr/Lys-Ser-Gly-Val
A keresett szekvencia:	Pro-Glu-Ala-Lys-Phe-Arg-Ala-Gly-Tyr-Lys-Ser-Gly-Val.

57. A tirozin aminosav nem túl jól oldódik vízben neutrális körülmények között. (A) Jobban vagy kevésbé oldódik a (Tyr)₅ pentapeptid? (B) Javítható-e az oldékonyság a pH megváltoztatásával? (*)

58. A protein diszulfid-izomeráz (PDI) enzim igen gyorsan alakítja vissza az inaktív denaturált, redukált ribonukleáz enzimet aktív enzimmé, ugyanakkor az inzulint a PDI irreverzibilisen inaktíválja. Milyen szerkezeti okokkal magyarázhatjuk a fenti jelenséget?

59. A humán inzulin és a kacsza inzulin szekvenciájában az alábbi táblázatban feltüntetett 6 helyen van eltérés. Melyik inzulin izoelektromos pontja magasabb? (*)

AA pozíció	A8	A9	A10	B1	B2	B27
Humán	Thr	Ser	Ile	Phe	Val	Thr
Kacsza	Glu	Asn	Pro	Ala	Ala	Ser

60. Milyen célra használják a fehérjék szekvencia meghatározása során az alábbi reagenseket: (A) CNBr, (B) urea, (C) β-merkaptotanol, (D) tripszin, (E) perhangyasav, (F) danzil-klorid, (G) 6N HCl, (H) ninhidrin, (I) fenil-izotiocianát, (J) kimotripszin?

61. Egy hexapeptid aminosav összetétele a következő: 2Arg, Ala, Ser, Val, Tyr. N terminális meghatározással Ala mutatható ki. Tripszines emésztéssel két peptid izolálható, ezek aminosav összetétele: Arg, Ala, Val és Arg, Ser, Tyr. Kimotripszines emésztéssel szintén 2 peptid izolálható, ezek aminosav összetétele: Arg, Ala, Tyr, Val és Arg, Ser. Karboxipeptidáz-A hatására nem szabadul fel aminosav. Mi a hexapeptid szekvenciája? (*)

62. A humán melanotropin hormon szekvenciája a következő: Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val. A disszociációra képes csoportok pK_a értékei a következők: Asp, Glu és a C-terminális karboxil-csoport: pK_a ≈ 4; Lys és N-terminális amino-csoport: pK_a ≈ 9; Arg: pK_a ≈ 12; His: pK_a ≈ 6; Tyr: pK_a ≈ 11. (A) Mi közelítőleg a nettó töltése a molekulának (tizednél kisebb töltésekkel nem kell számolni), ha a közeg pH-ja 7 illetve 9? (B) Hol van a molekula izoelektromos pontja pH=7 alatt vagy felett? (C) Hány peptid keletkezik belőle CNBr kezelés után? (D) Hány peptid keletkezik tripszines emésztés után? (E) Hány peptid keletkezik kimotripszines emésztés után? (*)

63. Egy polipeptid 2-merkaptotanol hatására két peptidre esik szét:

A-lánc: Ala-Val-Cys-Arg-Thr-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Leu

B-lánc: Tyr-Lys-Cys-Phe-Arg-His-Thr-Lys-Cys-Ser

Az eredeti nem redukált peptid tripszines emésztése során az alábbi aminosav összetételű peptideket kapjuk:

1/ Lys, Tyr

2/ His, Lys, Thr

3/ Asn, Leu, Phe

4/ Ala, Arg, Cys₂, Ser, Val

5/ Arg, Cys₂, Gly, Lys, Thr, Phe

Jelöld be a diszulfid hidakat az intakt polipeptiden! (*)

64. Egy egyetlen diszulfid hidat tartalmazó fehérje génjében bekövetkező mutáció eredményeképpen egy harmadik cisztein jelenik meg a primer szerkezetben. Milyen kísérletekkel tudná bizonyítani, hogy a mutáns fehérjében az eredeti diszulfid híd vagy egy új diszulfid kombináció van jelen?

Kromatográfias módszerek

65. Egy tisztított homogén fehérje molekulatömege gélszűrési kromatográfia alapján 60 kDa-nak adódik. Ha a kromatográfiát 6M urea jelenlétében végezzük a molekulatömeg 30 kDa. Ha 6M urea és 10 mM merkaptotanol van jelen, akkor egyetlen 15 kDa molekulatömegű terméket tudunk detektálni. Milyen lehet a fehérjemolekula szerkezete? (MINTAFELADAT)

Az urea denaturálja a fehérjéket, így azok alegységeikre esnek szét.

A merkaptotanol redukálja a diszulfid-hidakat.

A teljes fehérje egy diszulfid hidakkal összetartott, 2·15 kDa dimer dimerje.

66. DEAE-csoportokat hordozó kromatográfias oszlopon választjuk el a következő fehérje keveréket: fibronectin (pI=5,8), hemoglobin (pI=7,1), lizozim (pI=11), RNáz (pI=7,8). A minta pH értékét 8,5-re állítjuk, és az oszlopot is ezzel a pufferral hozzuk egyensúlyba. (A) Milyen jellegű töltet a DEAE? (B) Mi történik a mintafelvétel során? (C) Milyen elvek alapján eluálhatjuk az oszlopra kötődött fehérjéket? (D) Az alkalmazott elvtől függően milyen elúciós sorrendet várunk? (MINTAFELADAT)

(A) Anioncserélő, vagyis pozitív töltéseket hordoz, tehát anionokat képes megkötni.

(B) A 8,5-ös pH-n a 8,5 alatti pI értékkel rendelkező fehérjék felkötődnek, az e felettiéket átmennek. A lizozim tehát az átfolyóba kerül.

(C) Alkalmazhatunk csökkenő pH-t (pH gradiens) vagy növekvő ionerőt („sógrádiens”)

(D) Csökkenő pH esetén a fehérjék várhatólag az egyre kisebb pI értékek sorrendjében eluálódnak, vagyis először az RNáz, és utoljára a fibronectin. Sógrádiens esetén a sorrend kevésbé jóslható, mert a kötődés függ a fehérjén lévő töltések számától és felszíni eloszlásától is.

67. Hogyan befolyásolja a gélszűrési kromatográfiát (A) az oszlop hossza, (B) az átmérője, (C) a töltet szemcsemérete, (D) a porúsága, (E) a minta térfogata és (F) az eluens áramlási sebessége?

68. Egy peptid keverékben az alábbi összetételű peptidok találhatók:

1. 25 % Ala, 10 % Gly, 10 % Ser, 10 % Ile, 10 % Leu, 5 % Glu, 5 % Gln, 10 % Lys, 5 % Phe, 10 % Val

2. 20 % Ala, 30 % Gly, 10 % Ser, 10 % Asn, 5 % Glu, 10 % Gln, 10 % Lys, 5 % Val

3. 20 % Ala, 20 % Gly, 15 % Ser, 10 % Asn, 5 % Asp, 15 % Gln, 10 % Lys, 5 % Val

Mind a három peptid mérete és izoelektromos pontja közelítőleg azonos. Milyen szeparációs módszert választana az 1. peptid elválasztására a másik kettőtől? (*)

69. A marha szérum albumin kvantitatív aminosav analízise szerint 0,58% triptofánt tartalmaz. A szérum albumin molekulatömege gélfiltrálás vagy gélelektroforézis adatokból meghatározva 70000-nek adódik. Hány triptofánt tartalmaz a szérum albumin? (A triptofán molekulatömege 204 Da.) (*)

70. A Gly-Ala-Val-Gly-Tyr-Arg-Val-Lys-Ser-Ile szekvenciájú dekapeptidet tripszinnel emésztjük. (A) Ioncserélő vagy gélszűrési kromatográfiával választaná el a keletkezett termékeket? (B) Melyik kromatográfias módszert alkalmazná, ha az emésztést tripszin helyett kimotripszinnel végeznénk? (*)

71. HPLC-vel szeparálunk aminosavakat C18 reverz fázisú oszlopon. (A) Milyen sorrendben eluálódhatnak a következő aminosavak: Met, Phe, Ser. (B) Miért? (*)

72. Karboximetil-cellulóz oszlopon akarunk szeparálni BSA-t ($pI=4,9$) és mioglobint ($pI=6,0$). Megfelelő-e, ha a kromatográfiát $pH=8,0$ -as pufferrel végezzük? Indokolja meg! (*)

73. Milyen eredménnyel járna, ha tejsav-dehidrogenáz izoenzim keveréket az enzim méretének megfelelő pórusméretű Sephadex gélfiltrációs oszlopra vinnénk fel? (*)

74. Milyen sorrendben eluálódnak egy 8, 15, 54, és 62 kDa molekulatömegű fehérjét tartalmazó keverék komponensei egy olyan gélfiltrációs oszlopról, amely 5-20 kDa mérettartományban szeparál? (*)

75. Egy peptidkeverék az alábbi három peptidet tartalmazza:

1. ValGluGluGluSerHisLysGlyTrpThr

2. ValGlnGlnGlnSerHisLysGlyTrpThr

3. GluGluGluHisLys

(A) Rajzolja fel az Glu és az Gln aminosavak szerkezetét semleges pH -n! Különbözik-e az első és a második peptid tömege? Ha igen, mekkora az eltérés? (Szén: 12 Da, Oxigén: 16 Da, Kén: 32 Da, Nitrogén: 14 Da, Hidrogén: 1 Da.)

(B) A peptidkeverék vizes oldatának pH -ját 6,0-ra állítjuk. Mekkora töltése van (közelítőleg) az egyes peptideknek ebben az oldatban? (pK értékek: N-terminális: 9, C terminális: 2, lizin: 10, arginin 12, aszparaginsav: 3, glutaminsav: 4, hisztidin: 6, cisztein: 8, tirozin: 10)

(C) Milyen eredményre számíthatunk, ha $pH=6,0$ -on, anioncserélő oszlopon próbáljuk meg a peptideket elválasztani és az elúciót lineáris sókoncentráció-gradienssel valósítjuk meg? Mi történne, ha kationcserélő oszlopot használnánk? Mi történne ugyanezen a pH -n géliszűrő oszlopon? (Melyik peptid kötődik? Melyik esik át? Eluálódó anyagok sorrendje? Indoklás!)

(D) Dolgozzon ki olyan kromatográfiás eljárást, melynek segítségével mindhárom peptidet el tudjuk választani egymástól! (*)

76. Egy peptidkeverék az alábbi négy peptidet tartalmazza:

1. LysGluHisLeuAsnHisTyrGlyTrpThrAla

2. ValGlnAlaGlnSerHisLysGlyTrpThrLysArgArg

3. AsnGlnGlyHisGlnSerLysLysAlaThrSer

4. AlaValTyrGluGluHisLysAspAspGlu

(A) A peptidkeverék vizes oldatának pH -ját 8,0-ra állítjuk. Mekkora töltése van (közelítőleg) az egyes peptideknek ebben az oldatban? (pK értékek: N-terminális: 9, C-terminális: 2, lizin: 10, arginin 12, aszparaginsav: 3, glutaminsav: 4, hisztidin: 6, cisztein: 8, tirozin: 10)

(B) Milyen eredményre számíthatunk, ha $pH=8$ -as pufferben, kationcserélő oszlopon folytatjuk át a peptidkeveréket?

(C) Végezzen közelítő számítást a kötődött peptidek izoelektromos pontjának meghatározására!

(D) Lineáris pH -gradienssel szeretnénk az elúciót megvalósítani. Milyen legyen ez és előreláthatólag mi lesz az elúciós sorrend? (*)

Elektroforézis technikák

77. SDS poliakrilamid gélelektroforézis során egy 30 kDa és egy 92 kDa molekulatömegű fehérje relatív mobilitása 0,80 illetve 0,41. Mi lehet a molekulatömege annak a fehérjének, aminek a relatív mobilitása 0,62 a fenti gélben? (MINTAFELADAT)

A relatív mobilitás és a molekulatömeg logaritmusai között lineáris összefüggés van.

Két pontra ($x_1 = \log 30000$, $y_1 = 0,80$) és ($x_2 = \log 92000$, $y_2 = 0,41$) fektetett egyenes ($y = mx + b$) meredeksége:

$$m = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) = (0,41 - 0,80) / (4,964 - 4,477) = -0,801$$

és tengelymetszete:

$$b = y_1 - m \cdot x_1 = 4,39$$

Az egyenes egyenlete tehát: $y = -0,801x + 4,39$

Az ismeretlen relatív mobilitását behelyettesítve:

$$(0,62 - b) / m = \log(M_r) = 4,702$$

$$M_r = 10^{4,702} = \underline{50320 \text{ Da}}$$

78. Gélszűrővel szeparálva a tropomiozin előbb eluálódik mint az aktin. Melyiknek lesz nagyobb a mobilitása SDS-PAGE-n és mi lehet a látszólagos ellentmondás magyarázata?
79. (A) Milyen előnyös tulajdonságokkal rendelkezik a poliakrilamid gél, ami miatt különösen alkalmas elektroforetikus alkalmazásra? (B) Milyen anionok vesznek részt az áram vezetésében a gyakorlaton alkalmazott akrilamid gélben a natív elektroforézis során (pH=8,8)? Írd le a képletüket pH 8,8-on!
80. (A) Milyen paraméterektől függ a gélelektroforézis során egy fehérje mobilitása? (B) Hogyan befolyásolja a minta mobilitását az urea (karbamid) illetve a Na-dodecilsulfát (SDS)?
81. Egy fehérje relatív mobilitása SDS-PAGE-n jelentősen nagyobb lesz merkaptotetanol jelenlétében, mint merkaptotetanol nélkül. Mi lehet a magyarázat?
82. SDS poliakrilamid gélelektroforezissel választunk el fehérjéket. Az elektroforézist állandó 150 V feszültség mellett végezzük 90 percig. Az áramerősség 100 mA a kísérlet során. A gél hossza 10 cm, a front futási távolsága 9,1 cm. Egy 25 kDa és egy 85 kDa molekulatömegű fehérje relatív mobilitása 0,85-nek illetve 0,45-nek adódott a kísérletben. (A) Mi lehet a molekulatömege annak a fehérjének aminek a relatív mobilitása 0,7 a fenti gélben? (B) Mekkora lenne egy olyan 60 kDa molekulatömegű dimer fehérje relatív mobilitása ezen a gélen, amelyben a két azonos tömegű polipeptidlánc között egy diszulfid-hidat találunk? (C) Mekkora lenne ugyanennek a fehérjének a mobilitása 2 merkaptotetanol jelenlétében, ugyanezen a gélen? (*)
83. Az enterokináz nevű enzim aktív tripszint hoz létre inaktív tripszinogénből úgy, hogy lehasítja a tripszinogén N-terminálisáról a következő pentapeptidet: Asp Asp Asp Asp Lys. A pentapeptid lehasítása nem okoz lényeges méretváltozást. Tudjuk-e demonstrálni az enterokináz működését natív gélelektroforézis és Coomassie-festés kombinálásával? Indoklás is szükséges!
84. Elválasztható-e natív gélelektroforézissel pH=8,8-on a vad típusú enzimtől egy olyan pontmutáns, amely az egyik Arg helyett His-t tartalmaz? (Arg: $pK_a = 12,0$, His: $pK_a = 6,5$)

Fehérje-ligandum kölcsönhatások

85. A receptormolekulák hány százaléka van komplexben, ha a szabad ligandum koncentrációja éppen a disszociációs állandó háromszorosa? (MINTAFELADAT)

$$K_d = [R][L] / [RL]$$

$$K_d = [R] \cdot 3K_d / [RL]$$

$$1/3 = [R] / [RL]$$

$$[RL] = 3[R]$$

Komplexben lévő receptormolekulák aránya:

$$[RL]/[R]_{\text{összes}} = [RL]/([RL]+[R]) = 3[R]/4[R] = 3/4 = 0,75$$

Tehát a receptormolekulák 75%-a van komplexben.

86. Mekkora a disszociációs állandó, ha a receptormolekulák 67%-a van komplexben és a szabad ligandum koncentrációja 5 μM ? (*)
87. Egyszerű fehérje-ligandum kölcsönhatás esetén a disszociációs állandó $3 \cdot 10^{-6}$ M. (A) Milyen a szabad fehérje: kötött fehérje arány, ha az egyensúlyi ligandum koncentráció 600nM? (B) Hány százaléka van a fehérjének ligand-kötött állapotban ekkor? (*)
88. (A) Számítsa ki a disszociációs állandót, ha tudjuk, hogy egy oldatban a teljes receptor koncentráció 5 μM , a szabad, egyensúlyi ligandum koncentráció 10 μM és a receptormolekulák 33%-a van komplexben! (B) Számítsa ki a teljes ligandum koncentrációt! (C) Számítsa ki, hogy a ligandum molekulák hány százaléka van komplexben! (*)
89. Egy fehérje komplexet alkot egy kisméretű ligandummal. A komplexben mindkettőből egyetlen molekula található. A disszociációs állandó 2 μM . A komplex oldatából, melyben a fehérje teljes koncentrációja 300 μM , dialízis zacskóba töltünk 1 ml-t, majd 99 ml foszfát pufferrel szemben dializáljuk. A dialízisre használt membrán a fehérjét nem engedi át, a ligandumot viszont igen. Az egyensúly beálltakor a külső oldatban a ligandum koncentrációja 5 μM . (A) A fehérjemolekulák hány százaléka van komplexben ekkor? (B) Számolja ki a dialízis előtti állapotra jellemző (moláris) ligandum: fehérje arányt! (*)
90. Egy Eppendorf-csőbe az alábbi oldatokat mérjük be: 10 μl receptor (100 μM -os törzsoldat) 20 μl ligandum (200 μM -os törzsoldat) 70 μl pH=7.5-ös foszfát puffer. A receptor monomer; egyetlen ligandum molekula megkötésére képes. A disszociációs állandó (K_d) 20 μM . Számítsa ki az egyensúlyi receptor, ligandum és receptor-ligandum komplex koncentrációkat! (*)
91. Egy fehérje komplexet alkot egy peptiddel. A komplexben mindkettőből egyetlen molekula található. A disszociációs állandó 30 μM . A fehérjemolekulák hány százaléka lesz peptid kötött állapotban, ha 10 μl 2mM-os fehérjeoldathoz 10 μl 2,2 mM-os peptid oldatot keverünk? (*)

Enzimkinetika

92. Milyen szubsztrát koncentráció esetén mérhetjük egy enzim maximális sebességének egy negyedét, ha a $K_M = 5 \cdot 10^{-3}$? (MINTAFELADAT)

$$v_0 = v_{\text{max}}/4$$

A Michaelis-Menten egyenletbe behelyettesítve:

$$v_0 = v_{\text{max}}[S]/(K_M+[S])$$

$$v_{\text{max}}/4 = v_{\text{max}}[S]/(K_M+[S])$$

$$1/4 = [S]/(5 \cdot 10^{-3}+[S])$$

$$[S] = 1,67 \text{ mM}$$

93. Egy enzimreakció sebességét mérjük fotometriásan a termék fényelnyelése alapján. A reakciókeverék térfogata 2 cm^3 , amely 5 μg enzimet tartalmaz. Az enzimreakció lineáris szakaszában az 1 perc alatt mért fényelnyelés változás $\Delta E = 0,15$ (1 cm-es küvettában mérve). A termék moláris extinkciós koefficiense: $\epsilon = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Az enzim moláris tömege: 50000 g/mol. Hány mól szubsztrátot alakít át 1 perc alatt 1 mól enzim? (MINTAFELADAT)

A Lambert-Beer törvény szerint: $E = \epsilon c l$

$$\Delta E = \Delta c \cdot l$$

$$\Delta c_{\text{termék}} = \Delta E/(\epsilon \cdot l) = 0,15/(3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$c_{\text{enzim}} = m_{\text{enzim}}/M_{\text{enzim}}/V = 5 \cdot 10^{-6} \text{ g}/50000 \text{ g mol}^{-1}/0,002 \text{ dm}^3 = 5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

$$\text{átviteli szám} = \Delta c_{\text{termék}}/(c_{\text{enzim}} \cdot t) = 100 \text{ min}^{-1}$$

1 mol enzim 100 mol szubsztrátot alakít át 1 perc alatt.

94. (A) Rajzolja fel az egy-szubsztrátos enzimreakció általános sémáját. (B) Mit nevezünk Michaelis-állandónak (K_M)?
95. Az enzimek reakció sebességét rendszerint a produktum mennyiségének mérése alapján és nem a szubsztrát fogyás alapján határozzuk meg. Miért?
96. Mi a K_M , a v_{max} és a k_{cat} dimenziója? (*)
97. Egy enzim kinetikai paramétereit mérjük. Szükséges-e ismernünk az $[E]_T$ értékét a K_M a v_{max} és a k_{cat} meghatározásához? (*)
98. Egy enzimreakció méréséhez a következő összetételű reakcióelegyet kell összemérni: 50 mM foszfát puffer, 2 mM NADH, 8 mM Na-piruvát, 5 $\mu\text{g/ml}$ tejsav-dehidrogenáz. (A) Milyen koncentrációjú törzsoldatokat készítene, és ezekből mennyit mérne be a 2 ml térfogatú reakcióelegybe, hogy a fenti összetétel alakuljon ki, és a bemérés pontossága miatt ne keljen 10 μl -nél kisebb térfogatokat bemérni? (Az egyes anyagok oldhatósága: NADH: $\sim 140 \text{ mM}$; Na-piruvát: $\sim 910 \text{ mM}$; foszfát puffer $\sim 1 \text{ M}$; tejsav dehidrogenáz $\sim 10 \text{ mg/ml}$.) (B) Milyen módon lehetne legegyszerűbben mérni a fenti enzim aktivitását? (Emlékezzünk a NAD/NADH spektrumára!) (*)
99. (A) Mi a v_0/v_{max} arány, ha az enzimreakció mérése során a szubsztrát koncentráció egyenlő a K_M érték háromszorosával? (B) Ebben az esetben a bemért enzim mennyiség hány %-a van szubsztráttal telítve? (*)
100. Egy enzim maximális sebessége $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$, a K_M pedig 2 mM. Mi a reakció sebessége 20 mM szubsztrát koncentráció esetén? (*)
101. Hány mol p-nitrofenil- β -D-glükozidot alakít át 1 mol glükozidáz enzim 1 másodperc alatt (moláris aktivitás, vagy átviteli szám), ha 2 ml térfogatú reakció elegyben, ami 5 μg enzimet tartalmazott, 2 perc alatt a mért extinkció változás 0,63. A p-nitrofenol moláris extinkciós koefficiense $\epsilon_{410} = 1,75 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a glükozidáz molekulatömege: 350000 Da. (*)
102. Tejsav dehidrogenáz aktivitását mérjük spektrofotométer segítségével. A 3 ml-es tesztbe 0,1 ml LDH törzsoldatot mérünk, amelynek koncentrációja 1 μM , valamint megfelelő mennyiségű szubsztrátokat. Az egyik szubsztrát fogyása alapján követjük a reakciót 340 nm-en. 5 perc alatt az extinkcióváltozás 0,6. A szubsztrát moláris extinkciós koefficiense $6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, az enzim molekulatömege 10^5 Da . (A) Mennyi az LDH specifikus aktivitása ($\mu\text{mol S/mg E/perc}$)? (B) Mennyi az enzim átviteli száma (k_{cat}) (s^{-1})? (Az enzim tetramer.) (C) Mik a reakció szubsztrátjai? (*)
103. A szénsav anhidratáz egyike a legnagyobb átviteli számmal rendelkező enzimeknek, Az enzim a CO_2 reverzibilis hidratációját katalizálja, ennek szerepe tődő és a szövetek közötti CO_2 szállításában van. Az eritrocita szénsav anhidratáz enzim molekulatömege $3 \cdot 10^4 \text{ Da}$. 10 μg tiszta szénsav anhidratáz 1 perc alatt 37 °C-on 0,7 g CO_2 hidratálását katalizálja. Számítsa ki az enzim átviteli számát (k_{cat})! (*)
104. Egy enzimreakció sebességét mérjük fotometriásan a termék fényelnyelése alapján. A reakciókeverék térfogata 1 cm^3 , amely 1 μg enzimet tartalmaz. Az enzimreakció lineáris szakaszában az 1 perc alatt mért fényelnyelés változás 0,3 Ext. (Abs) 1 cm-es küvettában mérve. A termék moláris extinkciós koefficiense $\epsilon = 6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Az enzim moláris tömege 25000 g/mol. Hány mól szubsztrátot alakít át 1 másodperc alatt 1 mól enzim? (*)
105. Tripszin aktivitást határozzunk meg BAPNA szubsztrát segítségével. (A) Mi a keletkező színes termék neve és szerkezeti képlete? (B) A tripszin törzsoldat koncentrációja 0,02 mg/ml, az enzim molekulatömege 25000 Da. Egy 2 ml-es tesztben 0,5 cm vastagságú küvettában 20 μl -nyi tripszin törzsoldat bemérése mellett a szubsztrát koncentráció növelésével legfeljebb $\Delta E = 0,4 \text{ min}^{-1}$ extinkció változási ütemet lehetett elérni. A termék moláris extinkciós koefficiense $\epsilon_{405} = 8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Számolja ki, hogy egyetlen tripszin molekula egyetlen másodperc alatt legfeljebb hány BAPNA molekulát alakíthat át. Minek nevezzük az így kapott adatot? (*)

- 106 A szintetáz reakciók során keletkező pirofoszfát hidrolízise fontos termodinamikai hajtó erő a bioszintetikus reakciókban. Az *E. coli* pirofoszfátáz enzime 120 kDa molekulatömegű és 6 azonos alegységből áll. Aktivitását úgy definiáljuk, hogy 1 enzim egység 10 μmol pirofoszfátot hidrolizál 15 perc alatt adott meghatározási feltételek mellett. A tisztított, homogén enzimpreparátum aktivitása: $v_{\max} = 2800$ egység / mg enzim. (A) Hány mol szubsztrátot hidrolizál el 1 mg enzim másodpercenként? (B) Hány mol szubsztrátot hidrolizál el 1 mol enzim másodpercenként? (C) Hány mol aktív hely van 1 mg enzimben? (D) Mi az átviteli száma az enzimnek? (*)
- 107 Egy enzim K_M paraméterét kívánjuk meghatározni. Ezért növekvő szubsztrát koncentráció függvényében mérjük a kezdeti sebességeket. A mérés végén derül ki, hogy a szubsztrátunk egy adott koncentráció felett kezd kicsapódni a reakció körülményei között. Hogyan befolyásolja ez a nem kívánt esemény a mérésünk eredményét?
- 108 Egy enzim reakció sebességét mérjük a szubsztrát koncentráció függvényében. Az enzim K_M értéke $2\mu\text{M}$. A mérés során az enzim koncentráció: 200nM , a szubsztrát koncentrációt pedig $0,1\mu\text{M}$ - $10\mu\text{M}$ tartományban kívánjuk változtatni. Miért rosszul tervezett ez a mérés és hogyan lehetne javítani rajta?
- 109 Penicillin rezisztens baktériumok penicillináz (más néven β -laktamáz) enzimet tartalmaznak, ami a penicillin hidrolízisét végzi. A *Staphylococcus aureus* penicillináz enzimének molekula súlya $19,6\text{ kDa}$. Aktivitás mérése során 10^{-9}g tisztított penicillinázt használtunk 10 ml térfogatú teszt oldatban. Az enzim 1 perc alatt mért aktivitását mértük a szubsztrát koncentráció függvényében, és feltételezzük, hogy szubsztrát koncentráció jelentősen nem változik a mérés során. Az aktivitás adatokat az alább látható táblázat tartalmazza. (A) Állapítsa meg, hogy a penicillináz követi-e Michaelis Menten kinetikát! (B) Ha igen akkor mi az enzim K_M és v_{\max} értéke? (C) Mi az enzim átviteli száma a mérés feltételei között? (*)

[penicillin] (μM)	hidrolizált penicillin mennyisége (nmol)
1	0,11
3	0,25
5	0,34
10	0,45
30	0,58
50	0,61

- 110 Egy enzim katalitikus sebességi állandója ($k_{\text{cat}} = 50\text{ s}^{-1}$). Az 1 ml végtérfogatú tesztben három perc alatt mért extinkció-változás $\Delta E = 0,36$. A termék moláris extinkciós koefficiense $8000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. (A) Mennyi enzimet tartalmaz az oldat? (B) Mennyi szubsztrátot kell bemérni a fenti tesztbe, ha azt akarjuk, hogy a kezdeti sebesség mérésének feltétele teljesüljön? (*)
- 111 A -20°C -os hűtőben találtunk egy Eppendorf-csővet „hu 4, 03.07.28.” felirattal. Laborunkban ez csak tripszin lehet, de több adat senkinek a jegyzőkönyvében nem szerepel. A tripszin oldat koncentrációját spektrofotometriásan határozzuk meg. Ehhez 10 szerezére hígítjuk a törzsoldatot, és 280 nm en megmérjük az extinkcióját. A kapott eredmény $E_{280}=0,2$. Ezt követően a tripszinoldat enzimatis aktivitását is megmérjük. 1 ml végtérfogatba $10\mu\text{l}$ 50 -szerezre hígított enzimet és $10\mu\text{l}$ 15 mM -os Z Gly Pro Arg p nitroanilin szubsztrátot mérünk be. Mekkora hányada aktív az enzimnek, ha az időgörbe lineáris szakaszának meredeksége $0,72\text{ min}^{-1}$? (A tripszin moláris extinkciós koefficiense $\epsilon_{280}=40000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a p-nitroanilin moláris extinkciós koefficiense $\epsilon_{405}=8000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A fényút hossza mindkét esetben $l=1\text{ cm}$. A humán tripszin 4 kinetikai konstansai 37°C -on megközelítőleg $k_{\text{cat}}=300\text{ s}^{-1}$, $K_M=5\cdot 10^{-5}\text{ M}$) (*)
- 112 Egy enzimreakcióban a K_M várhatólag $0,1\text{--}1\text{ mM}$ nagyságrendű. Mekkora térfogatokat mérnénk hat különböző csőbe a rendelkezésre álló 2 mg/ml koncentrációjú enzim- illetve 100 mM és 10 mM koncentrációjú szubsztrát törzsoldatokból 2 ml végtérfogatú tesztekbe a K_M meghatározásához (az enzim végkoncentrációja $10\mu\text{g/ml}$ legyen)? (*)
- 113 (A) Hogyan mérné a tripszin aktivitását? (B) Hogyan változik a v_{\max} értéke kompetitív inhibitor jelenlétében? (C) Hogyan változik a K_M és a v_{\max} , ha irreverzibilisen gátoljuk az enzim molekulák harmadát?
- 114 Egy enzimreakció sebességét mérjük különböző szubsztrátkoncentrációknál inhibitor jelenlétében és távollétében. Inhibitor jelenlétében minden szubsztrát koncentrációnál rendre kisebb sebességet mérünk, mint az inhibitor

távollétében, mégis az extrapolált v_{\max} értéke inhibitor jelenlétében és távollétében azonos értéknek adódik. Értelmezze az eredményt!

Géntechnológia

- 115 Egy 20 bázispárt tartalmazó DNS szegmensben 7 db guanint találunk. Hány adenin van a szegmensben? (MINTAFELADAT)

20 bázispár \rightarrow 40 bázis

$C = G \rightarrow$ G-ből és C-ből is 7-7 db-ot találunk

$A+T = 40-(C+G) = 40-(7+7) = 26$ bázis (A és T összesen)

$A = T \rightarrow 26/2 = 13$ db Adenin

- 116 (A) Írja fel azt a mRNS szekvenciát, ami az alábbi DNS szakasról íródik át! (B) Írja fel azt az aminosav szekvenciát, ami ennek az mRNS szakasznak felel meg, feltételezve, hogy a leolvasási keretbe illeszkedik a megadott mRNS szakasz! (*)

5'CATCCAATCACTAGGCAA 3'

- 117 Milyen szekvenciájú polipeptid keletkezik *in vitro* egy sejtmentes fehérje szintetizáló rendszerben, ha poli(UUAC) templátot adunk a rendszerhez? (*)

- 118 Egy diploid szervezetben a haploid genom mérete: 45000 kb. A genom 21% guanin bázist tartalmaz. Számítsa ki a mind a 4-féle bázis darabszámát a diploid genomban! (*)

- 119 Írja fel azt a két 10-10 tagú primer szekvenciáját, aminek segítségével PCR reakcióban amplifikálható az alábbi DNS szegmens: (*)

ATAGGCATAGGCCATATGGCATCTTTATAATATGCGATAGGCGCTGGTCA

Bioinformatika

- 120 (A) Azonosítsa a következő nukleotid szekvenciát a *BLAST* hasonlóság kereső program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) segítségével! (B) Fordítsa le a szekvenciát a *Translate* program (<http://web.expasy.org/translate/>) segítségével, majd azonosítsa a fehérjeszekvenciát is a *BLAST* programmal! (C) Keresse meg a fehérjét a *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>) adatbázisban! (D) A *ProtParam* program (<http://web.expasy.org/protparam/>) segítségével határozza meg a fehérje elméleti izoelektromos pontját és moláris extinkciós koefficiensét!

TACGCAATGCGTATCATTCTGCTGGGCGCTCCGGGCGCAGGTAAAGGTAAGGCTCAATTCAT
 CATGGAGAAATACGGCATTCCGCAAATCTCTACTGGTGACATGTTGCGCGCCGCTGTAAAAGCAG
 GTTCTGAGTTAGGTCTGAAAGCAAAGAAATTATGGATGCGGGCAAGTTGGTGACTGATGAGTTA
 GTTATCGCATTACTCAAAGAACGTATCACACAGGAAGATTGCCGCGATGGTTTTCTGTTAGACGG
 GTTCCCGGTACCATTCTCAGGCAGATGCCATGAAAGAAGCCGGTATCAAAGTTGATTATGTGC
 TGGAGTTTGATGTTCCAGACGAGCTGATTGTTGAGCGCATTGTTCGGCCGTCGGGTACATGCTGCT
 TCAGGCCGTGTTTATCACGTAAATTCAACCCACCTAAAGTTGAAGATAAAGATGATGTTACCGG
 TGAAGAGCTGACTATTCGTAAAGATGATCAGGAAGCGACTGTCCGTAAGCGTCTTATCGAATATC
 ATCAACAACACTGCACCATTGGTTTCTTACTATCATAAAGAAGCGGATGCAGGTAATACGCAATAT
 TTAAACTGGACGGAACCCGTAATGTAGCAGAAGTCAGTGCTGAACTGGCGACTATTCTCGGTTA
 ATTCTGGATGGCCTTATAGCTAAGGCGGTTAAGGCCGCTTAGCTATTTCAAGTAAGAAGGGCG
 TAGTACCTACAAAAGGAGATTTGGCATGATGCAAAGCAAACCCGGCGTATTAATGGTTAATTTGG
 GGACACCAGATGCTCCAACGTCGAAAGCTATCAAGCGTTATTTAGCTGAGTTTTTGAGTGACCGC
 CGGGTAGTTGATACTTCCCCATTGCTATGGTGGCCATTGCTGCATGGTGTATTTTACCGCTTCG
 GTCACCACGTGTAGCAAACTTTATCAATCCGTTTGGATGGAAGAGGGCTCTCCTTTATTGGTTT
 ATAGCCGCCCGCAGCAGAAAGCACTGGCAGCAAGAATGCCTGATATTCCTGTAGAATTAGGCATG
 AGCTATGGTTTAC

12. Azonosítsa az alábbi fehérjeszekvenciát a *BLAST* hasonlóság kereső program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) segítségével! Vannak-e ortológjai?

MCDEDETTALVCDNGSGLVKAGFAGDDAPRAVFPISVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRG
ILTLKYPHIEHGIITNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPPEHPTLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFN
VPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIMRLDLAQRDLTDYLMKIL
TERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCP
ETLRFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDLYANNVMSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPS
TMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWITKQEYDEAGPSIVHRKCF

13. Azonosítsa az alábbi fehérjeszekvenciát a *BLAST* hasonlóság kereső program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) segítségével! Azonosítsa fehérje egy humán, egy archaea és egy növény ortológját is! Mekkora a hasonlóságok?

APSRKFFVGGNWKMNKRKKNLDELITLNAAKVPADTEVVCAPPTAYIDFARQKLDPKIAVAQAQ
CYKVTNGAFTGEISPGMIKDCGATWVVLGHSERRHVFGEDELIGQKVAHALSEGLGVIACIGEK
LDEREAGITEKVVFEQTKVIADNVKDWSKVVLAYEPVWAIGTGKTATPQQAQEVHEKLRGWLKSN
VSDAVAQSTRIIYGGSVTGATCKELASQPDVDGFLVGGASLKPFDIINAKQ

12.1. Megoldások

Mértékegységek és oldatok

- 1.
- 2.
3. (A) $1,98 \cdot 10^{12}$ db
(B) $3,94 \cdot 10^{10}$ db
(C) 50 db
4. (A) $1,1 \cdot 10^{-12}$ g
(B) 5,36 %
(C) 4,56 %
(D) 54,54 db
(E) $3,32 \cdot 10^{-9}$ mol/dm³
(F) 127470 db
5. (A) 1,6 mm; Az E. coli sejt kb. 1 µm, tehát a DNS sokkal hosszabb => össze van tekerve.
(B) 3914 db
6. 5 db
7. 95,5 nm
8. 70257 Da
9. 501833 Da
10. 32-42 peptidkötés / s
11. 200000 Da

12. 15879 Da

13. 13201 Da

14. 0,089 %

15. (A) $1,01 \cdot 10^{-2} \text{ mol} / 685,48 \text{ g}$

(B) $4,03 \cdot 10^{-2} \text{ mol}$

(C) 4,93 l

16. $1000 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$, $1 \text{ } \mu\text{mol/ml}$

17. $0,2 \text{ dm}^3$

18. (A) $5,85 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$

(B)

(C) $3,78 \cdot 10^{-1} \text{ mM}$

19. (A) $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$

(B) 0,1 vegyes %

20. 28,2 ml

21. (A) 2 mg/ml

(B) 0,2 vegyes %

22. Összemérni: 2 ml kálium-foszfát puffer + 25 ml szérumalbumin + 0,877 g NaCl, majd vízzel feltölteni 100 ml-re.

23. tejsav: 0,2 ml (200 μl); foszfát puffer : 0,8 ml (800 μl); NAD: 0,02 ml (20 μl); tejsav dehidrogenáz: 0,011 ml (11 μl)

Ionizációs egyensúlyok

24.

25.

26. (A) 4,06

(B) 4,36

(C) 4,66

27. $m_{\text{Na-H-szukcinát}} = 2,12 \text{ g}$; $m_{\text{Na2-szukcinát}} = 5,65 \text{ g}$

28. 1,97 ml

29. (A) $2,51 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$

(B) $3,16 \cdot 10^{-8} \text{ M}$

(C) 7,5

30. (A) 1,55

(B) 0,19 ml

31. (A) 1,73

(B) 1,58 ml

32. (A) 76%

(B) +0,76

33. (A) 24%

(B) -0,76

34. (A) 6

(B) His

35. 5.5

36. 6,25 ml

37. **Biomolekulák spektrofotometriája**

38.

39.

40.

41.

42. 6 db

43. 8 (mol Lys/mol feh.)

44. 0,44

45. (A) 4mg/ml

(B) 20000 Da

46. (A) 4,4 mg/ml

(B) 44000 Da

47. (A) 990 Da

(B) $1,31 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

(C) 0,982 mg/ml

48. (A) $2,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

(B) 1 mg/ml

49. (A) 16,6%

(B) 0,97

(C) 44,7 μg HMV és 242,6 μg NaMV

Sejtek feltárása és fehérjék izolálása

50.

- 51.
- 52.
53. Specifikus aktivitás egység/mg fehérje: 200; 600; 666,6; 1500; 15000; Kitermelés (%): 100 %; 75 %; 25 %; 18,7 %; 16,8 %
54. Specifikus aktivitás (homogenizátum): 6nmol/min/mg fehérje; specifikus aktivitás (tisztított enzim): 0,88μmol/min/mg fehérje; tisztulás: 148-szoros; kitermelés: 37%-os.

Peptidek és fehérjék

- 55.
- 56.
57. (A) kevésbé
(B) igen
- 58.
59. humán
- 60.
61. Ala-Val-Arg-Tyr-Ser-Arg
62. (A) pH=7 esetén: +1, pH=9 esetén: 0
(B) pI=9
(C) két peptid keletkezik
(D) három peptid keletkezik
(E) négy peptid keletkezik
63. A lánc: Ala-Val-Cys-Arg-Thr-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Leu
B lánc: Tyr-Lys-Cys-Phe-Arg-His-Thr-Lys-Cys-Ser
Diszulfid-hidak: (A)Cys3-(B)Cys9 és (A)Cys7-(B)Cys3

64. **Kromatográfiai módszerek**

- 65.
- 66.
- 67.
68. Hidrofób kromatográfia.
69. 2 db
70. (A) Tripszines kezelés esetében mindkettőre szükség van.
(B) Kimotripszines kezelés esetén ioncsere.
71. (A) A sorrend: Ser, Met, Phe.
(B) A poláris molekulák kevésbé, az apoláris molekulák jobban kötődnek a reverz fázisú töltethez.

72. Nem megfelelő, mert $\text{pH}=8,0$ -on mind két fehérje negatív töltésű, ezért nem kötődik a negatív töltésű karboximetil-cellulózhoz.
73. Az izoenzim keveréket gélszűrési kromatográfiával nem tudjuk elválasztani, mert a négy alegységből felépülő tetramerek mérete gyakorlatilag azonos, csak a töltésük különbözik.
74. Elsőként az 54 és a 62 kDa molekulatömegű fehérje együtt eluálódik a kizárási térfogatban; ezután a 15kDa, végül a 8kDa molekulatömegű fehérje eluálódik, feltéve, hogy alakjukban nincs nagy aszimmetria.
75. (A) A tömegek között nincs különbség.
 (B) 1.: -1,5; 2.: +1,5; 3.: -1,5
 (C) Anioncsere: 1. és 3. kötődik, 2. átesik (pozitív); elúciónál 1. és 3. egy csúcsot ad, mert a töltésük megegyezik. Kationcsere: 2. kötődik, 1. és 3. átesik (negatív), elúciónál 2. egy csúcsot ad. Gélszűrés: nincs különbség az 1. és 2. mérete között, ezek 1 csúcsot adnak, a 3. mérete kisebb, ez egy külön csúcsot ad, amelyhez nagyobb elúciós térfogat tartozik, mint az első csúcsához.
 (D) Pl. gélszűrés, majd 1.+2.-ra anioncsere.
76. (A) 1.: 0; 2.: +4; 3.: +2; 4.: -4
 (B) A 2. és a 3. peptid kötődik, a többi átesik.
 (C) 2. $\text{pI}=12$; 3. $\text{pI}=10$
 (D) Emelkedő pH gradiens: $\text{pH}=8 \Rightarrow \text{pH}=13$. Sorrend: 3., majd a 2. peptid.

Elektroforézis technikák

77.
 78.
 79.
 80.
 81.
 82. (A) 39559 Da
 (B) 0,56
 (C) 0,79

83.

Fehérje-ligandum kölcsönhatások

85.
 86. $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
 87. (A) $[\text{P}]/[\text{PL}] = \underline{5}$
 (B) 16,67 %
 88. (A) $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
 (B) $1,165 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

(C) 14,16 %

89. (A) 71,43%

(B) 2,38

90. $[RL] = 6,28 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; $[R] = 3,72 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; $[L] = 3,372 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

91. 88%

Enzimkinetika

92.

93.

94.

95.

96. $[K_M] = \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $[v_{\text{max}}] = \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $[k_{\text{cat}}] = \text{s}^{-1}$

97. K_M : nem; v_{max} : nem; k_{cat} : igen

98. (A) Tejsav-dehidrogenáz: 0,5 mg/ml-es törzsoldatból 20 μl -t; Na-piruvát: 400 mM-os törzsoldatból 40 μl -t; NADH: 100 mM-os törzsoldatból 40 μl -t; foszfát puffer: 500 mM-os törzsoldatból 200 μl -t (SOK JÓ MEGOLDÁS LÉTEZIK!)

(B) Abszorbancia követése 340 nm-en.

99. (A) 3/4

(B) 75%

~~10~~ 90,9 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$

~~11~~ 42 mol p-nitrofenil- β -D-glükózidot alakít át 1 mol glükózidáz enzim 1 másodperc alatt.

~~12~~ (A) 6 $\mu\text{mol S/mg E/min}$

(B) 2,5 s^{-1}

(C) piruvát és NADH, illetve laktát és NAD^+ (a reakció reverzibilis)

~~13~~ 795000 s^{-1}

~~14~~ 1 mol enzim 2,08 mol szubsztrátot alakít át 1 s alatt.

~~15~~ (A) para-nitroanilin

(B) 1 tripszin molekula legfeljebb 208 BAPNA molekulát alakít át másodpercenként (átviteli szám)

~~16~~ (A) $3,11 \cdot 10^{-5} \text{ mol PP}_i / \text{s} / \text{mg enzim}$

(B) 1 mol enzim másodpercenként 3732 mol szubsztrátot hidrolizál.

(C) $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$

(D) 622 s^{-1}

~~17~~

~~18~~

10 (A) Követi Michaelis-Menten kinetikát!

(B) $K_M = 5,22 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; $v_{\max} = 1,14 \cdot 10^{-9} \text{ M/s}$;

(C) $k_{\text{cat}} = 224 \text{ s}^{-1}$;

110 (A) $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol/dm}^3$

(B) $9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (minimális bemért szubsztrátkoncentráció)

111 66,7%

112 Enzim: 10 μl ; 100mM-os szubsztrát: 200 μl , 100 μl , 20 μl ; 10mM-os szubsztrát: 100 μl , 20 μl , 10 μl

113

114 **Géntechnológia**

115

116 (A) 5'UUGCCUAGUGAUUGGAUG 3'

(B) Leu-Pro-Ser-Asp-Trp-Met

117 [Leu-Leu-Thr-Tyr]_n

118 A, T = $5,22 \cdot 10^7 \text{ db}$; C, G = $3,78 \cdot 10^7 \text{ db}$

119 Forward primer: 5' ATAGGCATAG 3'; Reverse primer: 5' TGACCAGCGC 3'

Bioinformatika

120

121

122

13. fejezet - Utószó

Az itt elsajátított információk és képességek igazi próbája, ha azokat a hallgatók majd a biokémiai laboratóriumi gyakorlatban valós problémák megoldására is alkalmazni tudják. A kurzus és a tananyag célja, hogy ebben a komplex tanulási folyamatban segítséget nyújtson a hallgatók számára. Az alábbiakban összefoglaljuk azokat a fogalmakat és ismereteket, melyeket a kurzus során tárgyaltunk. Ezek a szerzők véleménye és tapasztalata alapján fontosak lesznek majd a jövő biológus szakemberei számára, s segítenek abban, hogy megállják a helyüket a biokémiai mérések és kísérletek kivitelezése során, akár az alap- vagy az alkalmazott kutatások terén.

1. Biokémiai és molekuláris biológiai eszközök

műanyag és üveg edények; pipetták; tömeg és pH mérés; biokémia gyakorlatban használatos berendezések: vízlágyító, centrifugák, spektrofotométerek, rázó és inkubátorok; a molekuláris biológia fontosabb eszközei: PCR készülék, elektroporátor, homegenizálók, géldokumentációs kamerák; steril munkaeszközök; biológiai minták tárolása

2. Mértékegységek és oldatok

oldatok készítése, koncentrációk (mg/ml, vegyes %, molaritás), fehérjék és egyéb makromolekulák molekulatömege, különböző mennyiségek kifejezésének lehetőségei (prefix, exponenciális, kerekítés), dialízis

3. Ionizációs egyensúlyok

sav-bázis reakciók vizes közegben; a Henderson-Hasselbalch egyenlet; a pK_a érték; pufferek, az ionizáció mértékét befolyásoló tényezők, a töltések becslése, pI (izoelektromos pont), a pH mérése

4. Spektrofotometria, fehérjekoncentráció mérése

transzmittancia és abszorbancia kapcsolata; a Lambert-Beer törvény; a fotométer működési elve; ATP, NAD^+ és NADH, aminosavak, fehérjék, nukleotidok és DNS spektrumai; DNS és fehérje koncentráció mérése és számolása a gyakorlatban; a kalibráló egyenes használata

5. Sejtek feltárása és fehérjék izolálása

biológiai minták feltárása makromolekulák tisztításához; egy fehérje tisztításának lépései; enzimek stabilitása; sejtfeltárás; differenciál és sűrűség gradiens centrifugálás; fehérjék oldhatósága; a pI érték jelentősége; durva frakcionálási módszerek: kisózás, besózás, irreverzibilis kicsapás; dialízis és ultraszűrés; liofilizálás

6. Kromatográfiai módszerek

géliszűrés, ioncsere, hidrofób kölcsönhatáson alapuló és affinitás kromatográfia; egy kromatográfiai munkaállomás felépítése; kromatográfiai oszlopok; állófázis és mozgó fázis fogalma; oszlopok felbontása és kapacitása; kromatográfiai eljárások tervezése és lépései; FPLC és HPLC; egy oldható fehérje izolálásának sémája

7. Elektroforézis technikák

elektroforézis; gélelektroforetikus technikák: natív és SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE), izoelektromos fókuszálás, denaturáló PAGE, 1D- és 2D-elektroforézis, agaróz gélelektroforézis; detektálási módszerek: festés, lenyomat (blotting) technikák (Western-blott), enzimográfiák

8. Fehérje-ligandum kölcsönhatások

a disszociációs állandó (K_d); a szabadentalpia változás és a kötési állandó közötti összefüggés; a kötési állandó kísérletes meghatározása: Scatchard plot; affinitás és specificitás; H-kötés, van der Waals- és ionos kötések, a hidrofób effektus szerepe a molekuláris felismerésben; kölcsönható partnerek keresésére és a kötődés mérésére alkalmas módszerek

9. Enzimkinetika

a szubsztrát telítési hiperbola függvény; kezdeti sebesség értékek kísérletes meghatározása; a Michaelis-Menten egyenlet; k_{cat} , V_{max} , K_M , k_{cat}/K_M paraméterek jelentése és értékük meghatározási, kiszámítási módjai.

10. Géntechnológia

rekombináns DNA és molekuláris klónozás; polimeráz láncreakció (PCR); plazmid vektorok; restrikciós endonukleázok; DNS-ligázok; a rekombináns DNS sejtbe juttatása (transzformálás); plazmid izolálás és DNS agaróz gélelektroforézis

11. Bioinformatika

DNS, fehérje szekvencia és térszerkezet adatbázisok (Genbank, UniProt, PDB); szekvenciák azonosítása és analízise (BLAST); az adatbázisok használata a biokémiai gyakorlatban; homológ, ortológ és paralóg gének, fehérjék; makromolekulák térszerkezete és molekuláris grafika

Végezetül egy csokorra való, „az élet” valós problémáit tükröző feladvány kerül bemutatásra. Ezek megvitatását és átgondolását csoportos munka keretében javasoljuk. Ezzel is közelíthetünk a valós helyzethez: a biokémiai munka kutatócsoportokban zajlik, ahol a kutatók csapatban dolgoznak egy probléma megoldásán.

1. Tervezzen meg egy komplex kísérletet, melynek segítségével egy újonnan izolált proteáz enzim aktivitásának jellemzését hajthatja végre!

Milyen reagensekre van szüksége, milyen kísérleteket hajtana végre? Hogyan választana szubsztrátot? Hogyan követné nyomon a szubsztrát fogyását? Tételezzük fel, hogy az újonnan felfedezett proteázra es annak egy szubsztrátjára a K_M értéke várhatólag 0.1-1 mM nagyságrendű. Különböző kromatográfiás eljárások alkalmazásán keresztül sikerült egy tiszta proteáz oldatot előállítani egy olyan szövetmintából, amelyben ez a proteáz nagy mennyiségben van jelen. Ennek az oldatnak a koncentrációja Biuret módszerrel megmérve - egy BSA standard-oldat hígítási sorának felhasználása révén – 2 mg/ml-nek adódik. Legalább, hány mérési pont szükséges ahhoz, hogy a K_M értéket kielégítő pontossággal tudja meghatározni? Ábrázolja sematikusán a várt szubsztrát-telítési görbét! Ebből a görbéből milyen módszerekkel tudja a K_M értékét meghatározni? Mekkora térfogatokat mérne be a kémcsövekbe a rendelkezésre álló tisztított proteáz mintából, illetve a 100 mM és 10 mM koncentrációjú szubsztrát törzsoldatokból, továbbá az 1M-os puffer törzsoldatából, hogy az egyes minták össztérfogata 2 ml legyen? (Természetesen először döntse el, hogy milyen koncentrációban fogja az enzimet, illetve a szubsztrátot az egyes oldatokba bemérni; a puffer koncentrációja 20 mM legyen. Készítsen táblázatot az előállítandó oldatok komponenseinek és a bemért mennyiségek feltüntetésére!

2. Tervezzen meg egy kísérletet, melyben egy DNS-kötő fehérje (pl. egy transzkripció faktor) affinitását kívánja meghatározni DNS-hez.

Milyen reagensekre van szüksége, milyen kísérleteket hajtana végre? Hogyan követné nyomon a fehérje kötődését a DNS-hez? Tételezzük fel, hogy a fehérje-DNS komplex disszociációs állandója 10 nM és 100 nM között van. Legalább, hány mérési pont szükséges, hogy a K_d értékét megbízhatóan tudjuk mérni? Hogyan állítaná össze a szükséges oldatokat? Rajzolja fel sematikus formában a várt kötődési görbét! Egy további kísérletben arra kíváncsi, hogy a transzkripció faktor DNS-kötő felszínén elhelyezkedő aminosavak mutációi, hogyan befolyásolják a fehérje DNS-hez való kötődésének energetikáját. Rekombináns DNS technológián alapuló technikák segítségével előállít 2 db pontmutáns (m1, m2) és egy kettős pontmutáns fehérjét (m3). (m1: T104A, m2: R321A, m3: T104A, R321A). Ezek tisztított formában állnak rendelkezésre. Fenti kötődési esszével meghatározza, hogy az m1-3 mutáns fehérjék mekkora affinitással kötődnek a DNS-hez (vad-típusú fehérje: 20 nM, m1: 40 nM, m2: 200 nM, m3: 1 μ M). Rajzolja fel a négy fehérje DNS kölcsönhatásához tartozó szabadentalpia csökkenés mértékét egy energia diagrammon! Mekkora az egyes mutációkhoz tartozó $\Delta\Delta G$ értékek? Gondolkodjon el, hogy az egyes mutánsok esetében milyen kölcsönhatások hiánya okozhatja az affinitáscsökkenést a DNS-hez? Mi lehet az oka, hogy az m3-as kettős mutáns „furcsán” viselkedik?

3. Cél a human növekedési faktor előállítása mg mennyiségben, homogén formában. Hogyan csinálná?

4. Biokémiai kísérletek során felmerült egy eddig ismeretlen enzim létezése, amely fontos funkciót látszik betölteni kötőszöveti sejtekben.

A feladat egy kutatási terv elkészítése a következő célkitűzésekkel: az enzimaktivitás igazolása, majd jellemzése, az enzim azonosítása (amennyiben ismert már ilyen, vagy hasonló enzim), annak a lehetőségnek a megteremtése,

hogy az enzim szerkezetét és működését lehessen tanulmányozni (pl. irányított mutagenezissel és röntgen krisztallográfiával). Állítsa össze a kutatási terv főbb pontjait azok módszertani oldalára helyezve a súlyt. Használatuk célszerű sorrendjében adja meg milyen módszereket alkalmazna a kitűzött célok elérése érdekében.

5. Egy enzim szubsztrát-telítési görbáját akarjuk felvenni.

A reakcióhoz 2-30 μM koncentráció tartományban használjuk a szubsztrátot. A szubsztrát egy gyenge bázis típusú szerves molekula. Mólómege 310 g/mol és pK_a értéke 6,8. Oldhatósága pedig 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pH 8,0-on, ahol az enzimaktivitásnak maximuma mérhető. Az enzimaktivitás mérését 1 mL végtérfogatban végezzük, aminek során a maximálisan adható szubsztrát törzsoldat térfogat 30 μL lehet. Milyen töménységű törzsoldatot kellene készíteni a szubsztrátból, és milyen módon lehet azt megtenni?

6. Hogyan határozná meg, hogy egy DNS minta milyen mértékben szennyezett fehérjével?

7. A laborban két plazmid DNS mintát véletlenül összekevert.

Egyik egy „A” fehérje vad típusú DNS-ét, míg a másik egy „B” fehérje mutáns DNS-ét tartalmazza. Hogyan tudná menteni a helyzetet és megállapítani, hogy melyik minta melyik plazmid DNS-t tartalmazza?

8. Egy inhibitor egy kináz enzimet kompetitív módon gátol.

Hogyan határozná meg az inhibitor kötődési affinitását az enzimhez (K_d)? Hová kötődhet az inhibitor?

Eredményes tanulást és feladatmegoldást kíván az ELTE Biokémiai Tanszék szerzői munkaközössége!

Irodalomjegyzék

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.: Biochemistry (2012) 7th edition, W. H. Freeman and Company, New York; ISBN-13: 9781429229364

Nelson, D.L., Cox, M.M.: Principles of Biochemistry (2008) 5th edition, W. H. Freeman and Company, New York; ISBN-13: 9780716771081

Voet, D., Voet, J.G., Prat, C.W.: Fundamentals of Biochemistry (2009) 3d edition, John Wiley et Sons, ISBN: 978-0-470-22842-5

Voet, D., Voet, J.G.: Biochemistry (2011) 4th edition, John Wiley et Sons, ISBN-13: 978-0470570951