

# 06.

## Fehérje-vizsgálati módszerek:

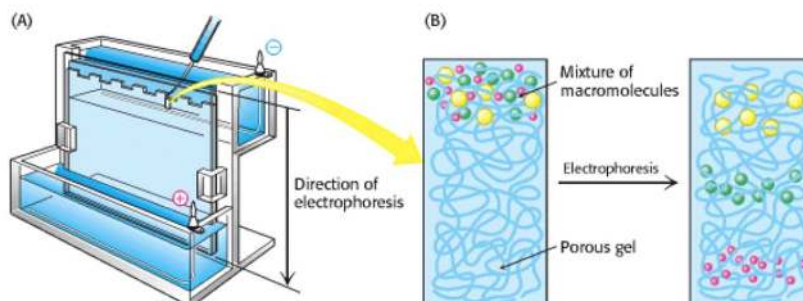
SDS-PAGE, kromatográfia, szekvenálás, szintézis, NMR, kristallográfia stb.

1

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## SDS-PAGE: a leggyakrabban használt módszer

SDS: nátrium-dodecil-szulfát  
PA: poli-akrilamid  
GE: gél-elektroforézis



**Figure 4.7. Polyacrylamide Gel Electrophoresis.** (A) Gel electrophoresis apparatus. Typically, several samples undergo electrophoresis on one flat polyacrylamide gel. A microliter pipette is used to place solutions of proteins in the wells of the slab. A cover is then placed over the gel chamber and voltage is applied. The negatively charged SDS (sodium dodecyl sulfate)-protein complexes migrate in the direction of the anode, at the bottom of the gel. (B) The sieving action of a porous polyacrylamide gel separates proteins according to size, with the smallest moving most rapidly.



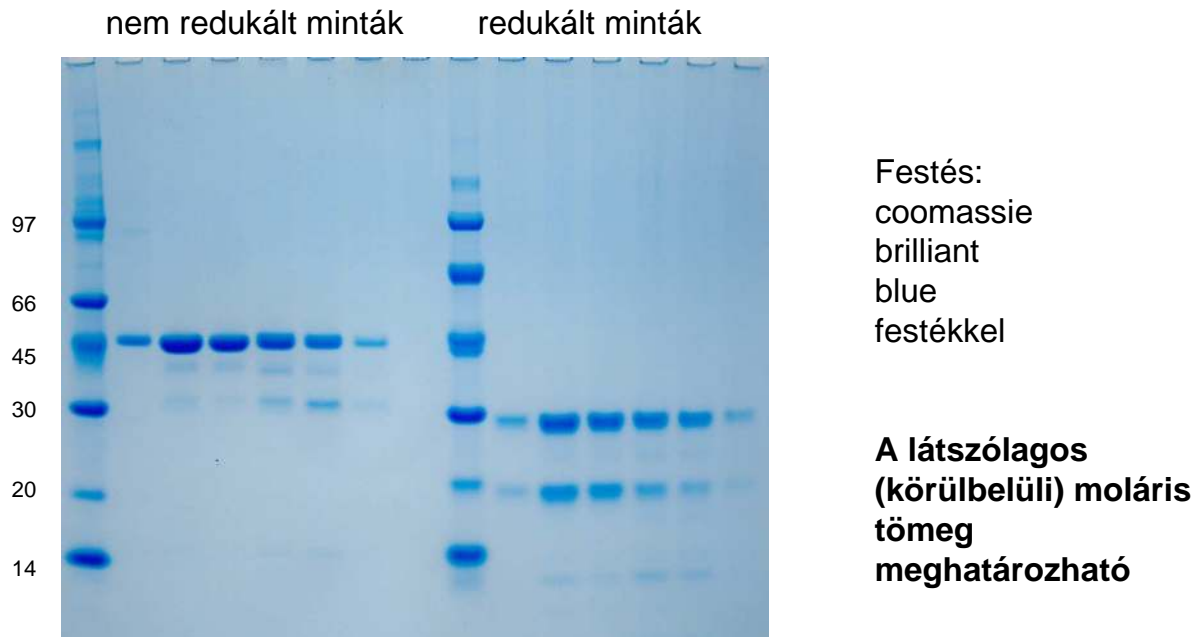
Sodium dodecyl sulfate (SDS)

Mit csinál az SDS a fehérjékkel?

2

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

# SDS-PAGE



Redukáló szer hatására a fenti fehérje két sávot ad. Mire lehet ebből következtetni?

Mi a Da, ill. kDa?

3

## MS: a moláris tömeg pontos meghatározása

MS: tömegspektrometria (mass spectrometry)

példa: MALDI-TOF = matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight  
MS

A mátrixanyag közreműködésével lézer hatására következik be az ionizáció és a gáz fázisba kerülés.

time of flight: repülési idő

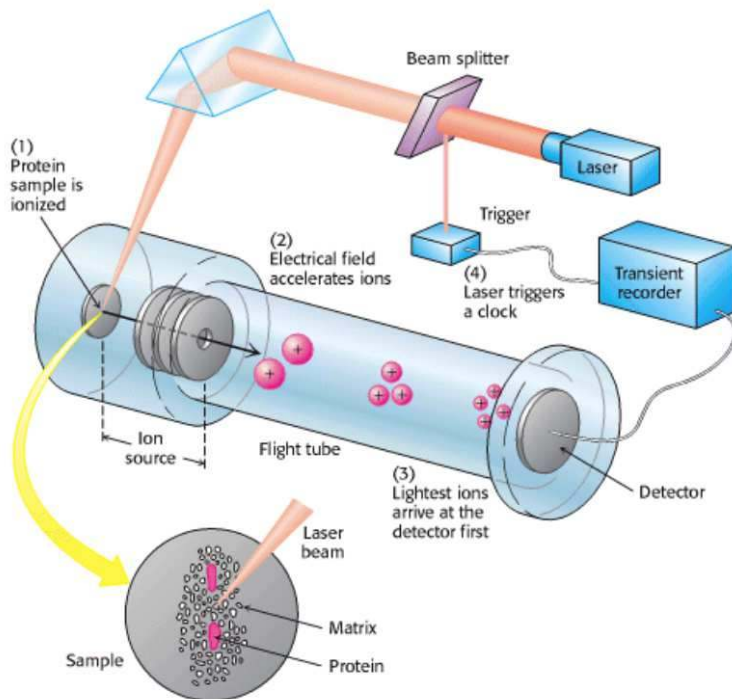
$$F = m \cdot a = E \cdot q = E \cdot z \cdot e$$

(E: elektromos térerő, e: elektron töltése, z: töltésszám)

gyorsulás:  $a = E \cdot e \cdot z / m$  (a tömeg-töltés aránytól függ)  $d = \frac{1}{2} \cdot a \cdot t^2$

A repülési idő (t), a térerő (E), és a detektortávolság (d) alapján a tömeg/töltés (m/z) kiszámolható.

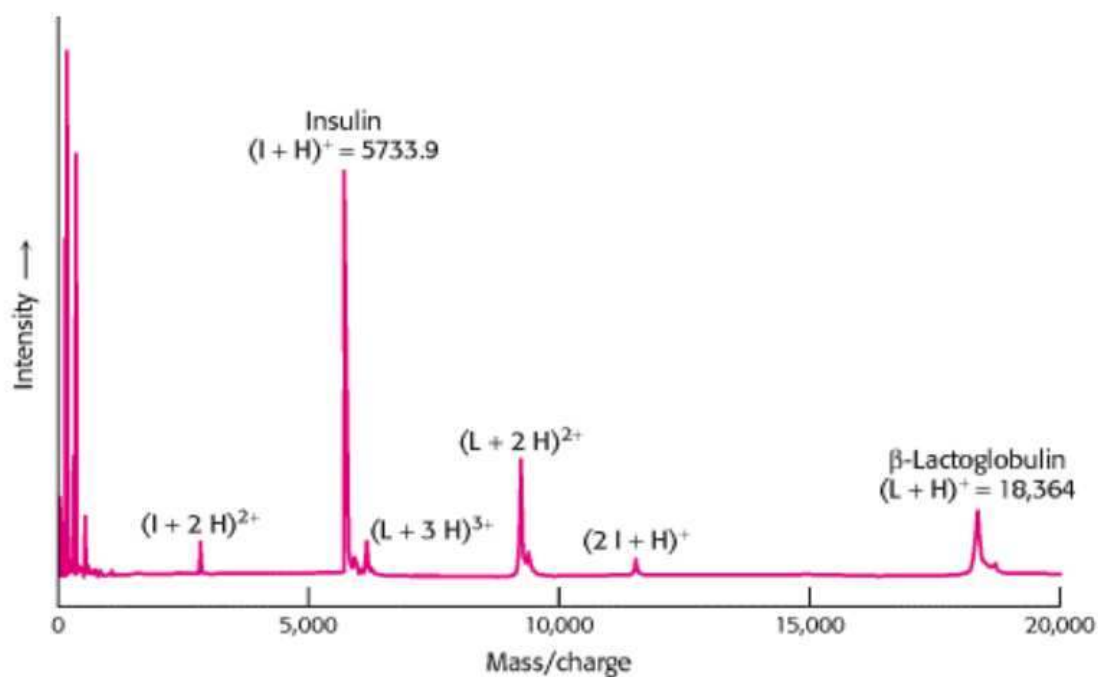
4



**Figure 4.16. MALDI-TOF Mass Spectrometry.** (1) The protein sample, embedded in an appropriate matrix, is ionized by the application of a laser beam. (2) An electrical field accelerates the ions formed through the flight tube toward the detector. (3) The lightest ions arrive first. (4) The ionizing laser pulse also triggers a clock that measures the time of flight (TOF) for the ions. [After J. T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3d ed. (Lippincott-Raven, 1997), p. 279.]

5

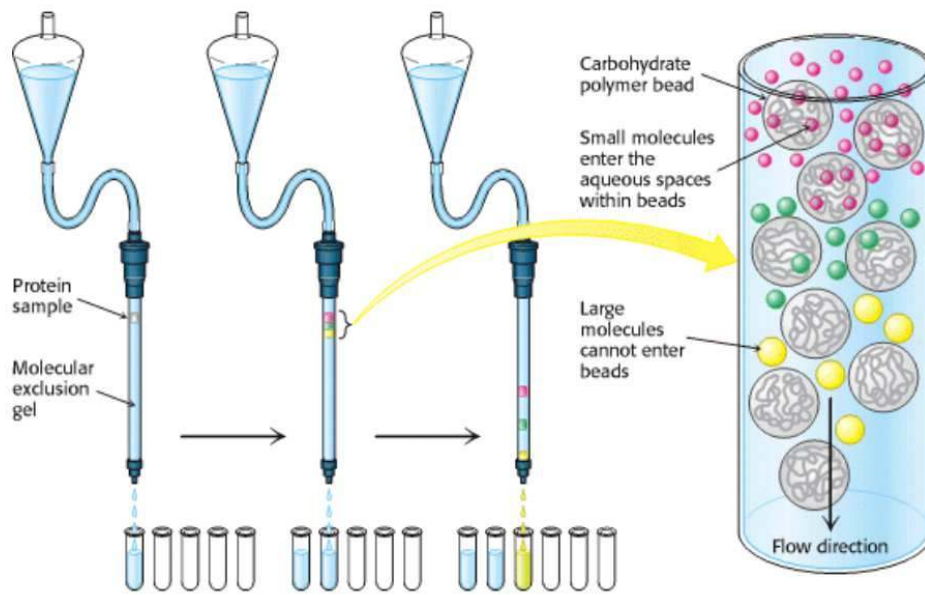
## Végeredmény: tömegspektrum (m/z szerinti eloszlás)



6

# A fehérjék tisztítása: kromatográfia

## Gélszűrés



Mi eluálódik először: egy fehérje, vagy egy kis molekula (pl. glükóz)?

7

# A fehérjék tisztítása: ioncsere kromatográfia

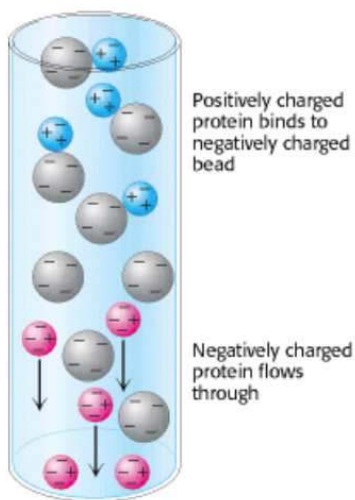
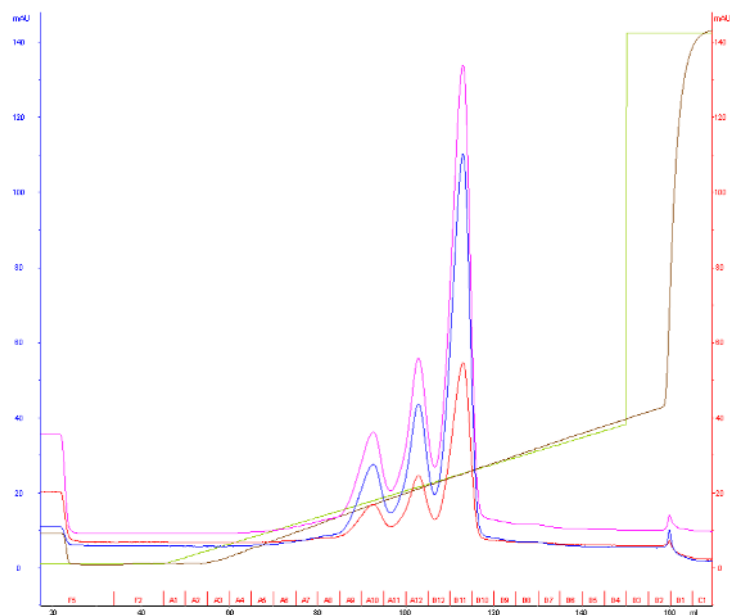


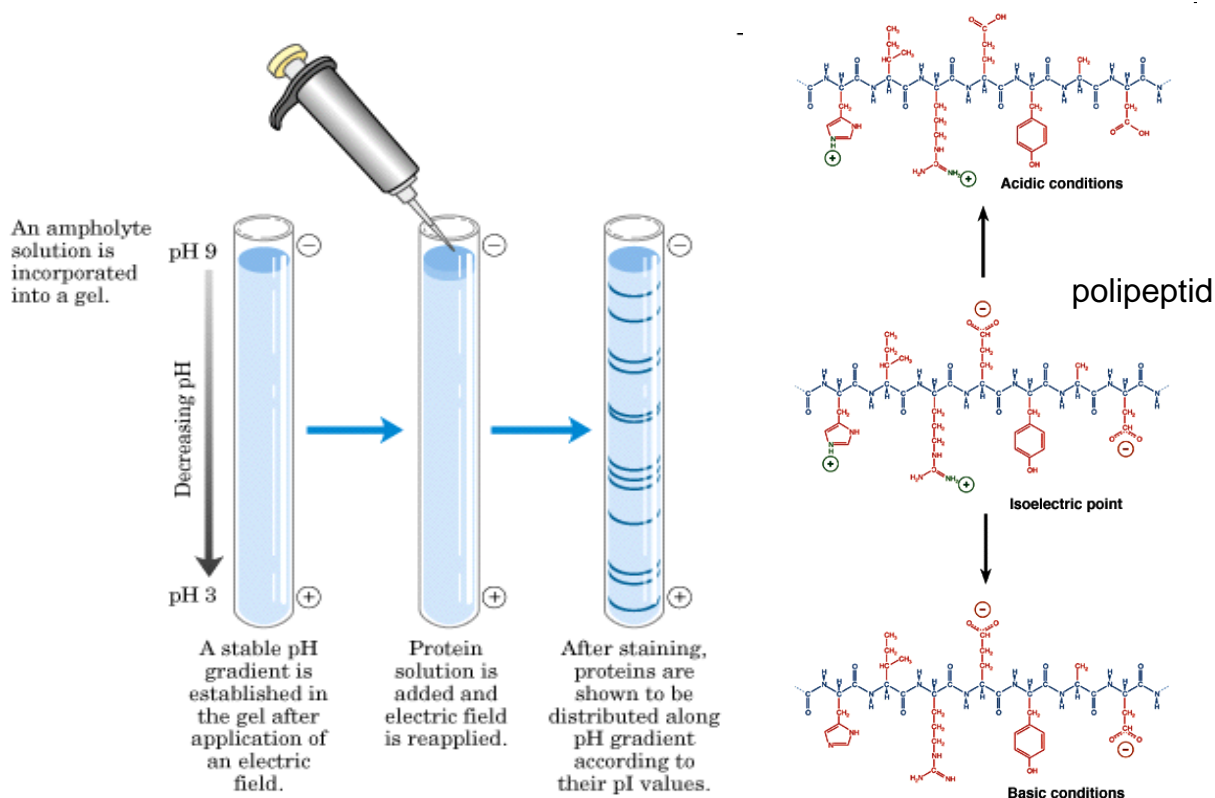
Figure 4.4. Ion-Exchange Chromatography.



Egymástól kis mértékben eltérő fehérjék is szétválaszthatók ezzel a módszerrel !!

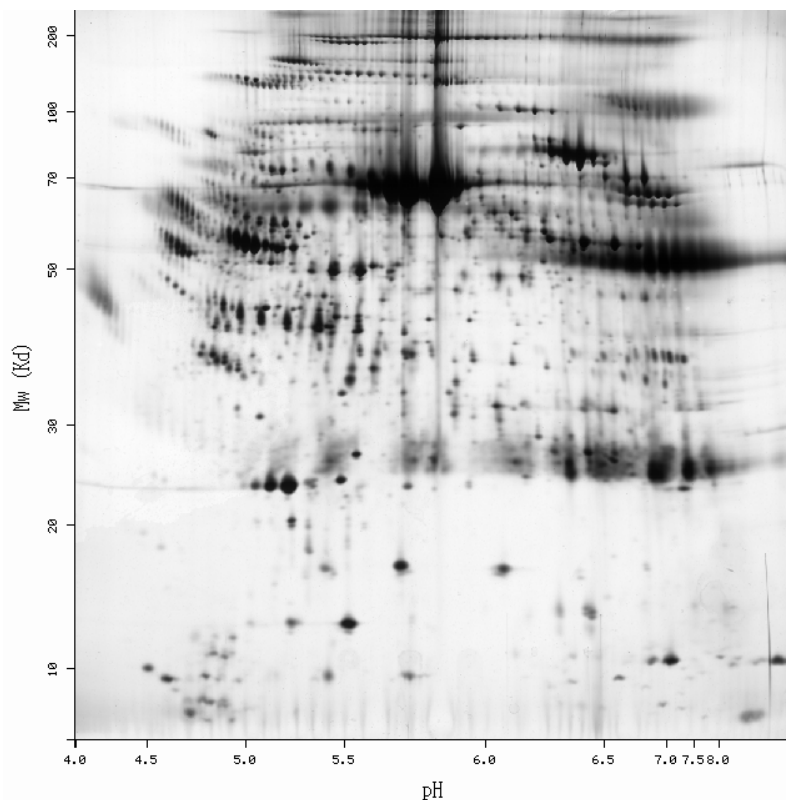
8

# Izoelektromos pont meghatározása – izoelektromos fókuszálás



9

## 2D-elektroforézis: nagyon nagy felbontás



Majdnem egy teljes proteom vizsgálható.

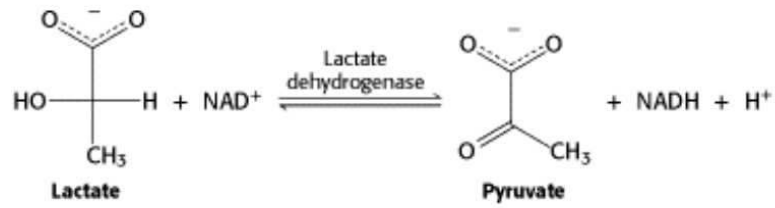
Több ezer pötty !

A proteomika elterjedt módszere.

10

# Kinetikai vizsgálatok: UV-VIS spektrofotometria

Példa:



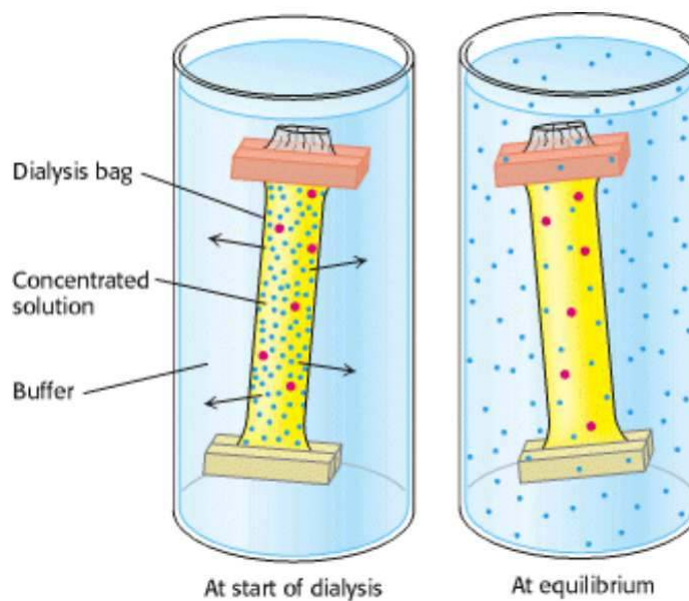
340 nm-en csak a NADH-nak van elnyelése, így a reakció előrehaladása követhető

Lambert-Beer törvény:  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$

Mit jelentenek a betűk ?

11

## Dialízis



12

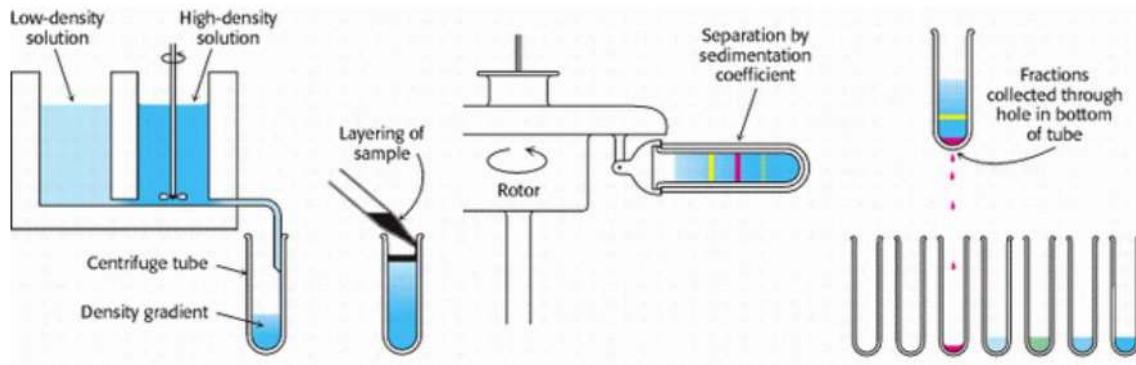
# Ultracentrifugálás

Szedimentációs (ülepedési) koefficiens: Svedberg egység (S)

Pl. 30S és 50S E. coli riboszóma alegységek.

A teljes riboszóma 70S. Hogyan lehetséges ez?

Sűrűség gradiens ultracentrifugálás:



A Svedberg egység (nem SI) technikailag időegység:  $10^{-13}$  s (=100 fs).

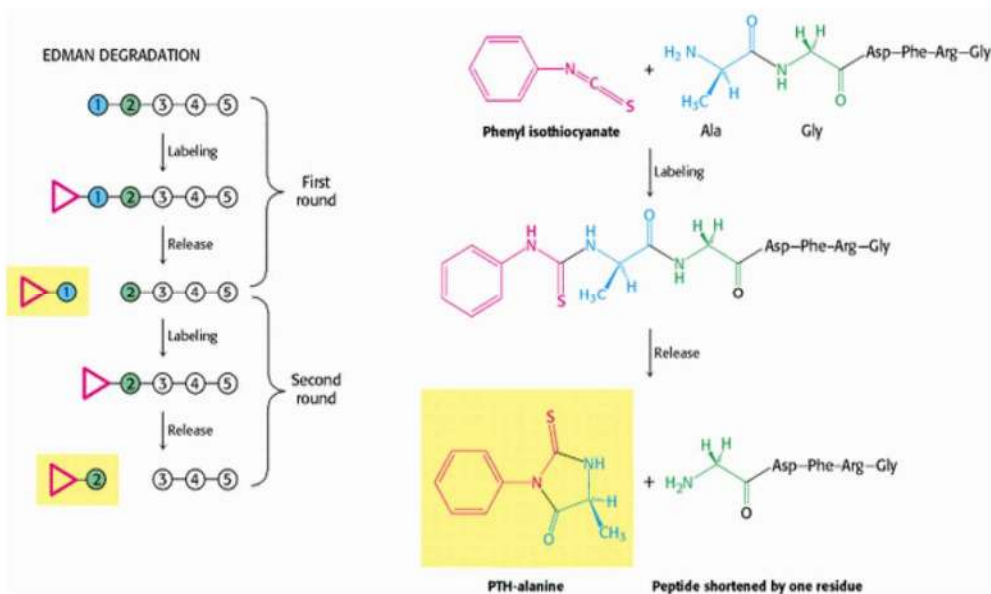
$s = v / a$  (itt: „s” szedimentációs koeff., „v” ülepedési sebesség, „a” centrifugális gyorsulás)

13

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

# Edman lebontás

Fehérjék szekvenciájának meghatározása az N- terminális felől  
15-30 aminosavig működik megbízhatóan.



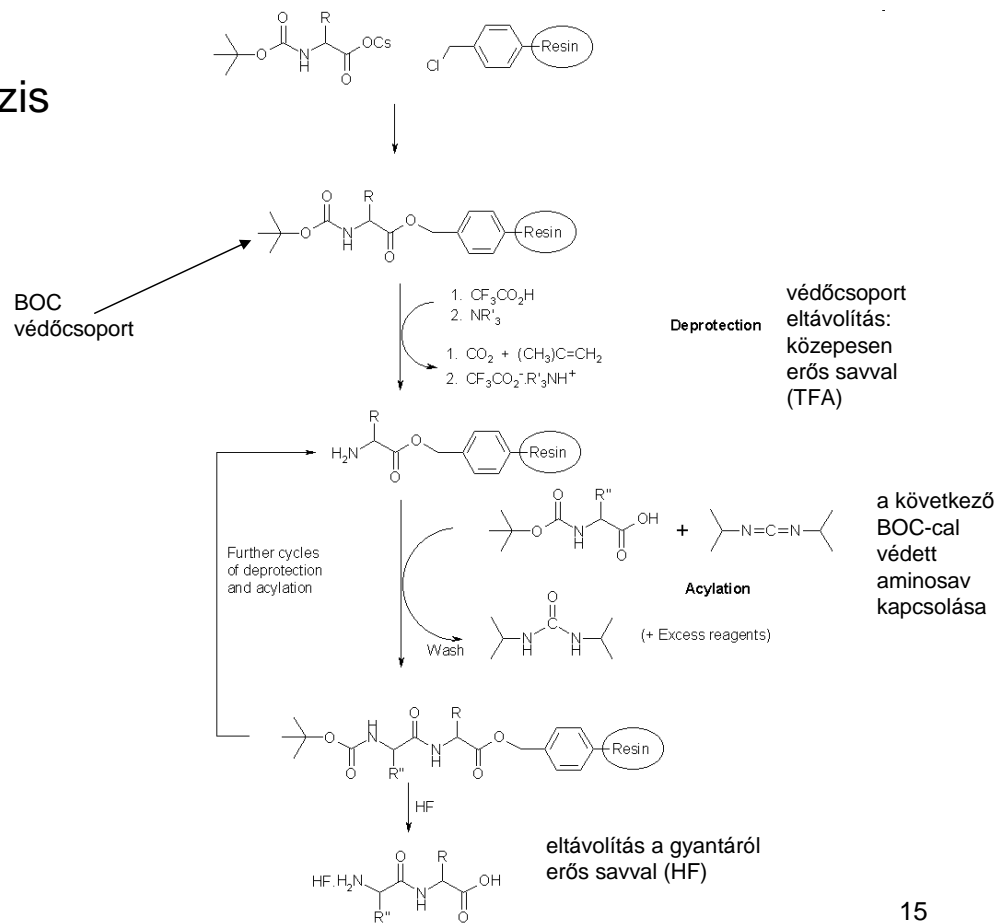
Hogyan lehet egy teljes fehérje szekvenciáját meghatározni?

14

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

# Peptid szintézis

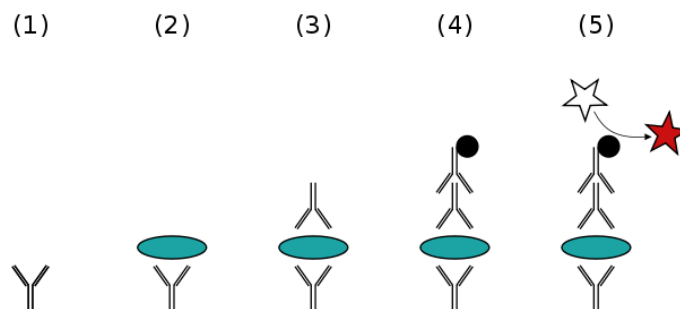
Hogyan lehetne fehérjét szintetizálni?



15

## ELISA: detektálás antitestek segítségével

enzyme-linked immunosorbent assay



### Példa: A „Sandwich” ELISA lépései

1. burkolás
2. antigén (mérendő anyag) kikötése
3. második antitest (erre is lehet kötni az enzimet)
4. enzim-antitest konjugátum
5. detektálás enzimreakció segítségével (színes termék)

16

# NMR spektroszkópia

Bizonyos izotópok rendelkeznek magspinnel

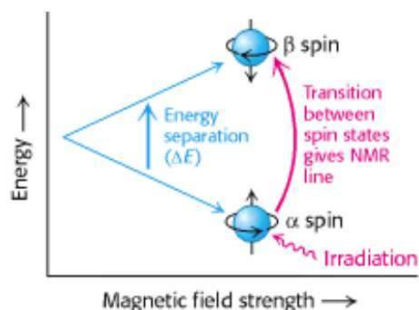
A fehérje NMR számára a legfontosabb izotópok:

**izotóp:  $^1\text{H}$        $^{15}\text{N}$        $^{13}\text{C}$**

**spin:       $1/2$        $1/2$        $1/2$**

17

# NMR spektroszkópia



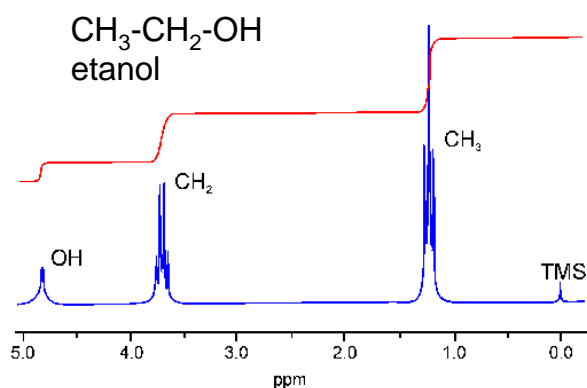
Mágneses térben a kétféle spinállapot energiája különbözik.

A 800 MHz-es NMR készülékben az  $^1\text{H}$  két állapota közötti átmenet 800 MHz-es rádió sugárzásnak felel meg.

18

# NMR spektroszkópia

## Kémiai eltolódás



Egy mag kémiai környezete befolyásolja a lokális mágneses teret, de csak kis mértékben.

**ppm = parts per million**

TMS: tetrametil-szilán  
(referencia anyag → 0 ppm)

Rezonancia csak akkor jön létre, ha pontosan a helyi mágneses mezőnek megfelelő a rádió sugárzás frekvenciája.

(Régebbi készülékekben a mágneses mező erejét változtatták kis mértékben.)

19

# NMR spektroszkópia



900 MHz NMR



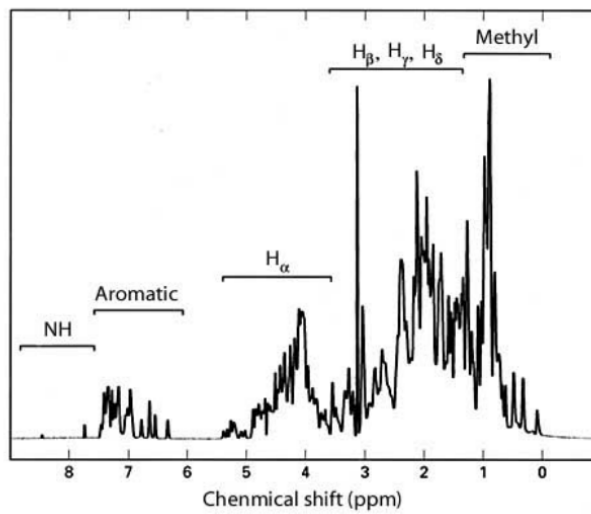
Minta

A mágnes erősségének növelésével javul a felbontás és a jel/zaj viszony.

Miért ilyen nagy a fenti NMR készülék?

20

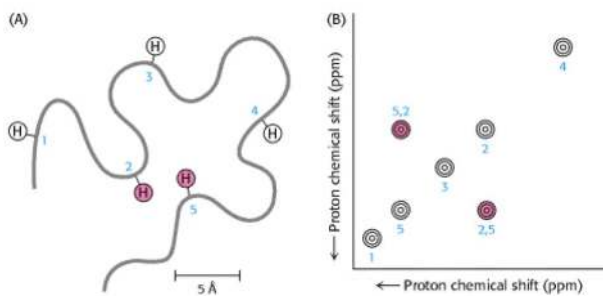
# NMR spektroszkópia



Fehérje 1D proton NMR spektruma → rossz felbontás, korlátozott információ

21

# NMR spektroszkópia



**Figure 4.45. The Nuclear Overhauser Effect.** The nuclear Overhauser effect (NOE) identifies pairs of protons that are in close proximity. (A) Schematic representation of a polypeptide chain highlighting five particular protons. Protons 2 and 5 are in close proximity (~4 Å apart), whereas other pairs are farther apart. (B) A highly simplified NOESY spectrum. The diagonal shows five peaks corresponding to the five protons in part A. The peaks above the diagonal and

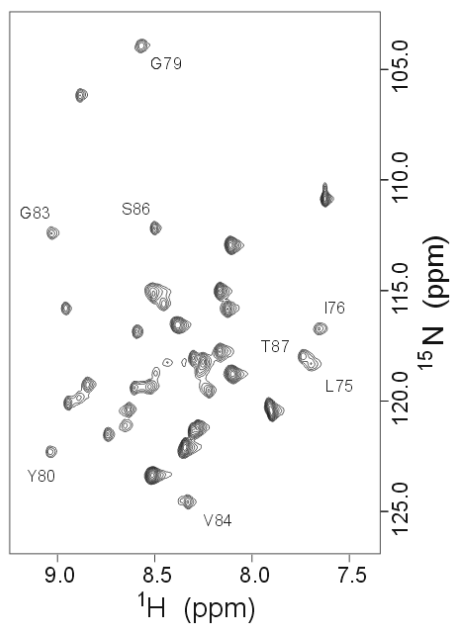
2D NMR → javul a felbontás

NOE: szekvenciálisan távoli, de térben közeli kölcsönhatások detektálása

22

## NMR spektroszkópia

2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC: a leggyakrabban használt technika fehérjék esetén



**H**eteronuclear **S**ingle  
**Q**uantum **C**orrelation  
spectroscopy

Az amid (NH) csoportokat  
detektáljuk vele.

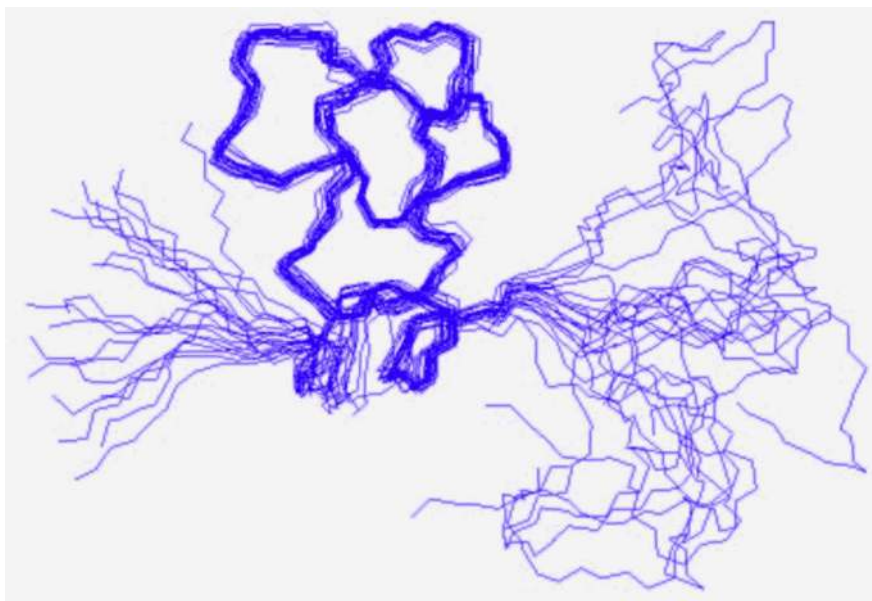
Melyik aminosav nem látszik?

Asszignálás után mire lehet  
használni?

23

## NMR spektroszkópia

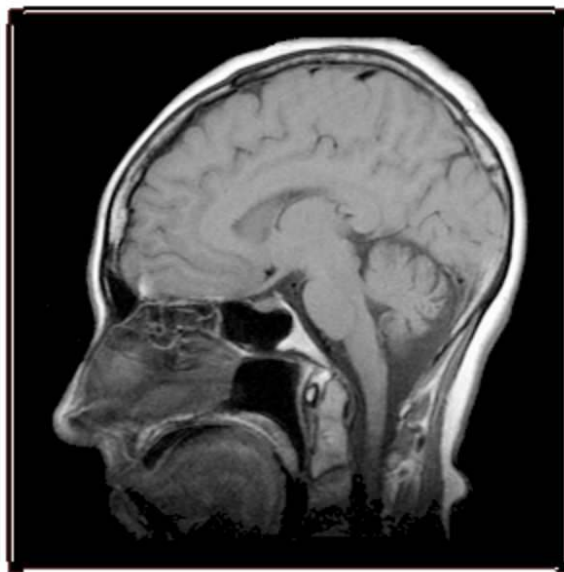
Kis fehérjék szerkezetét meg lehet oldani → egy szerkezetsereget kapunk



24

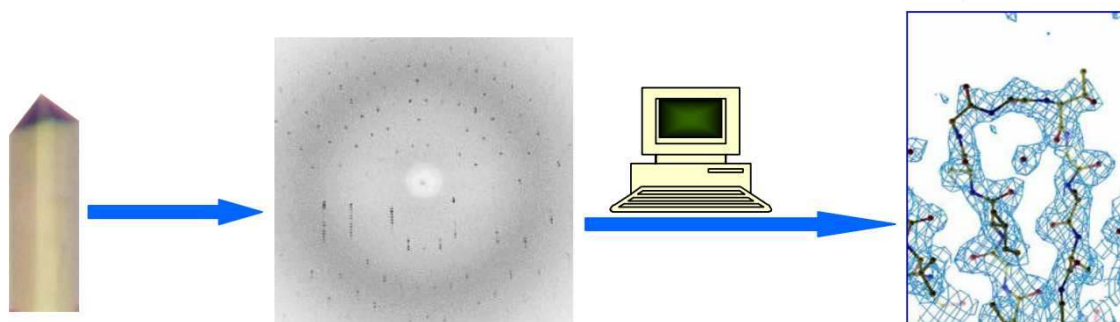
MRI = magnetic resonance imaging

Az NMR orvosi alkalmazása képalkotásra.



25

## Röntgen kristallográfia (X-ray crystallography)

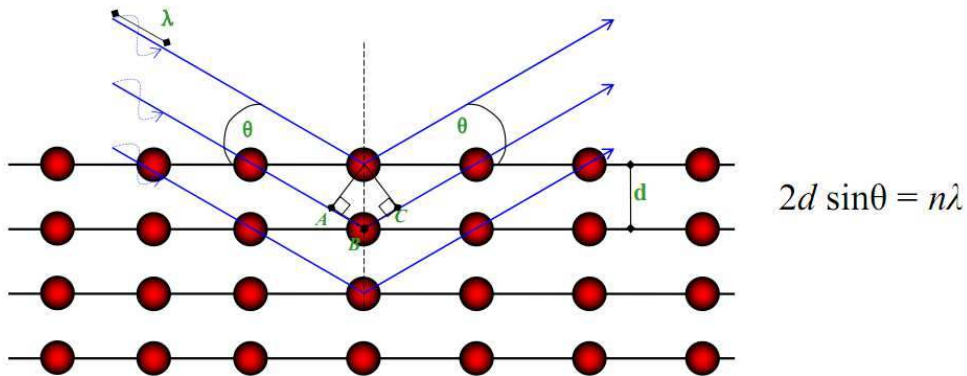


A röntgensugár az elektronokon szóródik → elektronsűrűség-térkép

26

# A röntgen-diffrakció alapjelensége

## A diffrakció, mint tükrözés?



### Bragg egyenlet

#### A diffrakció feltétele:

a párhuzamos rácssíkokról visszaverődő sugármenetek útkülönbsége ( $AB + BC = 2d \sin\theta$ ) a hullámhossz egész szám szorososa

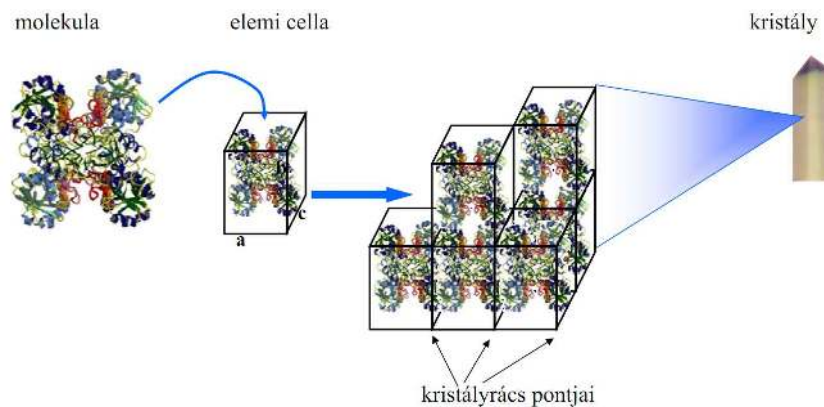
- ▶ Az egykristály diffrakciós képe diszkrét pontokból áll („reflexiók”)
- ▶ A reflexiók hozzárendelhetők a kristálysíkok síkseregeihez

27

## Hogyan néz ki egy fehérjekristály?

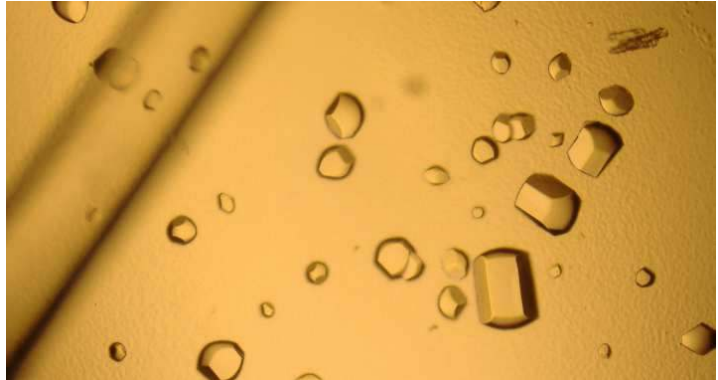
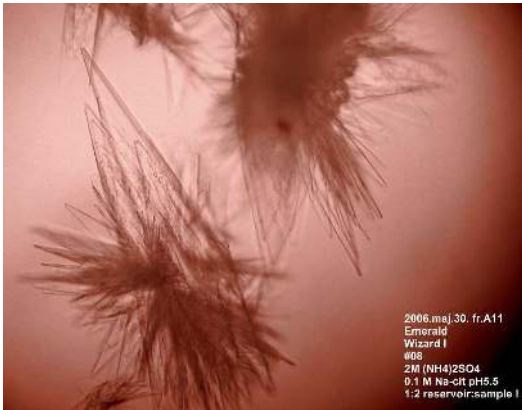


Figure 4.50. Crystallization of Myoglobin.



28

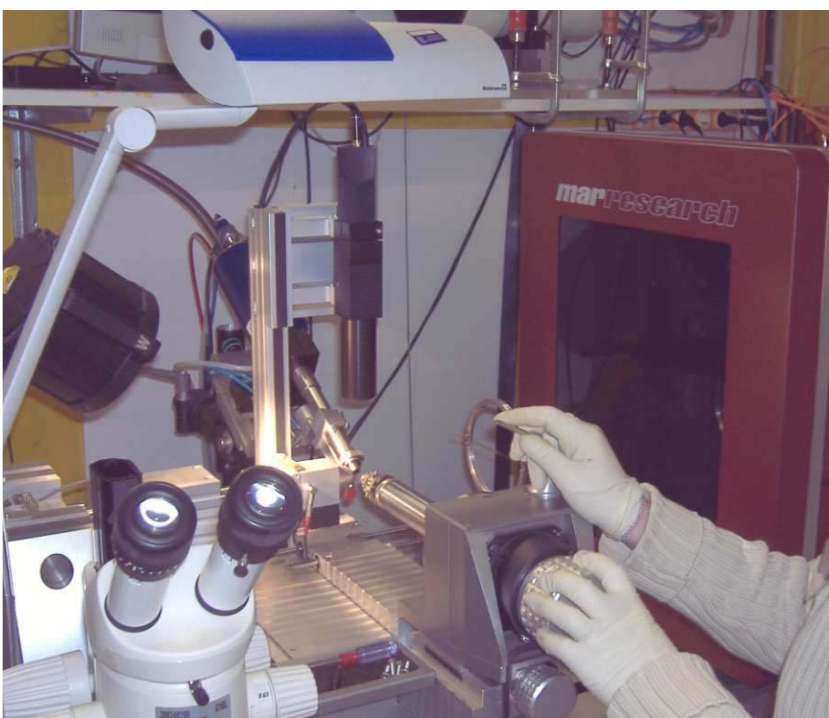
## Hogyan néz ki egy fehérjekristály?



29

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

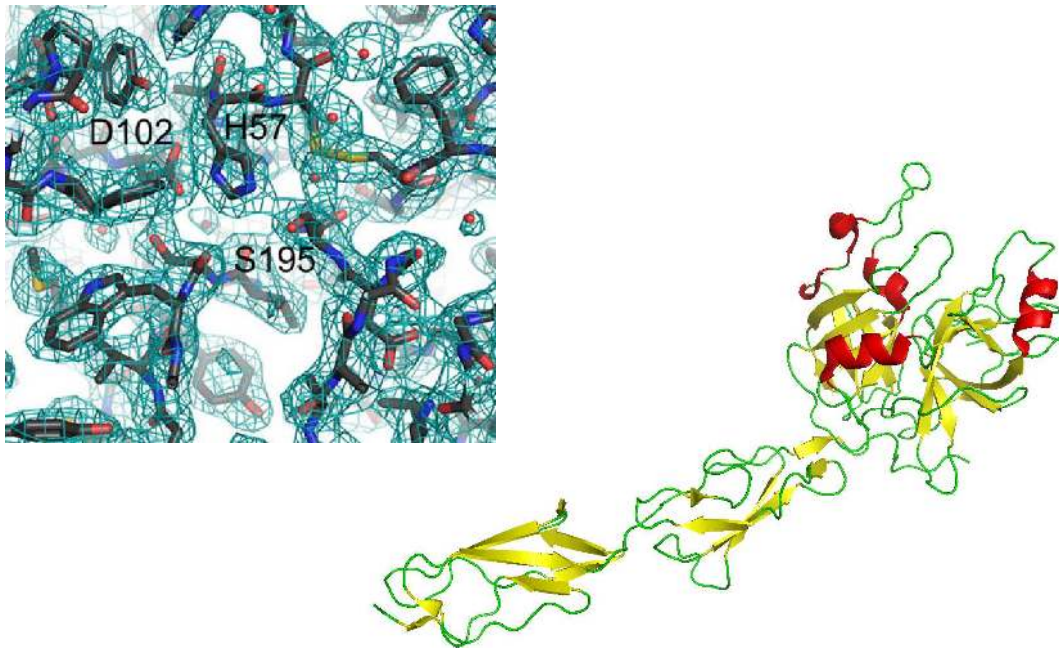
## A mérés menete



30

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## Végeredmény: elektronsűrűség-térkép, atomi szerkezet



31

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## Amit tudni illik

A Fehérje vizsgálati módszerek témakörből  
(kromatográfia, szekvenálás, szintézis, NMR, krisztallográfia stb.)

### Fogalmak:

$m/z$  (tömeg/töltés), szedimentációs koefficiens (S), kDa,  
pI (izoelektromos pont)

### Módszerek:

SDS-PAGE, MALDI-TOF, gélszűrés, ioncsere, 2D elektroforézis, Edman  
lebontás, ELISA, NMR, röntgen krisztallográfia

### Egyenletek:

Bragg egyenlet:  $2d \sin\Theta = n\lambda$

Lambert-Beer összefüggés  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$

32

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

# Kapcsolódó könyvfejezetek:

J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biochemistry 5th edition  
W.H. Freeman and Co.

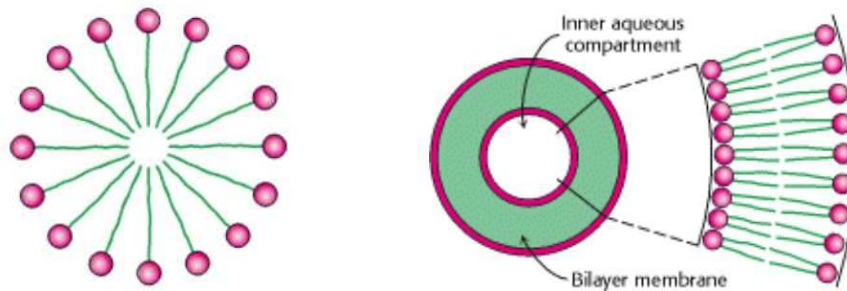
## 4. Exploring proteins

33

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

Folyt. köv. ...

Szénhidrátok, lipidek, vitaminok



34

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József