



## Biokémia laborgyakorlat

### 1. gyakorlat: Fehérjék izolálása, tisztítása és mennyiségi meghatározása

#### Gyakorlatvezetők:

- Farkas Alexandra [farkas.alexandra@mail.bme.hu](mailto:farkas.alexandra@mail.bme.hu)
- Jaksics Edina [jaksics.edina@mail.bme.hu](mailto:jaksics.edina@mail.bme.hu)
- Szentmiklóssy Marietta [szentmiklossy.marietta@mail.bme.hu](mailto:szentmiklossy.marietta@mail.bme.hu)

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

2019-20 II. félév.

## Tartalom

I.	Bevezetés, a gyakorlat célja	1
II.	Aminosavak, peptidok	1
III.	Fehérjék szerkezete	1
IV.	Fehérjék csoportosítása	2
V.	Fehérjék oldhatósági tulajdonságai	3
VI.	Fehérjék kinyerése, frakcionálása, tisztítása	4
VII.	Fehérjenalitikai módszerek	6
	VII. 1. Kimutatási reakciók	6
	VII. 2. Közvetett módszerek fehérjék mennyiségi meghatározására	6
	VII. 3. Közvetlen módszerek fehérjék mennyiségi meghatározására	7
	UV-spektrofotometria	7
	Kolorimetriás eljárások	8
	Turbidimetriás meghatározás	8
	Fluorimetriás eljárás	8
VIII.	Fehérjék elválasztása	9
IX.	A gyakorlati feladatok leírása	13
	IX. 1. Fehérjék oldhatósági profiljának meghatározása	13
	A gyakorlat során felhasznált anyagok, eszközök	13
	Mintaelőkészítés	14
	Oldatok fehérjetartalmának meghatározása UV spektrofotometriával	14
	IX. 2. Gélkromatográfia	15
	A gyakorlat során felhasznált anyagok, eszközök	15
	Mintaelőkészítés	16
	Gyakorlat menete	16
	A méréshez szükséges számítási képletek	16
	IX.3. Kiadott feladatok	17
	Gélkromatogram értékelése	17
	Gélelektroferogram kiértékelése	17
	IX.4. Jegyzőkönyv formai és tartalmi elvárásai	19
X.	A felkészülést segítő ellenőrző kérdések	19

## I. Bevezetés, a gyakorlat célja

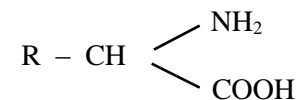
A fehérjék az élő sejtet alkotó biomolekulák rendszerében elfoglalt helyüket tekintve a makromolekulák közé tartoznak. Építőköveikből, a 20 különféle aminosavból vízkilépéssel keletkeznek. A sejtek és általában az élő szervezetek szárazanyag-tartalmának kb. 50%-át teszik ki. Közvetlen vagy közvetett módon minden biológiai jelenség fehérjékkel kapcsolatos: biológiai információk hordozói, életfolyamatok irányítói és katalizátorai (enzimek), transzportfolyamatokban játszanak szerepet (membránfehérjék), táplálkozástani szempontból alapvető jelentőségűek (esszenciális aminosavak felvétele) a testfelépítés és a mozgás nélkülözhetetlen elemei (izom és izomműködés) stb.

A fehérjék alapvető jelentőségéből adódóan, adott anyagi rendszerből történő kinyerésük, kimutatásuk, mennyiségi meghatározásuk, illetve funkciójuk (pl. enzimaktivitás) ellenőrzése a biokémiai és analitikai vizsgálatokban alapvető jelentőségű. Ennek megfelelően a gyakorlaton megismerkedünk a fehérjék kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmas analitikai eljárásokkal, és egy, a mindennapi életben gyakran előforduló fehérje (szója vagy kazein) oldhatósági profiljának vizsgálatával is foglalkozunk. A kísérletben a lehetséges fehérjeanalitikai módszerek közül az UV-spektrofotometriát alkalmazzuk. A fehérje tisztítási műveletek közül a gélekromatográfiás eljárással és a gélelektroforézissel ismerkedünk meg. A gélekromatográfiás molekulaelválasztás során saját készítésű oszlopon kalibrációt végzünk, mely alapján kiszámíthatók az elválasztáshoz szükséges paraméterek.

## II. Aminosavak, peptidok

Az aminosavak (1. ábra) a fehérjeláncok építőköveiként, kötött formában fordulnak elő. A prolin kivételével a központi  $\alpha$ -szénatomhoz egy karboxil-, egy amino-csoport, és egy hidrogénatom kapcsolódik. Az egyes aminosavak az R-rel jelölt oldallánc minőségében különböznek,

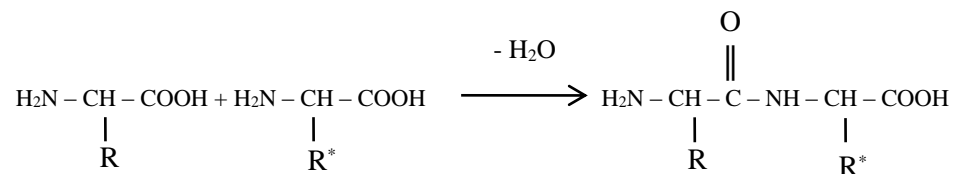
melyek meghatározzák a fehérjék szerkezetbeli tulajdonságait és a biológiai sajátságokat.



1. ábra: Aminosavak általános képlete

A természetben található aminosavak, aszimmetrikus C-atomot tartalmaznak a glicin kivételével, és így, optikailag aktívak és L-konfigurációjúak. (Kivételt képez néhány bakteriális eredetű aminosav.)

Az aminosavak egymással **peptidkötést** kialakítva kapcsolódnak láncá. A peptidkötést vízkilépés kíséri (2. ábra). Az aminosavak számától függően megkülönböztetünk di-, tri-, tetra-, stb. peptideket.



2. ábra: Peptid kötés kialakulása

## III. Fehérjék szerkezete

A fehérjék polipeptidlánca több száz aminosavat tartalmazhat. A 20-féle építőelem kapcsolódásának rendkívül változatos sorrendje lehetséges.

### Elsődleges szerkezet

A fehérjék funkcióját és térszerkezetét alapvetően a genetikusan kódolt elsődleges szerkezet, az aminosavsorrend határozza meg. Ez biztosítja, hogy megfelelő közegben a fehérje magasabb rendű szerkezete kialakuljon és képessé váljon biológiai feladatának ellátására. Az aminosavsorrendben bekövetkező legkisebb változás esetenként teljes jellegében megváltoztathatja a fehérje működését.

### Másodlagos szerkezet

A fehérjék másodlagos szerkezete az  $\alpha$ -szénatomokhoz kapcsolódó atomcsoportok térbeli elfordulásának mértékétől, másrészt a potenciális kölcsönhatást jelentő másodlagos kötések jelenlététől és molekuláris környezetétől függ. A polipeptid molekulák mutathatnak bizonytalan hajtogatottságú ún. *random coil*, csigavonalszerűen, spirálisan tekeredő ún.  $\alpha$ -*hélix* és szabályos redőzöttséget mutató ún.  $\beta$ -*redő* szakaszokat.

### Harmadlagos szerkezet

A fehérjék harmadlagos szerkezetét az aminosav oldalláncok másodlagos kötőerőkkel való összekapcsolása hozza létre. A szerkezet kialakulásában résztvevő kötőerők lehetnek hidrogénkötések, diszulfid hidak, hidrofób és elektrosztatikus kölcsönhatások. A fehérjék nagy része vizes fázisban globuláris formában kerül az energiaminimum állapotába. A *globuláris* fehérjékre jellemző gomolyagszerkezet kialakulásakor a nem poláros oldalláncok egymáshoz közel kerülve igyekeznek apoláros kötések létrehozni, és mivel az így kialakuló molekula belsejében helyezkednek el többnyire, a poláros csoportok a felszínre kerülnek.

Az egyes kötéstípusok a fehérje fajtájától függően annyira meghatározhatják annak természetét, hogy felbontásukkal az egész molekula denaturációját is előidézhethetjük, ami az eredeti funkció elvesztését eredményezheti. Ugyanakkor a szerkezet kialakításáért felelős kölcsönhatások megismerése lehetőséget kínálhat a szerkezet és funkcionalitás kapcsolatának feltárására, mely elősegíti a fehérjék szerkezetének célzott átalakítását is. Ez történik például a különböző élelmiszer adalékanyagok kifejlesztése és alkalmazása során (szójafehérje izolátum, hidrolizátum, stb.)

### Negyedleges szerkezet

A feltekeredett, adott harmadlagos szerkezetű polipeptidláncokból felépülő fehérjék, ill. fehérjekomplexumok esetén beszélhetünk negyedleges szerkezetéről, mely kovalens és főleg nem kovalens

kölcsönhatások révén alakul ki. Többnyire a negyedleges szerkezet eredménye a biológiai aktivitás. *Alegységekről* akkor beszélünk, ha a láncok egymással nem kovalensen kapcsolódnak. Bizonyos esetekben a láncokat pl. diszulfid kötések tartják össze. Ezek a molekulák pedig a *monomerek*.

## IV. Fehérjék csoportosítása

A különböző szervezetek által igényelt, illetve a szervezeteket jellemző funkciók indokolják a fehérjék változatos kémiai és szerkezeti felépítését. Ez a sokszínűség nagymértékben megnehezíti a csoportosítást, rendszerezést. Alapvetően négyféle csoportosítást alkalmaznak a biokémiában: a fehérjék összetétel, funkció, molekulaméret és -alak szerinti felosztását, valamint a hagyományosnak tekinthető oldhatóság szerinti besorolást.

Összetétel alapján megkülönböztetünk egyszerű és összetett fehérjéket. Az *egyszerű proteinek* csak aminosavak alkotják, míg az *összetett proteinek* tartalmaznak egyéb, nemfehérje komponenst is. A nemfehérje csoport leggyakrabban valamilyen fémion, lipid- vagy szénhidrátcsoporthoz, esetleg nukleinsav vagy egyéb alkotórészhez kapcsolódik.

Molekulaméret és -alak szerint megkülönböztetünk *globuláris és fibrilláris fehérjéket*. Előbbiek a kisebb molekulaméretűek, gomolyagszerű szerkezetet vesznek fel, és többségük oldódik vízben. Az ilyen típusú molekulák általában alkalmasak biológiai feladatok betöltésére. A fibrilláris fehérjék esetében a megnyúlt fehérjeláncok fonatszerűen kapcsolódnak, miközben hosszú zsinórt képeznek. Inkább szerkezeti fehérjék, mechanikai vagy védő funkció betöltésére alkalmasak. Vízben csaknem oldhatatlanok.

Funkció szerint csoportosítva a fehérjéket tájékozódhatunk a biológiai rendszerekben betöltött leggyakoribb szerepükről (1. táblázat).

<i>Típus, példa</i>	<i>előfordulás, funkció</i>
<b>enzimek</b> tripszin citokróm-c RNS polimeráz	bélben fehérjéket, peptideket hidrolizál elektrontranszporter ribonukleinsav-szintézis
<b>transzportfehérjék</b> hemoglobin mioglobin szérumalbumin	oxigénszállítás gerincesek vérében oxigénszállítás izomban zsírsavszállítás vérben
<b>védőfehérjék</b> ellenanyagok komplement fibrinogén trombin	komplekképzés idegen anyagokkal komplekképzés antigén-ellenanyag rendszerekkel fibrin előanyaga a véralvadásban véralvadás résztvevője
<b>toxinok</b> diphtheria toxin kígyómérgek ricin	bakteriális toxin foszfoglicerideket hidrolizáló enzimek ricinus toxikus fehérje
<b>hormonok</b> inzulin növekedési hormon	glükóz anyagcserét szabályozza csontok növekedését stimulálja
<b>kontraktilis fehérjék</b> miozin aktin dinein	miofibrillum stacionárius filamentuma miofibrillum mobilis filamentuma cilia és flagellum
<b>szerkezeti fehérjék</b> kollagén elasztin $\alpha$ -keratin fibroin glikoproteinek membrán strukturfehérjék mukoproteidek	fonalas kötőszövetekben (inak, csontok, porc) elasztikus kötőszövetekben bőr, szőr, toll, szarv, pata, stb. selyemben, pókhálóban sejthártya, sejtfal membránban nyálkás váladékokban, ízületi folyadékban
<b>tartalékfehérjék</b> ovalbumin kazein ferritin gliadin zein	tojásban tejben vastároló fehérje a lépben búzában kukoricában

1. táblázat: Fehérjék csoportosítása funkcióik szerint

**Oldékonyság alapján** a legismertebb frakcionálás az Osborne módszer, melyet általánosan alkalmaznak növényi fehérjék vizsgálatakor (2. táblázat).

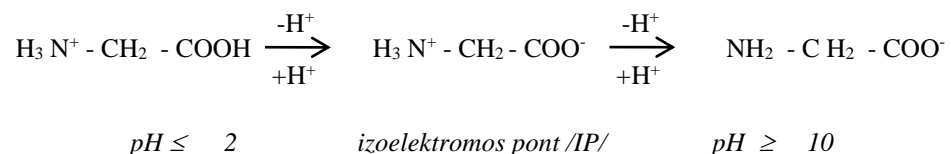
<b>Albuminok</b>	desztillált vízben, híg sóoldatokban
<b>Globulinok</b>	híg sóoldatokban
<b>Prolaminok</b>	50-80 %-os alkoholban
<b>Glutelinek</b>	híg savban vagy lúgban
<b>Szkleroproteinek</b>	semmilyen közönséges oldószerben nem oldódnak

2. táblázat: Fehérjék csoportosítása oldhatóságuk alapján

## V. Fehérjék oldhatósági tulajdonságai

A fehérjék azért alkalmasak változatos biokémiai szerep ellátására, mert a polipeptidláncok konformációja a biokémiai/fizikai funkció(k) ellátására alkalmas módon alakult ki, sőt, ez a konformáció az adott szerep betöltése során sajátosan, de mindig a feladatnak megfelelően változik. Egy adott feladat ellátásához szükséges a megfelelő közeg jelenléte és stabilitása is: jól ismert pl. az enzimműködés pH- és hőmérséklet-optimuma; a vér pH-ját (pH=7,2) érzékenyen őrző karbonát-puffer jelentősége; testfolyadékok pH-jának és ionkoncentrációjának (pl. Na/K-arány) az élettani folyamatokra gyakorolt hatása; vagy éppen a tej pH-változás-, vagy a tojásfehérje hő hatására bekövetkező, sokszor irreverzibilis változása. Ellenkező oldaltól történő megközelítésben mindez tehát azt is jelenti, hogy a fehérjék szerkezetét és funkcióját a közeg tulajdonságának változtatásával magunk is befolyásolni tudjuk, mely eszköz lehet a mind részletesebb megismerés és/vagy az adott célra történő hasznosítás útján. Jól ismert pl., hogy a poliionok tekintetében a fehérjék szerkezetét és funkcióját a másodlagos kötőerők (H-hidak, elektrostatikus kölcsönhatások, hidrofób-kötések) alakítják, illetve befolyásolják. A közeg pH-jának (és ionerősségének) változtatásával a fehérjemolekula töltésének jellegét és ezzel a kölcsönhatások minőségét jelentősen befolyásolni tudjuk.

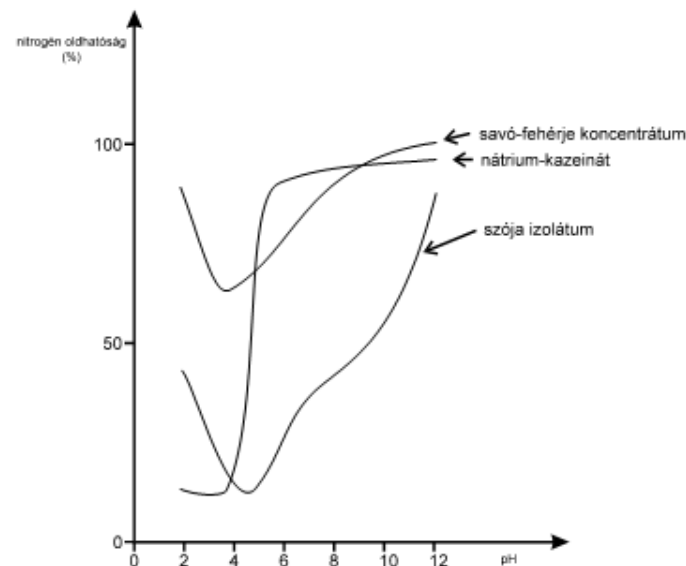
E tekintetben kitüntetett szerep jut az adott fehérjemolekulára jellemző pH értéknek, az **izoelektromos pontnak**. A karboxil-csoport (-COO<sup>-</sup>) negatív és az aminocsoport (-NH<sup>+</sup>) pozitív töltése ún. ikerionos szerkezetet kölcsönöz a molekuláknak. Ha a pH értéke csökken (savas irányba tolódik el) protonálódik a molekula, visszaszorul a karboxil-ion disszociációja, ha a pH értéke nő, a deprotonálódás hatására az aminocsoport disszociációja szorul vissza (3. ábra). Az izoelektromos ponton, ahol a *fehérje nettó töltése nulla*, hidrátburka a legkisebb, így a felületen elhelyezkedő disszociáló csoportok a szomszédos molekulák hasonló csoportjaival is kölcsönhatásba léphetnek. A makromolekulák aggregálódásának köszönhetően ez a folyamat a fehérjék oldhatóságának csökkenésében, a fehérjék oldataiból történő kicsapódásában nyilvánul meg.



3. ábra: Aminosavak ionizált alakjai a pH függvényében

A vázolt jelenséget számos területen alkalmazhatjuk, mint pl. a fehérjék oldatból történő kinyerésére laboratóriumi és ipari (pl. szójafehérje) méretekben; fehérjék frakcionált elválasztására (izoelektromos fókuszálás); enzimek kinyerésére és működésének vizsgálatára (pl. peptidázok) stb. Gyakorlati szempontból a fehérjék oldhatósági karakterének ismerete hasznos lehet az izolálás és tisztítás optimális körülményeinek megválasztásához, a fehérje adott rendszerben történő alkalmazhatóságának eldöntéséhez, biológiai funkciójának szabályozásához stb. A különböző körülmények közötti (pl. eltérő ionerősség, pH stb.) oldhatósági viselkedés nagymértékben behatárolja egy adott fehérjekészítmény alkalmazási területeit is (pl. instant, gyorsan oldódó élelmiszerek esetében).

Amennyiben a fehérjék oldhatóságát a pH függvényében mérjük, az ún. **oldhatósági profilt** kapjuk, mely görbe egyes pontjai az adott pH-n mérhető fehérje oldhatósági indexet (Protein Solubility Index=PSI) reprezentálják. A 4. ábrán néhány ismertebb fehérje jellemző oldhatósági profilját mutatjuk be.



4. ábra: Különböző fehérjék jellegzetes oldhatósági profilja 0.2 M NaCl oldatban

## VI. Fehérjék kinyerése, frakcionálása, tisztítása

### VI.1. Mintaelőkészítés

A fehérjék kinyerése a céltól, a fehérje és a mintamatrix tulajdonságaitól függően különböző eljárásokat igényel. Mivel az izolálandó fehérjék általában a sejten belül találhatóak - ráadásul többségük kötött formában -, ezért a sejteket előbb fel kell tární. A *sejtfeltárás* történhet kémiai, mechanikai és egyéb úton, de minden esetben figyelembe

kell venni a fehérjék érzékenységét, az alkalmazott minta milyenségét, valamint a további felhasználási célokat.

- *kémiai módszerek*: detergensok alkalmazása
- *fizikai módszerek*: aprítás, darálás, turmixolás, fagyasztás, feltárás homokkal, ultrahang, vákuum
- *egyéb módszerek*: ozmózis sejtfeltárás

A nagyobb zsírtartalmú mintát minden esetben zsírtalanítani kell. Ez általában valamilyen apoláros, szerves oldószer (hexán, petrol-éter) segítségével történik. Az extrakciót a gyakorlatban rázatással, kevertetéssel végzik.

### **VI.2. Fehérjék oldása**

A legkönnyebben *oldhatóságuk különbözősége alapján* nyerhetők ki különböző oldatokkal történő extrakció, majd azt követő kicsapás útján. Ezt követően a kicsapott fehérjemolekulák centrifugálással elválaszthatók az oldattal. A kicsapás reverzibilis, ha a fehérje visszaoldható és irreverzibilis, ha ez nem tehető meg. Reverzibilisen kicsapó anyagok (ammónium-szulfát, nátrium-klorid, magnézium-klorid, egyéb sók, etanol, aceton, stb.) vizes közegben elvonják a fehérjék hidrátburkát, de a pH vagy hőmérséklet óvatos növelése is hasonló következményekkel jár. Irreverzibilis kicsapás érhető el különböző szerves savak (triklór-ecetsav, szulfo-szalicilsav, nehézfém-sók -Pb, Hg, stb.) alkalmazásával.

### **VI.3. Lúgos izolálás**

Az egy lépéses lúgos extrakció során a fehérjék jelentős részét lúgos pH-n oldatba visszük, majd a megfelelő izoelektromos pontra állítással kicsapjuk az oldatból. A fehérjefrakciók típusától függően kicsaphatjuk az összes fehérjét vagy csak bizonyos frakciókat. Az izolátum célszerűen jó kiindulási anyaga a fehérjékkel történő további kutatásoknak.

### **VI.4. Osborne frakcionálás**

Az Osborne frakcionálás adott sorrendben történő oldószeres extrakció, mely a fehérjéket eltérő oldhatósági tulajdonságaik alapján szedi frakciókba. Növényi anyagok vizsgálatánál széles körben alkalmazott eljárás.

### **VI.5. Adsorbensek alkalmazása**

Fehérjeelegyeket adsorbensek segítségével is lehet frakcionálni. Eszerint az adsorbens megválasztásával az izolálni kívánt fehérjéket - vagy éppen az összes többi megkötjük és a körülmények - pH, T, polaritás, affinitás, stb.- célszerű megválasztásával az adsorbens felületéről elválhatnak a molekulák az elválasztás végeztével.

### **VI.6. Dialízis**

A dialízis hatékonyan alkalmazható a fehérjék kis molekulájú szennyezőinek eltávolítására. Kivitelezése olyan rendszerben történik, amely két folyadéktérből áll, amit egy féláteresztő hártya választ el. Az egyik térben van a tisztítandó fehérjeoldat, a másikban pedig az oldószerként alkalmazott puffer. A két térrészben koncentráció gradiens keletkezik. Az egyensúly akkor áll be, ha a két térrész ozmózisnyomásai kiegyenlítődnek. Ennek érdekében elindul a kis molekulák áramlása a hártyán keresztül, így például a nagy molekulájú fehérjék megtisztíthatók a kis molekulájú só és egyéb szennyezőanyagoktól.

### **VI.6. Affinkromatográfia**

Az affinkromatográfia olyan szelektív elválasztási módszer, mely a biomolekulák specifikus reakcióin alapul. Az álló fázis specifikus mátrixanyag (fehérjék esetében célszerű mátrixként ellenanyagot, vagy ha enzimekről van szó, koenzimet vagy szubsztrátot alkalmazni.), melyhez az elválasztandó molekula szelektíven, szorosan és reverzibilisen kötődik.

### VI.7. Fehérjék kristályosítása

Lehetőség van a fehérjék kikristályosítására is. Ezt általában koncentrált sóoldatban végzik. A kikristályosított fehérjefrakciók egyféle fehérjét tartalmaznak, mégsem nevezhető egy kristályos fehérje homogénnek. A homogenitás ugyanis mást jelent kémiai és mást biológiai szempontból.

## VII. Fehérjeanalitikai módszerek

A fehérjeanalitikai mérések során végezhetünk kimutatási reakciót és mennyiségi meghatározást. A fehérjék mennyiségi meghatározására alkalmas eljárásokat alapvetően két csoportba sorolhatjuk:

- *A közvetett módszerek* alkalmazásakor a fehérjék nitrogéntartalmának mérése alapján következtetünk a fehérjetartalomra.
- *A közvetlen eljárások* lényege, hogy a mérés során a fehérjeláncok szerkezetét lényegesen nem változtatjuk meg. Mennyiségi elemzés a fehérjelánc, vagy egyes fehérjealkotók speciális tulajdonságainak mérése alapján lehetséges.

### VII. 1. Kimutatási reakciók

Számos esetben (pl. orvosi diagnosztikában) előfordulhat, hogy nem szükséges a fehérjék pontos mennyiségi analízise, elegendő a jelenlét kimutatása. Ez esetben valamely kimutatási reakció alkalmazását választhatjuk. A fehérjekimutatási eljárások általában *színváltozáson*, illetve *oldhatóság-változáson* (kicsapáson) alapuló eljárásokat jelentenek. A színreakciók közül vannak olyanok, melyek valamennyi fehérje esetében működnek, mások csak egy-egy aminosav vagy oldallánc kimutatására alkalmasak. Az eddig ismert fehérjekimutatási módszerek közül a leglényegesebbek a következők:

- *Xantoprotein-reakció:* a fehérjék aromás aminosavai ( tirozin, triptofán) cc.  $\text{HNO}_3$ -val nitrovegyületek képeznek, melyek az oldat intenzív sárga elszíneződését okozzák. A közeg lúgosításával a képződő vegyületek színe narancssárgára változik.

- *Millon reakció:* Hg-nitrit és -nitrát salétromsavas oldatával melegítve a fehérjeoldatot, vöröses színű Hg-tirozin só keletkezik. Ez esetben a színreakciót a fehérjék tirozin-csoportjai adják.
- *Adamkiewicz reakció:* A fehérjeoldathoz glioxilsavat adagolva, majd az oldat alá cc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -t rétegezve a fázishatáron ibolyaszínű elszíneződés jelenik meg. Egyes aldehidek és a triptofán indolgyűrűje között lejátszódó reakció során ugyanis színes kondenzációs termék keletkezik, amely az oldat jól megfigyelhető elszíneződését okozza.
- *Szakagucsi reakció:* lúgos közegben az arginin és az  $\alpha$ -naftol között, NaOBr vagy NaOCl hatására vörös színű termék képződésével járó reakció játszódik le.
- *Kéntartalom kimutatása:* A kéntartalmú ciszteinből és cisztinből lúgos közegben  $\text{H}_2\text{S}$  szabadul fel, amit ólom-acetát adagolásával PbS-dá alakíthatunk, ami az oldatból kiválva jelzi a fehérje jelenlétét.
- *Kicsapásos reakciók:* A fehérjék oldataikból különböző reagensekkel kicsapathatók. Ez a jelenség adott körülmények között felhasználható a jelenlét kimutatására. A leggyakrabban a következő kicsapószerket alkalmazzák: Esbach-reagens (pikinsav és citromsav), 20%-os szulfoszalicilsav, kálium-hexaciano-ferrit-ecetsav, tannin oldat, ammónium-szulfát. Ezek az eljárások bizonyos esetekben oldatok fehérjementesítésére is alkalmazhatók.

### VII. 2. Közvetett módszerek fehérjék mennyiségi meghatározására

A közvetett módszerek a legrégebben alkalmazott fehérjeanalitikai eljárások. A nitrogéntartalom meghatározásán alapuló eljárások akkor pontosak, ha a vizsgálandó minta fehérjén kívül más N-tartalmú anyagot (pl. nukleotidok) nem, vagy csak elhanyagolható mennyiségben tartalmaznak. Ha ez a feltétel nem teljesül, *nyersfehérje-tartalom* meghatározásáról beszélünk. A pontos aminosav-összetételi adatok ismeretében a mérési pontosság javítható. Mivel a fehérjék átlagosan 16% N-t tartalmaznak, az általános nitrogén/fehérje átszámítási faktorként  $1/16 \cdot 100 = 6,25$ -ös értéket alkalmazunk. (Ezt nevezzük általános Kjeldahl-

faktornak). A mintamátrix, az aminosav-összetétel, illetve a fehérje típusának ismeretében az átszámítási faktor pontosítható. Így például a gabonafehérjék esetében 5,7, a tejfehérjék vizsgálatakor 6,38 az átszámítási faktor értéke. A közvetett eljárások csoportjába alapvetően a roncsolást alkalmazó Kjeldahl-módszert és az égetéses eljárást (ún. Dumas-módszer) soroljuk, azonban tágabb értelemben ide tartoznak a Kjeldahl-roncsolás során keletkező ammónia-tartalom kolorimetriás és elektrokémiai módszerekkel történő mérését alkalmazó műszeres módszerek is.

A **Kjeldahl-módszer** a leggyakrabban alkalmazott és szabványosított közvetett fehérjemeghatározási eljárás, ami két fő lépést, *roncsolást* és *titrálást* tartalmaz. A roncsolás cc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -ban, vagy erős savak keverékében,  $400^\circ\text{C}$  körüli hőmérsékleten, forráspont-növelő só ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) és az oxidációs folyamatot gyorsító katalizátor (Cu, Hg, Se) jelenlétében zajlik. A folyamat során a szerves anyagok szénláncai, oxigén- és hidrogén tartalma  $\text{CO}_2$ -ra és  $\text{H}_2\text{O}$ -re bomlik, míg a főleg aminosavakból származó nitrogén ammónium-sók (ammónium-hidrogén-szulfát, ammónium-szulfát) formájában lesz jelen a tömény savas oldatban. A roncsolás vízelvonással, szenesedéssel, majd az oldat kitisztulásával jár, a folyamat időigénye a mintamátrixtól függ, gabonák esetén általában 1 óra. A roncsolási folyamat befejeztével a savas oldat ammóniatartalmát fel kell szabadítani sójából, amit desztillált vízzel történő hígítás után, tömény lúg (általában 33%-os NaOH) adagolásával oldanak meg. A felszabadult ammóniát vízgőzdesztillációval kihajtják az oldatból, a desztillátumot erős vagy gyenge savas fogadóoldatban fogják fel. Az átdesztillált ammónia mennyiségét: a) erős savas (HCl vagy  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) fogadóoldat esetében erős lúg mérőoldattal, b) gyenge savas (bórsav) fogadóoldat esetében erős sav (HCl vagy  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) mérőoldattal titrálják vissza. A mérőoldat fogyásából az ismert titrálási képlet és az aktuális átszámítási faktor alkalmazásával számítják ki a vizsgálati minta fehérjetartalmát.

A roncsolás során keletkező oldat ammóniatartalmának meghatározása más módszerekkel is lehetséges. A *Berthelot-féle indofenol-reakció* kolorimetriás eljárást jelent. Lényege, hogy lúgos közegben, hipoklorit jelenlétében ammóniából és fenolból

vagy szalicilátból színes indofenol vegyület keletkezik, melynek abszorbanciája  $630\text{nm}$ -en mérhető. *Ammóniaszelektív elektród* alkalmazásával elektrokémiai eljárást is alkalmazhatunk az oldat ammóniatartalmának mérésére.

A **Dumas-eljárás** lényege, hogy a mintamátrixot égetéssel (száraz roncsolással) elbontják, és a keletkezett gázelegy  $\text{N}_2$ -tartalmából következtetnek a fehérjetartalomra. A mérés során a pontosan bemért mintát  $800\text{-}1000^\circ\text{C}$  hőmérsékleten, tiszta oxigénben, CuO-katalizátort tartalmazó reaktortérben égetik el, ahol az égés során  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  és  $\text{N}_x\text{O}_x$  (és kis mennyiségben más összetételű) gázelegy keletkezik. A vivőgázzal áramoltatott gázelegy  $\text{CO}_2$  és  $\text{H}_2\text{O}$ -tartalmát specifikus tölteteken átvezetve megkötik, a vegyes összetételű nitrogén-oxidokat izzó rézspirálon  $\text{N}_2$  gázzá redukálják. A  $\text{N}_2$  mennyiségét volumetrikusan vagy hővezetőképesség-detektor alkalmazásával határozzák meg. A nitrogén/fehérje átszámítás a Kjeldahl-módszernél bemutatott eljárással megegyezik.

### **VII. 3. Közvetlen módszerek fehérjék mennyiségi meghatározására**

A közvetlen mérési módszerek csoportjába azok az eljárások tartoznak, ahol a mennyiségi meghatározás a fehérjelánc változatlanul hagyásával, illetve felbomlás nélküli módosításával történik. Fontos kiemelni, hogy a közvetlen módszerek általában oldatban történő fehérjemeghatározásra alkalmasak, tehát a legtöbb gyakorlati feladat mintaelőkészítést (oldatba vitelt és tisztítást) igényel. A leggyakrabban alkalmazott mérési módszerek a következők:

#### **UV-spektrofotometria**

A spektrofotometria olyan műszeres analitikai módszer, ami egy mintán áthaladó fénynyaláb intenzitásának változását méri. A fényelnyelést egy mértékegység nélküli mennyiség, az abszorbancia jellemzi. Az anyag koncentrációja ( $c$ ) és az adott  $\lambda$  hullámhosszúságú sugárzásra mért abszorbancia ( $A$ ) közötti összefüggést a Lambert-Beer törvény írja le, amely szerint:



$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \times c \times l,$$

ahol  $I_0$  a bemenő fényintenzitás,  $I$  a kilépő fényintenzitása,  $\varepsilon$  az ún. moláris abszorbanca és  $l$  a rétegvastagság. A fehérjelánc különböző alkotórészei az UV-tartományban mutatnak elnyelést. Általában három jellemző UV-szakaszt különböztetünk meg:

- A *peptidkötés* specifikusan 191-194 nm hullámhossztartományban abszorbeálja a fénysugarakat. A szennyezőanyagok jelenléte, az egyszerűbb fotométerek UV-tartománybeli korlátja ezen tartomány alkalmazhatóságát korlátozza.
- A 224-240 nm-es hullámhossz is alkalmas fehérjék mennyiségi meghatározására. Itt ugyanis bizonyos *aminosavak* (tirozin, triptofán, metionin, cisztein) elnyelést mutatnak. Kevésbé érzékeny mérést tesz lehetővé, bár az UV-spektrumban leggyakrabban zavaró nukleinsavaknak itt abszorpciós minimuma van, tehát a fehérjemérést nem zavarják.
- Elterjedtebb a fehérjeoldatok abszorbanciájának 280 nm-en történő fotometrálása, ahol a *tirozin* és a *triptofán* rendelkezik abszorpciós maximummal. A módszer érzékeny, azonban egyes aromás vegyületek és főleg a nukleinsavak a mérést zavarják. Ennek eredményeképpen ebben a tartományban (összemérhető koncentrációk esetén) széles abszorpciós sáv alakulhat ki, mely lehetetlenné teszi a fehérjék szelektív meghatározását.

### Kolorimetriás eljárások

- A *Biuret-módszer* azon a megfigyelésen alapul, hogy lúgos közegben a  $\text{Cu}^{2+}$ -ionok a peptidkötésben szereplő négy nitrogénnel ibolyaszínű koordinációs komplexet képez. A biuret termék abszorpciós maximuma 540-560 nm között van.
- A *Lowry-eljárás* a fehérjék tirozin-csoportjának reakciója alapján teszi lehetővé a mennyiségi meghatározást: a foszformolibdén-foszforvolfrám-sav keveréket tartalmazó ún. Folin-Ciocalteu-reagens és a tirozin-csoportok között lúgos közegben redoxreakció játszódik le,

melynek eredményeképpen a létrejövő kék színű komplex a látható hullámhossztartományban fotometrálnak (abszorpciós maximum: 740 nm). A reakciót redukáló komponensek (pl. redukáló cukrok) jelenléte zavarja. A zavaró hatások csökkentése, valamint az érzékenység növelése céljából a meghatározás első lépéseként  $\text{Cu}^{2+}$ -ionok adagolása szükséges, amit általában  $\text{CuSO}_4$ -oldat alkalmazásával oldanak meg.

- *Színezékkötés*: A fehérjék bázikus csoportjai a megfelelő körülmények között képesek savas jellegű színezéket megkötni, miközben csapadékként kiválnak az oldatból. A színezék eltávolítása után mért abszorbanca-csökkenés arányos a fehérje mennyiségével. Elektroforézissel elválasztott és amidofekete-10B-vel színezett fehérjesávok analízisére szokták alkalmazni a módszert. Gabonaőrlemények gyorsvizsgálatánál Orange-G színezéket használnak, amely festék egyébként felhasználható a lizin-tartalom mérésére is.

Az ilyen típusú mérési eljárások jelentősége az utóbbi időben csökken, változatait elsősorban gélelektroforézises vizsgálatoknál használják.

### Turbidimetriás meghatározás

Híg fehérjeoldatok kicsapásával a keletkezett kolloid oldat zavarossága meghatározható és a fehérje mennyiségével összefüggésbe hozható. A zavarosság mérése pl. nefelometriásan történhet. Ilyenkor az áthaladó fény intenzitását mérjük. További alternatívát jelent a tiszta oldathoz viszonyított fényszóródás okozta fényintenzitás-csökkenés meghatározása, valamint az adott szögben elhelyezett detektorral mért fényintenzitás-mérés.

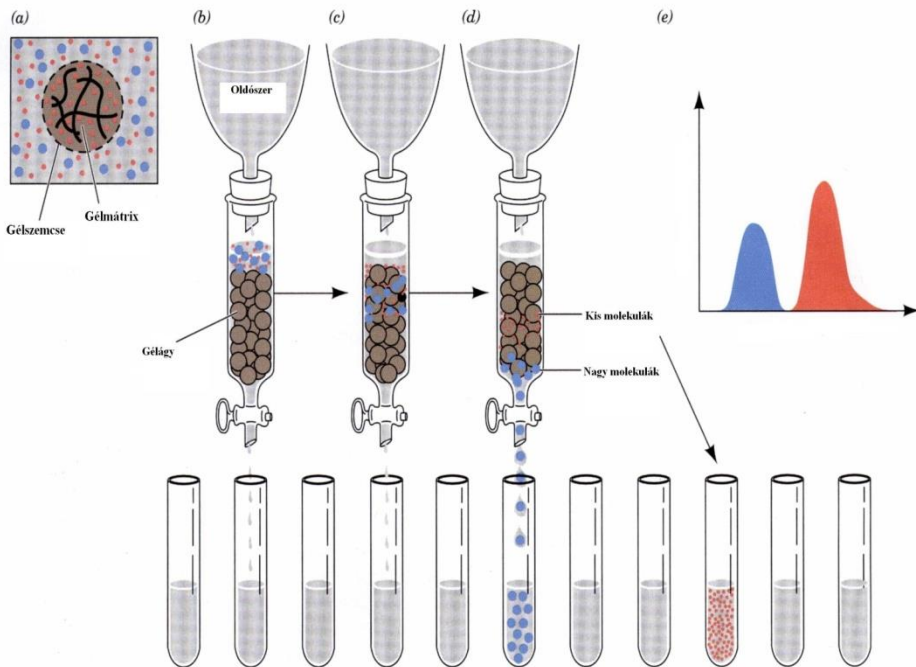
### Fluorimetriás eljárás

A fehérjék  $\text{NH}_2$ -csoportjához fluoreszcens vegyületet (eozin Y, fluoreszkamin) kapcsolhatunk. A megfelelő hullámhosszon (518-, ill. 390 nm) történő gerjesztés után fluoreszcencia-intenzitást 540-, ill. 475 nm-en mérhetjük.

## VIII. Fehérjék elválasztása

### VIII.1. Méret szerinti szeparálása gélkromatográfiával

A gélkromatográfiának az irodalomban számos elnevezése ismert: gélfiltrálás, molekulaszűrés, molekulaszitálás... stb. Lényegében a fehérjék méret szerinti szeparálása történik olyan kromatográfiás módszerrel, amelynek jellemző és sajátos tényezője a *gélfázis*. A különböző molekulaméretű elegyet tartalmazó mintából az adott molekulák diffundálnak a gél minden olyan részébe, amelyen át tudnak haladni. A különböző molekulaméretű minták különböző utat tesznek meg a gélfázisban, így különböző időt töltenek az oszlopban. A különböző időben levett frakciókban a molekulaméret szerint elválasztott összetevők jelennek meg (5. ábra).



5. ábra: Elválasztás folyamata gélkromatográfiával

(a): géloszlop szerkezete (b)-(d) elválasztás lépései (e) detektálható jel

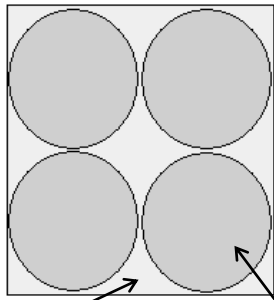
Oldószerekkel géles illetve kocsonyás szerkezeteket bizonyos természetes és szintetikus polimerek vagy anorganikus vegyületek (szilikátok, foszfátok, alumínium-oxid stb.) képesek létrehozni. Iparban a legelterjedtebben alkalmazzák a Sephadex, Biogel, Molselect stb. elnevezésű termékek különböző pórusátmérőjű variánsait. A gélek térhálós szerkezetét az egyenes vagy elágazó láncú polimermolekulák közötti keresztkötések hozzák létre.

A laboratóriumi mérés során a Sephadex gélekkel ismerkedünk meg, amiknek az alapanyaga dextrans. A dextrans glükóz egységekből 1,6- $\alpha$ -glükozid kötésekkel felépülő lineáris poliszacharid. A polimer szerkezete helyenként 1,2-; 1,3- vagy 1,4-glükozid kötésekkel kapcsolódó oldalláncokat tartalmaz. A keresztkötési reakciók hatására a dextransból vízben oldhatatlan hálózat keletkezik. A polimermolekulák hézagoss szerkezetű belsejébe a kisméretű molekulák képesek bejutni, ellenben a nagyobbakkal, melyek csak a polimerek közötti labirintusban közlekedhetnek. Ennek megfelelően elválasztás során, az oszlop alján először a nagyobb molekulaméretű frakciók jelennek meg, mivel útjuk kevésbé hosszú, mint a kis részecskéké.

A gyári elnevezések (G-25, G-100, stb.) formálisan a gél vízfelvevő képességét vagy a víz visszatartását tükrözi. Így pl. G-100-as gél szerkezete grammonként kb. 10,0 ml vizet vesz fel, a G-25-ös gél pedig 2,5 ml-t. Ebből következik, hogy a G-25-ös gél több keresztkötést tartalmaz, mint a G-100-as, ami laza szerkezetű gélnek tekinthető. A keresztkötések számával csökken a gélek pórusmérete és annak a molekulaméretnek a határértéke, amely a gél szerkezetében még bejut. A gél szemcsék a gélágy térfogatát két részre osztják (6. ábra).

A gélkromatográfia eredményét az elúciós görbék alapján értékeljük. Azt a térfogatot, ahol egy adott molekula az elúció során megjelenik elúciós  $V_e$  térfogatnak nevezzük. Ha a gél szemcsék az oldott anyag molekuláit nem tartják vissza, az elúciós térfogat megegyezik az oszlop külső térfogatával:  $V_K = V_e$  (7. ábra, 1. csúcs). Ha a molekulák a teljes gélfázist igénybe veszik, akkor az elúciós térfogat egyenlő a géloszlop

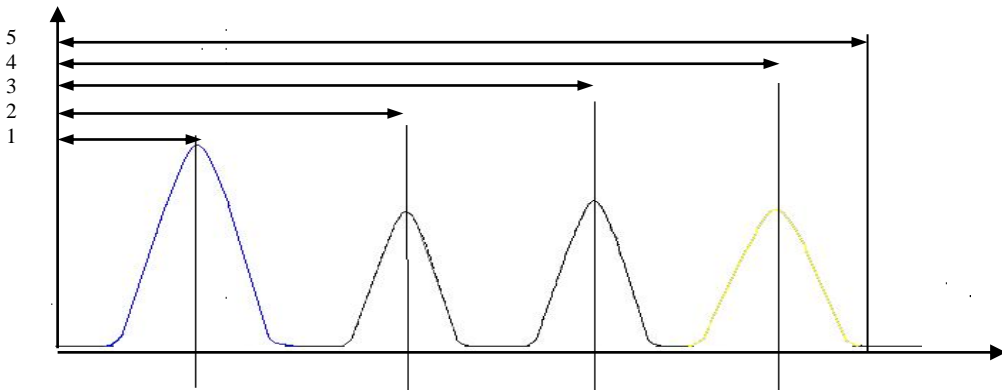
teljes térfogatával:  $V_T + V_u$  (7. ábra, 5. csúcs). A csúcsok közül a kisebb molekulák elúciós térfogata a nagyobb.



$V_K$ : a gélszemcsék közötti külső térfogat       $V_B$ : a gélszemcsék belső térfogata

$V_T = V_K + V_B$ : teljes térfogata a gélálynak

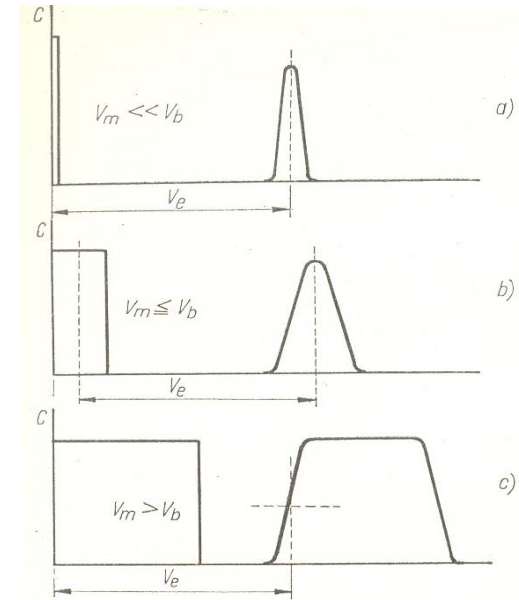
6. ábra: A gélágy térfogati megoszlás



- 1:  $V_K = V_{e1}$
- 2:  $V_{sz1} + V_K$
- 3:  $V_{sz2} + V_K$
- 4:  $V_T = V_{e2} = V_{K+B}$
- 5:  $V_T + V_u$

7. ábra  $V_e$ : elúciós térfogat, az elválasztandó anyag megjelenéséig a gélágyon átfolyt oldószer mennyisége

Az elúciós térfogat értelmezése látható a 8. ábrán, ha a) a minta térfogata sokkal kisebb, b) összemérhető, c) nagyobb a gélágy belső térfogatánál. Az elválasztási (szeparációs) térfogat egyenlő az elúciós térfogatok különbségével. Két anyag akkor választható szét tökéletesen, ha a megoszlási hányadosok különbsége legalább 0,3.



8. ábra: Elúciós térfogat értelmezése

Az adott fehérjét jellemezni tudjuk a kapacitástényező,  $k$  és a volumetrikus megoszlási hányados  $K_d$  alapján is. A kapacitás tényező az álló és az áramló fázisban valamely anyag megoszlásának arányát fejezi ki.

$$k = \frac{V_e - V_K}{V_K}$$

A volumetrikus megoszlási hányados a gélszemcsék belső térfogatának csak a molekulák rendelkezésére álló teret veszi figyelembe.

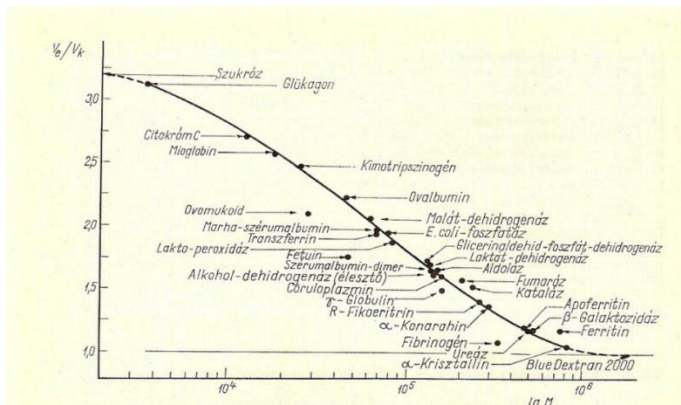
$$K_d = \frac{V_e - V_K}{V_b}$$

A gélcromatográfia gyakorlati jelentősége legtöbbször az oldott anyag molekulatömegének, molekula méret alapján történő frakcionálásában van. A vizsgált anyagok molekulatömege és a gélcromatográfia térfogati paraméterei között tapasztalati összefüggést találtak (9. ábra), amely megmutatta, hogy az elúciós térfogat és a molekulásúly logaritmusai között lineáris összefüggés van.

$$\lg M = M_0 - (k_1 - k_2d) V_e / V_K \quad \text{Determann egyenlet}$$

ahol  $M_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  az adott géltípusra jellemző állandók,  $d$  a gél sűrűsége.

A fenti képlet elsősorban a *hidrofil dextrán gélekre* megfelelő.



9. ábra: Az elúciós térfogat, és a fehérjék molekulatömegének összefüggése

### VIII.2. Elektroforézises eljárások

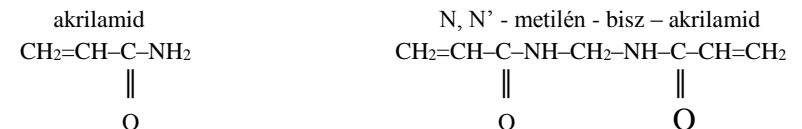
A fehérjék *méret szerinti elválasztására* alkalmazott gyakori módszer az elektroforézis. Adott pH-n a különböző fehérjék meghatározott számú pozitív és negatív töltést viselnek. Egyenáram alá helyezve a molekulákat a töltésüknek megfelelő irányba kezdenek el vándorolni. A vándorlás sebessége ( $v$ ) függ a molekula töltésétől ( $z$ ), tömegétől és alakjától ( $f$ ), továbbá az elektromos térerőtől ( $E$ ):

$$v = \frac{E \cdot z}{f}$$

Az elektroforézis felhasználható az *izoelektromos pont meghatározására* is úgy, hogy az elmozdulást a pH függvényében vizsgáljuk. Az izoelektromos ponton nem tapasztalható elmozdulás (izoelektromos kicsapás).

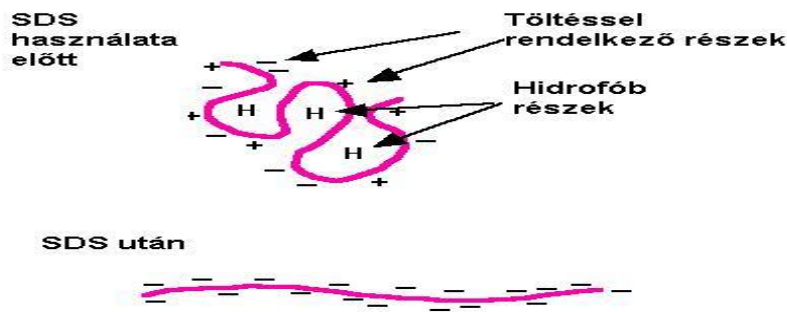
A zóna-elektroforézis során a mintát keskeny sáv formájában visszük be az elektrolitba, a minta komponensei az alkalmazott erőtér hatására eltérő sebességgel mozognak és az elektroforézis előrehaladtával sávokban különülnek el. A sávokat tiszta oldószer választja el, így a frakciók jól kinyerhetők. Tiszta folyadékban a sávok elmosódhatnak, ezért célszerű valamilyen hordozó anyagon végezni az elválasztást. A komponensek látszólagos mobilitásával kell számolni, a zóna szélesedéséért túlnyomó részben a molekuláris diffúzió a felelős. A papirelektroforézis pufferoldattal átitatott szűrőpapír alkalmazásával teremt meg az elválasztás közegét.

A gélelektroforézis leggyakrabban alkalmazott állófázisai olyan hálózatos szerkezetű gélszerű anyagok (keményítő, agar-agar, poliakrilamid, cellulóz-acetát, stb.), melyek labirintusszerű hálózatot alkotva a molekulamérettel arányos sebességű vándorlást tesznek lehetővé. A leggyakrabban alkalmazott a PAGE (poliakrilamid gélelektroforézis), ahol a poliakrilamid az akrilamid és  $N,N'$ -metilén-bisz-akrilamid (10. ábra) térhálós szerkezetű polimerizációs terméke. A poliakrilamid gél nagy előnye a kémiai stabilitás, legtöbb oldószerben oldhatatlanság, tág határokon belül megválasztható pórusnagyság. A poliakrilamid gél polimerizációjához katalizátorokat használnak, melyek megindítják és gyorsítják a térhálósodás folyamatát, pl.  $N,N,N',N'$ -tetrametil-etiléndiamin (TEMED), ammónium perszulfát (APS),... stb.



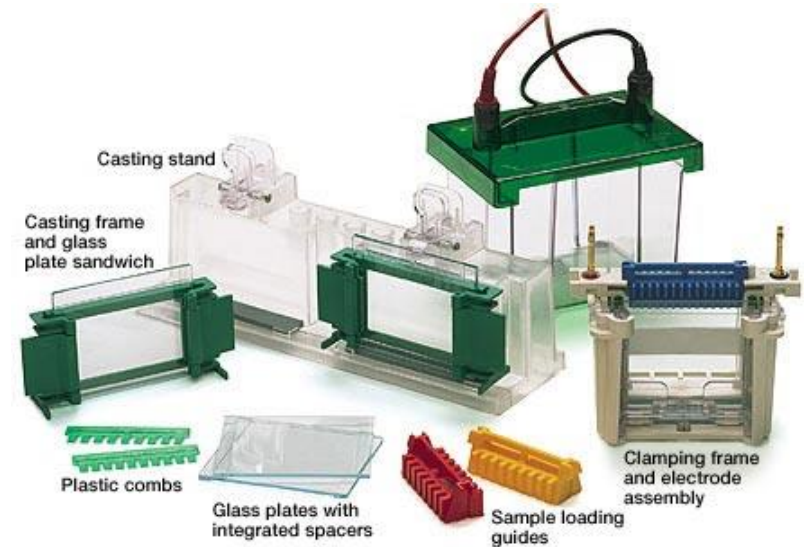
10. ábra: Akrilamid és  $N, N'$ - metilén-bisz-akrilamid

A gélelektroforézis fehérjék alegységszerkezetének, molekulatömeg-eloszlásuknak vizsgálatára használt változata az **SDS-PAGE** (sodium-dodecil-szulfátos poliakrilamid-gél-elektroforézis). A fehérjék redukálószer jelenlétében molekulatömegükkel arányos mennyiségű SDS (sodium-dodecil-szulfát) molekulát kötnek meg. Az SDS hatékony detergens, melynek az egyik vége (dodecil rész) erősen hidrofób, míg a másik fele töltéssel rendelkezik (szulfát csoport). A legtöbb fehérje három dimenzionális szerkezetének alapját a hidrofób aminosavak közötti kölcsönhatások adják. Az SDS felbontja ezt a szerkezetet: a globuláris fehérjéket lineárisra transzformálja, és negatív töltéssel burkolja be. Mivel mindegyik fehérjének közel azonos negatív töltése lesz, így a töltéskülönbségből adódó vándorlási sebesség változás megszűnik és csakis a gél pórusnagysága által megszabott molekulaszűrő-hatás érvényesül. A 11. ábra az SDS hatását szemlélteti a fehérjékre.



11. ábra: SDS hatása a fehérjék szerkezetére

Ezen az elven alapul a gélelektroforetikus *molekulatömeg-meghatározási módszer*: ismert méretű fehérjéket standardként futtatva, kalibrációs görbét veszünk fel. Ennek alapján bármely ismeretlen fehérje molekulatömege meghatározható. A gélelektroforézis folyhat álló vagy fekvő helyzetű gélen. A 12. ábra az álló helyzetű gélelektroforetikus készüléket mutatja be.



12. ábra: Gélelektroforézis készülék

Az **izoelektromos fókuszálás** esetén annál a pH értéknél, amelynél a fehérjék össztöltése nulla (az izoelektromos ponton) a fehérjék nem vándorolnak tovább az elektroforézis során. Különböző töltéstartalmú polimerekkel (poliamfolitokkal) olyan pH-gradiens hozható létre, amelyben a fehérjék addig vándorolnak elektromos feszültség hatására, amíg el nem érik az izoelektromos pontjuknak megfelelő tartományt. Az IEF (izoelektromos fókuszálás) során agaróz gélt, vagy más nagy pórusméretű hordozót használnak.

Az **izotachoforézis** során anionokat választunk el egy kis keresztmetszetű csőben. Először megtöltjük az anódtérrel a nagy mozgékonyan aniont tartalmazó vezető elektrolittal, majd a vizsgálandó anyagot és végül egy követő elektrolitot töltünk a katódtérbe, mely elektrolitban legkisebb az ionok mozgékonyasága. Az egyenáramú erőterben a minta a két elektrolit között maradván vándorol és kialakítja zónáit, melyekben egy idő után csak egyféle ion található. A zónákat elektrokémiai vagy UV-abszorpciós módszerekkel detektálják.

Az elektroforetikus eljárásoknak kétdimenziós változata is, a **2D elektroforézis**, amikor pl. egyik irányban pl. SDS-PAGE molekulaméret szerinti szétválasztás, a másik -ra merőlege- irányban pedig izoelektromos fókuszálás történik.

Egyre elterjedtebb az elektroforézis műszeresített változata a **kapillaris elektroforézis**. A nagy hatékonyságú kapillaris elektroforézisnél (HPCE) az elválasztás kis belső átmérőjű kapillarisokban történik (általában 50-től 100µm-ig), magas feszültséggel. Ezzel nagy felbontású elválasztást érhetünk el rövid mérési idő alatt.

Legújabban a "hitelkártya méretű" ún. **lab-on-a-chip**pekkkel (laboratory on a chip) is végeznek elektroforetikus elválasztásokat. A mikro-, vagy nanoliternyi nagyságrendű mintaoldat elemzése üveg, szilikon, vagy műanyag alapú lapokba maratott, legfeljebb néhány centiméter hosszúságú mikrokapillarisokban történik. A kapillaris csatornához elektródok csatlakoznak, melyek változó nagyságú és polaritású elektromos teret hozhatnak létre. Így a minta, és a pufferoldat mozgása elektrokinetikusan szabályozott a chipen belül. A fehérjék egy géllal feltöltött kapillarisban válnak szét. A detektálás leggyakrabban lézer indukált fluoreszcenciával történik.

## IX. A gyakorlati feladatok leírása

### IX. 1. Fehérjék oldhatósági profiljának meghatározása

#### A gyakorlat során felhasznált anyagok, eszközök

##### *Anyagok, oldatok*

- zsírmentes szójaliszt (kereskedelmi forgalomban)
- 0,1 M NaOH-oldat
- Sörensen-pufferek:
  - 1,15 pH → 0,1M HCl + 1M HCl ill. deszt.víz
  - 3,53 pH → 0,1M HCl + 0,1M Na-citrát
  - 4,45 pH → 0,1M HCl + 0,1M Na-citrát
  - 6,98 pH → 1/15M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1/15M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 9,01 pH → 0,1M HCl + 0,2 M Na-borát

##### *Eszközök*

- mágneses keverő
- rázókészülék (VXR basic, IKA, Németország)
- automatapipetták és hegyek: 200 µl-es, 1 és 5 ml-es
- főzőpohár: 100 ml-es
- mérőlombikok: 10 és 50 ml-es
- centrifugacsövek (műa.), dugók: 10 ml-es
- mintatartó csövek (üveg): 10 ml-es
- szűrőpapír (Filtrak GmbH, Németország)
- tölcsek
- quartz küvetták
- UV-VIS spektrofotométer (SPEKOL, Zeiss, Németország)

## Mintaelőkészítés

### *Standard oldatok elkészítése*

- 100 ml-es főzőpohárba analitikai (4 tizedesjegy) pontossággal 100 mg szójalisztet mérünk.
- A bemért mintához mérőhengerrel 45ml 0,1M NaOH-oldatot adunk.
- A főzőpoharat mágneses keverőkre helyezzük, és 15 percig kevertetjük.
- Az oldatot 50 ml-es mérőlombikba töltjük, majd a lombikot 0,1M NaOH-oldattal jelig töltjük.
- Ezt követően az oldatot a lebegő szennyeződések eltávolítása céljából redős szűrőn átszűrjük. A szűrletet tiszta főzőpohárba gyűjtjük.
- Az így kapott 1g/l koncentrációjú oldatból 0,1g/l koncentrációjú törzsoldatot készítünk. Az utóbbi oldatból kiindulva hígítással 10-10 ml-es mérőlombikokban a következő standard oldatsorozatot állítjuk elő: 0,08; 0,05; 0,02; 0,01 g/l. A hígításokat 0,1M NaOH-dal. végezzük.

### *Mintaoldatok elkészítése*

- Az 5 db műanyag centrifugacsőbe egyenként, 4 tizedes pontossággal 100 mg szójalisztet mérünk.
- A bemért mintákhoz a megfelelő Sørensen-pufferoldatokból pH-pontonként 5ml-t adunk. Az adagoláshoz automatapipettát használunk.
- Ezt követően a centrifugacsöveket ledugaszoljuk, kézzel összerázzuk, majd rázógépen 15 percig egyenletesen rázatjuk.
- Az oldási idő elteltével a mintaoldatok felülúszóját redős szűrőn az előre megjelölt mintatartó csövekbe szűrjük.
- Az elkészített oldatokat megfelelő hígítás után használjuk fel a méréshez.

## Oldatok fehérjetartalmának meghatározása UV spektrofotometriával

Az eljárás lényege, hogy az ismert koncentrációjú fehérjeoldatok (standard oldatok) UV abszorbanciáját megmérjük, majd megállapítjuk a koncentráció-abszorbancia összefüggést (azaz kalibrációs görbét készítünk). Az összefüggés felhasználásával az ismeretlen oldatok fehérje koncentrációja meghatározható. A mérés során először felvesszük a standard oldatok UV spektrumát és kiválasztjuk a mérési hullámhosszat.

1. Felvesszük az elkészített legnagyobb koncentrációjú standard UV spektrumát. (Háttér: 0,1M NaOH)
2. A spektrumadatok alapján kiválasztjuk a mérési hullámhosszat.

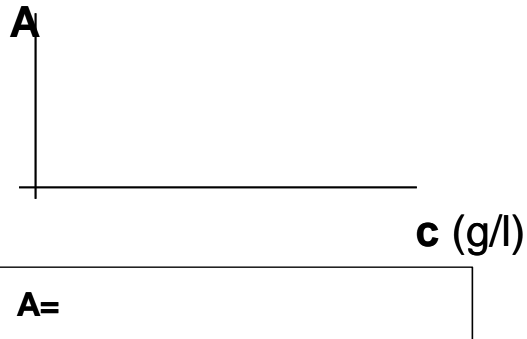
nm

3. Ezt követően lemérjük a kalibráló oldatok abszorbanciáját.

Koncentráció (g/l)	A
0	
0,01	
0,02	
0,05	
0,08	
0,1	

5. táblázat: A standard oldatokra mért abszorbancia értékek

4. Megállapítjuk az abszorbancia-koncentráció összefüggést.



5. Ha a kalibrációs összefüggés megfelelő, megkezdjük a mintaoldatok mérését.

	A
1,15 pH	
3,53 pH	
4,45 pH	
6,98 pH	
9,01 pH	

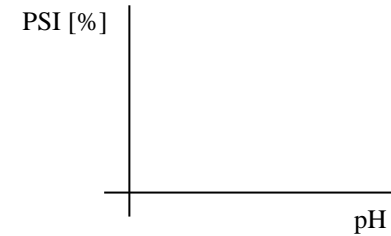
4. táblázat: A mintaoldatokra mért abszorbanca értékek

6. Kiszámítjuk az egyes pH-értékekhez tartozó PSI-értékeket. A különböző pH-n mért koncentráció-értékekből fehérje oldhatósági indexeket (Protein Solubility Index, PSI) számítunk ki a következő képlet segítségével:

$$\text{PSI} [\%] = ([c_{\text{feh}} \times V_{\text{old}}] / m_0) \times 100, \text{ ahol}$$

$c_{\text{feh}}$  = fehérjeoldat koncentrációja [g/l];  $V_{\text{old}}$  = fehérjeoldat térfogata [l];  
 $m_0$  = bemért fehérjemennyiség [g].

7. Ezt követően ábrázoljuk a fehérjék oldhatósági profilját, azaz ábrázoljuk a kiszámított PSI-értékeket a pH függvényében!



A vizsgált fehérje oldhatósági profilja

8. Hogyan jellemezhetjük az oldhatósági diagramot? (a görbe lefutása, az izoelektromos tartomány helye, oldhatóság a savas ill. lúgos tartományban, stb.)

## IX. 2. Gélkromatográfia

### A gyakorlat során felhasznált anyagok, eszközök

#### Anyagok, oldatok

- Sephadex gél
- desztillált víz
- kvarchomok
- Blue Dextran 2000 (20 mg/ml)
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (20 mg/ml)

#### Eszközök

- üvegoszlop és adapter
- üvegbot
- állvány
- szűrőpapír korong (Filtrak GmbH, Németország)
- automata pipetta (100-1000 $\mu$ l)
- mérőhenger
- főzőpohár



### Mintaelőkészítés

- Az adott Sephadex gélt a megfelelő ideig duzzasztjuk (a gélt a gyakorlaton résztvevők már hidratált állapotban kapják).
- A gélkromatográfiás kalibrációhoz elkészítjük a kalibráló oldatot, amely Blue Dextrán és kálium-dikromát 1:1 arányú keveréke. A két oldat koncentrációja 20 mg/ml, az ebből készített keveréket hígítjuk kétszeresére (az oldat készen áll a gyakorlaton résztvevők számára).

### Gyakorlat menete

- Vágjunk ki az adapterrel megegyező átmérőjű szűrőpapírkorongot és nedvesítsük meg, helyezzük az adapterrel együtt az oszlopba és rögzítsük.
- Fixáljuk függőlegesen a kromatográfiás oszlopot. Töltsünk az oszlopba kb. 0,5 cm magasságban kvarchomokot és desztillált vízzel nedvesítsük meg.
- Zárjuk el az oszlop kifolyó nyílását!
- Az oszlop tetejéhez csatlakoztassunk tölcseért és öntsünk - lehetőleg lassan és egyenletes ütemben - annyi egyenletesen felkevert gélsuszpenziót az oszlopba, ami leülepedés után a szükséges gélmagasságot biztosítja. Amikor az oszlop alján a gél szemcsék már néhány cm magasságban leülepedtek, nyissuk ki a kifolyó csapját és hagyjuk a teljes gélmennyiséget leülepedni. A leülepedett géloszlop fölött mindig legyen puffer!
- Amikor az oszlopban a gél a kívánt magasságban leülepedett, zárjuk el a kifolyó nyílását.
- Vonalzó segítségével mérjük meg az oszlop átmérőjét és magasságát, az adatokból számítsuk ki az oszlop térfogatát.
- Az oszlopon kalibrálást végzünk: Blue Dextrán - dikromát keveréket rétegezzünk automata pipettával a gél felszínére. Vigyázzunk, hogy a gél felszínét ne zavarjuk fel. A felvihető minta mennyisége a teljes oszloptérfogat 1-5%-a lehet.

- Helyezzünk mérőhengert a kifolyónyíláshoz.
- Nyissuk ki az oszlopot és hagyjuk a mintát egészen beszivárogni a gélbe.
- A gél felszínre felkeverés nélkül kb. 2-3 cm magasságban rétegezzünk puffert, így elindítva az elúciót. Vigyázzunk, hogy a befolyócsőben ne legyen az egyenletes folyást akadályozó levegőbuborék.
- Gyűjtsük össze a kifolyócsapon át távozó eluátumot célszerűen mérőhengerbe, a minta felvitelétől számítva az oszlop kifolyónyílásán megjelenő kék színig (Blue Dextrán), valamint sárga szín (kromát ion) megjelenéséig, hogy meg tudjuk határozni az oszlop jellemző térfogati adatait.
- Mossuk át az oszlopot legalább kétszeres oszloptérfogatú pufferrel (desztillált víz) és óvatosan szedjük szét az oszlopot. A gélt gyűjtsük össze, a kvarchomokot alaposan mossuk ki az oszlopból, és vegyük ki az adaptert.

### A méréshez szükséges számítási képletek

- I. Mérjük meg a saját oszlop paramétereit (magasság, átmérő), elméleti térfogatát ( $V_{Te}$ ) és számoljuk ki az ajánlott mintatérfogatot!

$$m =$$

$$d =$$

$$V_{Te} = r^2 \times \pi \times m =$$

$$V_M = (1-5)\% \times V_{Te} =$$

$$\text{elméleti kizárt térfogat: } V_{Ke} = 0,33 \times V_{Te} =$$

$$\text{elméleti belső térfogat: } V_{Be} = V_{Te} - V_{Ke} =$$

- II. A mérőhenger segítségével adjuk meg az egyes frakciók mennyiségét:

$$\text{kizárt térfogat (első elúciós térfogat, azaz az első kék cseppig): } V_K = V_{e1} =$$

2. elúciós térfogat (első sárga cseppig):  $V_{e2}$

szeparációs térfogat :  $V_{sz} = V_{e2} - V_{e1} =$

2. elúciós térfogat (első sárga cseppig) egyenlő a teljes térfogattal:  $V_{e2} = V_T$

Az oszlop tisztulási térfogata (Teljes térfogat + az utolsó sárga csepp térfogata):

$V_0 = V_T + V_u =$

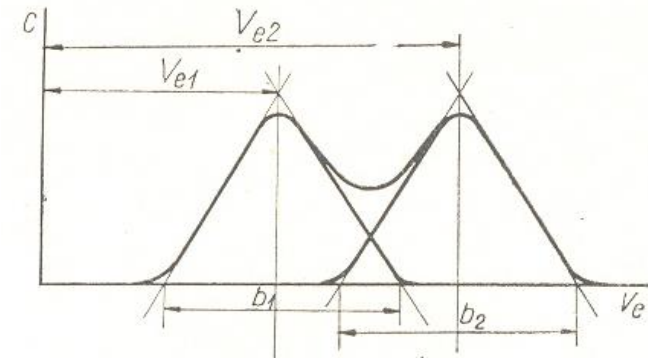
Számoljuk ki a belső térfogatot!  $V_B = V_T - V_K =$

III. Hasonlítsuk össze a mért és az elméleti oszloptérfogatokat! Mi az oka az eltérésnek (ha van eltérés)?

### IX.3. Kiadott feladatok

#### Gélkromatogram értékelése

A kapott kromatogramon állapítsuk meg az elválasztott komponensek számát, és az elúciós térfogatukat ( $V_e$ ). Állapítsuk meg az elválasztóképességet ( $R_s$ , más néven felbontóképesség) két kiválasztott fehérje frakcióra nézve (jónak nevezzük az elválasztást, ha  $R_s \geq 1,5$ , ha az elválasztóképesség 0,8 alatt van akkor az elválasztás általában nem kielégítő). Állapítsuk meg, hogy a két frakció elválasztása megfelelő-e!



13. ábra: Kromatogram kiértékelése

$$R_s = \frac{V_{e2} - V_{e1}}{1/2(b_1 + b_2)}$$

#### Gélelektroferogram kiértékelése

A laborgyakorlaton kapott gélkép és standard (SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range – BIO-RAD) adatok alapján.

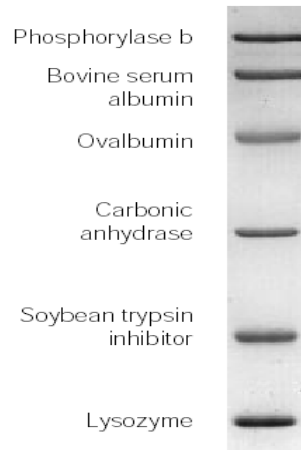
#### Gélkép kiértékelése:

- A kapott gélképen 3 minta gélképe található.
- Határozza meg a mintában lévő fehérjék és a standard keverékben lévő fehérjék Rf faktorait!
- A standard fehérjék Rf faktorai alapján készítse el az adott gélre a kalibrációs egyenest!
- A kalibrációs egyenes alapján állapítsa meg a mintában lévő ismeretlen fehérje alegységek molekulatömegeit!

A standard keverékben lévő fehérjék gélképe, és a kapcsolódó molekulatömege a 14. ábrán láthatóak:

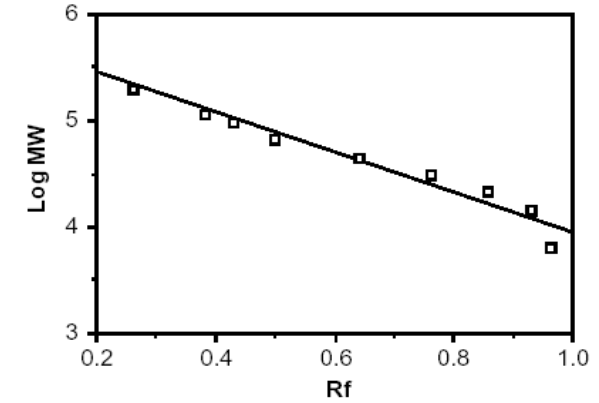
### Protein Molecular Weights (daltons)

Protein	Molecular Weight	Broad Range	Low Range	High Range
Myosin	200,000	X		X
$\beta$ -galactosidase	116,250	X		X
Phosphorylase b	97,400	X	X	X
Serum albumin	66,200	X	X	X
Ovalbumin	45,000	X	X	X
Carbonic anhydrase	31,000	X	X	
Trypsin inhibitor	21,500	X	X	
Lysozyme	14,400	X	X	
Aprotinin	6,500	X		



14. ábra: Standard fehérjék gékép kiértékeléshez

A standard fehérjék kalibrációs egyenesére a 15. ábrán mutatunk példát (az y tengely **logaritmikus**, mert a fehérje frakciók vándorlási sebessége logaritmikusan arányos a molekulatömegükkel!).



15. ábra: Standard fehérjék alapján készült kalibrációs egyenes (*példa!*)

$$R_f = \frac{\text{Fehérje távolsága}}{\text{Futási front távolsága}}$$

#### IX.4. Jegyzőkönyv formai és tartalmi elvárásai

A jegyzőkönyveket a gyakorlatot követő **vasárnap 23:59-ig** kérjük email-ben elküldeni az aktuális gyakorlatvezetőnek.

A jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell:

- a laborgyakorlat célját (elméleti bevezető *nem* szükséges),
- a laborgyakorlat menetét (tömören, tárgyyszerűen, lehetőleg pontokba szedve, olyan formában és olyan tartalommal, hogy a leírás alapján a mérés megismételhető legyen),
- a mérések során tapasztalt megfigyeléseket, és a felmerült problémák leírását,
- a külön lapon kapott gélkromatogram és elektroforetogram kiértékelését (a gélkromatogramot, gélképet, illetve az elkészített saját kalibrációs egyenest is **csatolni kell**),
- az eredményeket és rövid, szöveges értékelését!

#### X. A felkészülést segítő ellenőrző kérdések

- ☺ Mit nevezünk izoelektromos pontnak?
- ☺ Milyen paraméterek befolyásolják egy fehérje izoelektromos pontjának értékét?
- ☺ Milyen szempontok szerint csoportosíthatóak a fehérjék?
- ☺ Mely tényezők befolyásolják a fehérjék oldódását?
- ☺ A biológiai minta minősége szerint milyen sejtfeltárási eljárásokat alkalmazna?
- ☺ Milyen fehérjeizolálási eljárásokat ismer?
- ☺ Min alapulnak a fehérje frakcionálási eljárások?
- ☺ Melyek az Osborne frakcionálás lépései?
- ☺ Mire használják a gélelektroforézist a fehérje analitikában?
- ☺ Hogyan csoportosíthatók a fehérjeanalitikai eljárások?
- ☺ Milyen közvetett mérési módszereket ismer?
- ☺ Hasonlítsa össze a Kjeldahl és a Dumas-Pregl eljárásokat, vesse össze azok előnyeit és hátrányait is!
- ☺ Milyen közvetlen mérési eljárásokat ismer?
- ☺ Hogyan alkalmazhatók a fotometriás technikák fehérjeoldatok koncentrációjának meghatározására?
- ☺ Milyen fehérjeelválasztási technikákat ismer?
- ☺ Mi a gélkromatográfia működési elve?
- ☺ Mire használják a gélkromatográfiát a fehérje analitikában?
- ☺ Mi a gélelektroforézis működési elve?

**Felhasznált irodalom:**

Elődi Pál: Biokémia, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1989

Lásztity Radomir és Törley Dezső (szerk.): Élelmiszer-analítika I.,  
Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1987

Sarkadi Livia: Biokémia mérnök szemmel, Typotex Kiadó, Budapest, 2011

Salgó András: Élelmiszerkémia és táplálkozástan I., Műegyetemi Kiadó,  
Budapest, 2001

**A leíratot összeállította:**

Bagdi Attila, Balázs Gábor, Hajas Livia, Dr. Haraszi Réka, Kormosné Dr.  
Bugyi Zsuzsanna, Nádasi Márta, Szendi Szilvia, Dr. Tömösközi Sándor,  
Török Kitti