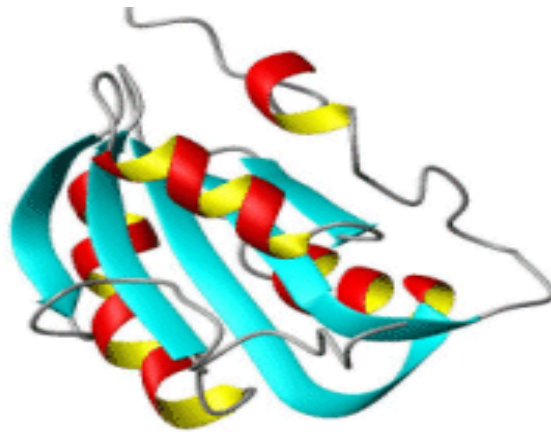


Fehérje Analitika 2.



Spektroszkópiás technikák

MSC, 2011. tavaszi félév

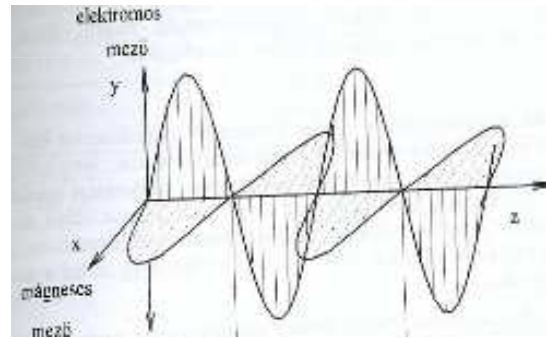
CD

Cirkuláris Dikroizmus spektroszkópia

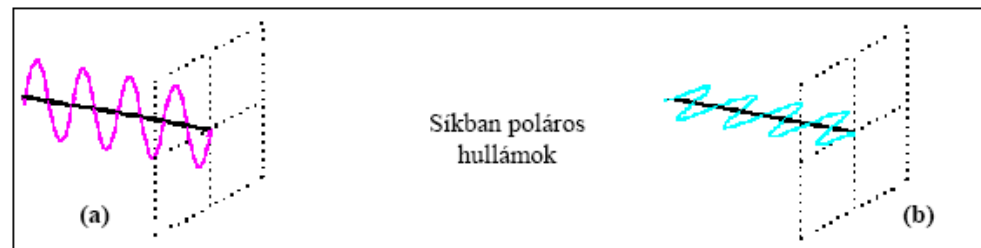


A CD alapjai

- **Fény:** elektromágneses hullám, elektromos és mágneses tér időbeli és térbeli periodikus változása

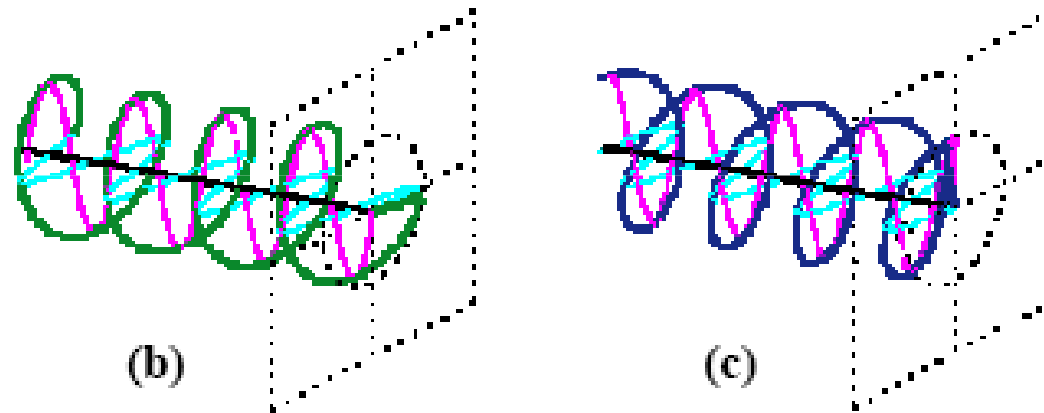


- **Síkban (lineárisan) polarizált fény:** térerősség vektorok (elektromos és mágneses) mindig ugyanabba az irányba mutatnak. A lineárisan polarizált fény terjedési iránya és az elektromos vektornak erre merőleges iránya által meghatározott síkot nevezzük a *polarizáció síkjának*.



A CD alapjai

- **Cirkulárisan polarizált fény:** két egymásra merőleges síkban polározott fénysugár szuperpozíciója, 90° fázis különbséggel. Szemléletesebben a cirkulárisan polarizált fény térerősség vektorai egy kör kerülete mentén forgó mozgást végeznek, közben viszont a fény halad előre: haladó csavarvonalat kapunk.

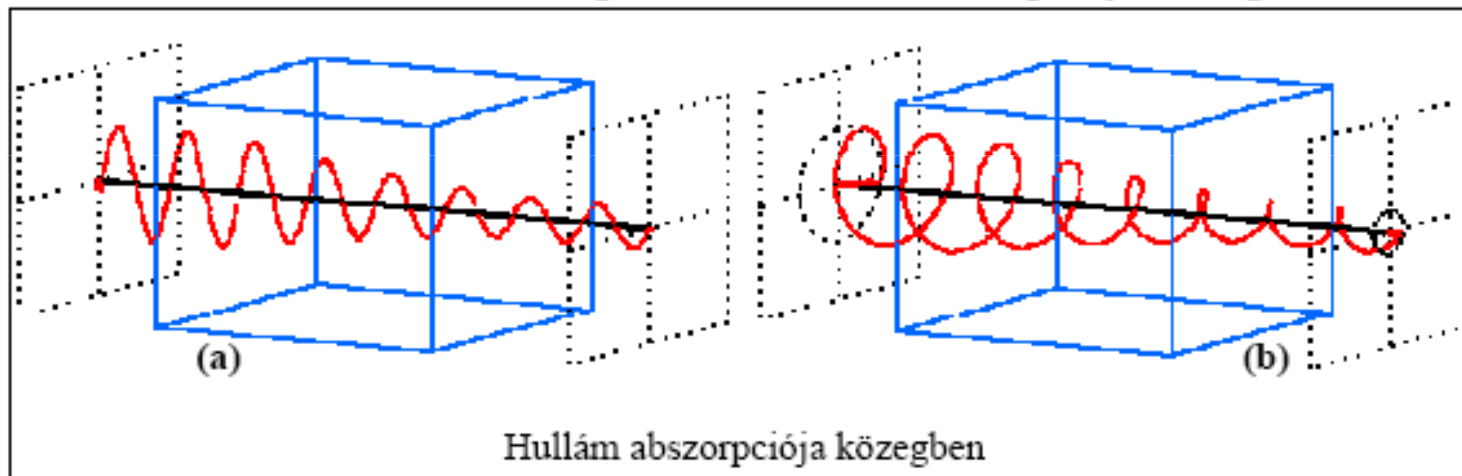


(b) Jobbra cirkulárisan polarizált fény

(c) Balra cirkulárisan polarizált fény

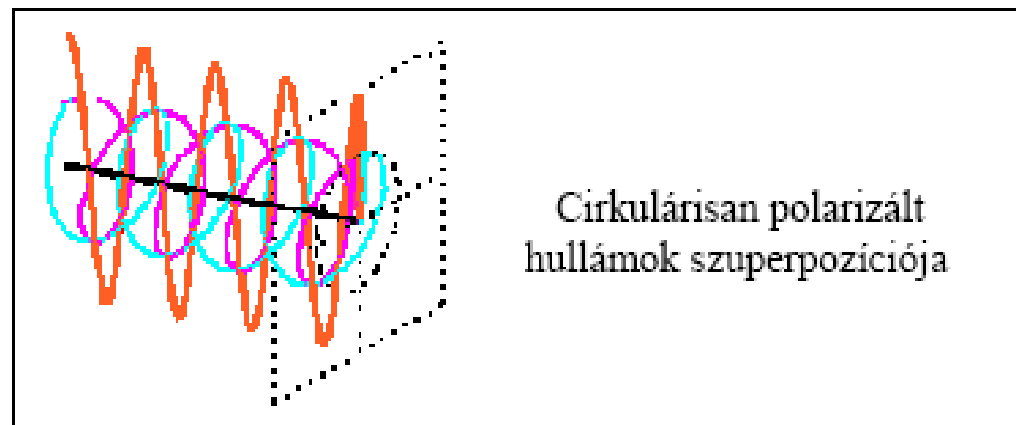
A CD alapjai

- Cirkulárisan polarizált fény anyagon halad át intenzitása exponenciálisan csökken, de térerősség vektora ugyanabba a fázisban marad



A CD alapjai

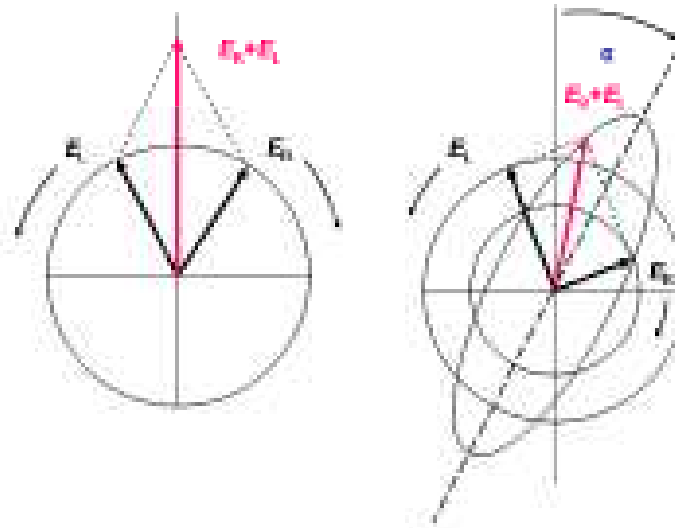
- Ha egy jobbra és egy balra cirkulárisan poláros fényt adunk össze = síkban polározott fény (azonos amplitudó, azonos hullámhossz)



Következtetés: Minden lineárisan polarizált fény felbontható két, azonos amplitudójú jobbra ill. balra cirkulárisan polarizált fény összegére

A CD alapjai

- Vannak olyan anyagok, amelyek egy különleges tulajdonsággal rendelkeznek: eltérő mértékben nyelik el a jobbra, ill. balra cirkulárisan poláros fényt. Ezt a jelenséget nevezzük cirkuláris dikroizmusnak: **A fény elliptikusan polarizáltá válik.**

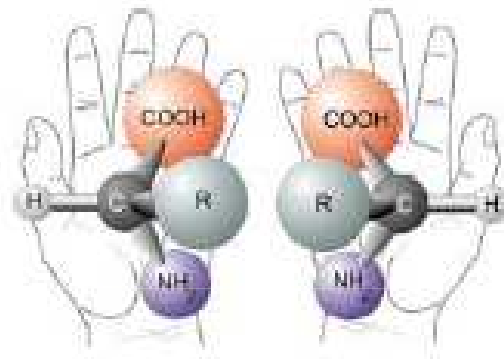


A CD alapjai

- Két cirkulárisan polarizált fénysugár különböző mértékben nyelődik el az optikailag aktív közegben, így azon áthaladva az amplitúdójuk is különbözni fog (cirkuláris dikroizmus jelensége), ami elliptikus polarizációhoz vezet.
- Az ellipszis alakját egyértelműen jellemezhetjük az **ellipticitással**:
$$\theta = \arctan(b/a)$$
ahol a az ellipszis nagy, míg b a kis tengelye.
- A mintán áthaladó fény elnyelődésére érvényes a Lambert-Beer törvény. A balra és a jobbra cirkulárisan poláros fény abszorpciós koefficienseinek különbségét ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{bal}} - \varepsilon_{\text{jobb}}$) mérve a hullámhossz függvényében kapjuk az optikailag aktív mintára jellemző **CD spektrumot**.

A CD alapjai

- Azokat az anyagokat, amelyek a rajtuk átbocsátott fény polarizációs síkját elforgatják (optikai rotáció), vagy a síkban poláros fényt elliptikussá teszik, **optikailag aktív** anyagoknak nevezzük.



- Biológiai makromolekulák oldatainak az optikai aktivitásából következtethetünk a molekulák szerkezeti jellemzőire: **Másodlagos szerkezet!**

A CD alapjai

- Az élő szervezetek által szintetizált molekulák döntő többsége, így a fehérjék is optikailag aktívak, azaz az oldatukon keresztülbocsátott polarizált fény síkját elforgatják. Ezen optikai forgatás mellett felléphet még az ellipticitás, a cirkuláris dikroizmus és a cirkuláris törésmutató különbség jelensége.
- Csak olyan hullámhosszúságú fénynél kaphatunk CD jelet, ahol a mintának van "normál" elnyelése.
- Fehérjék esetében ez a **távoli UV** tartomány (180 - 260 nm)

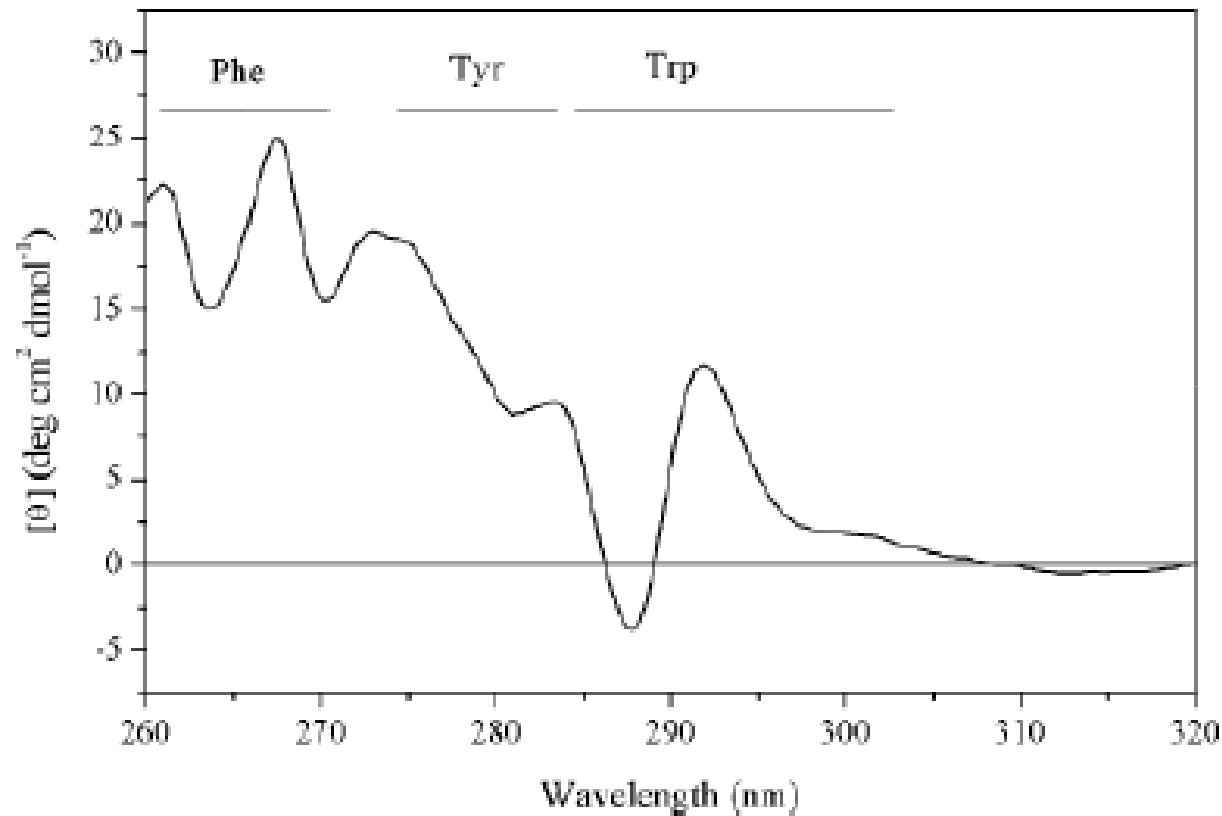
A CD alapjai

- Közele UV (310-260nm)
Fehérjék harmadlagos esetleg negyedleges szerkezete, kismolekulák ujjlenyomat szerű spektrum
- Távoli UV (260-180nm):
fehérje másodlagos szerkezet

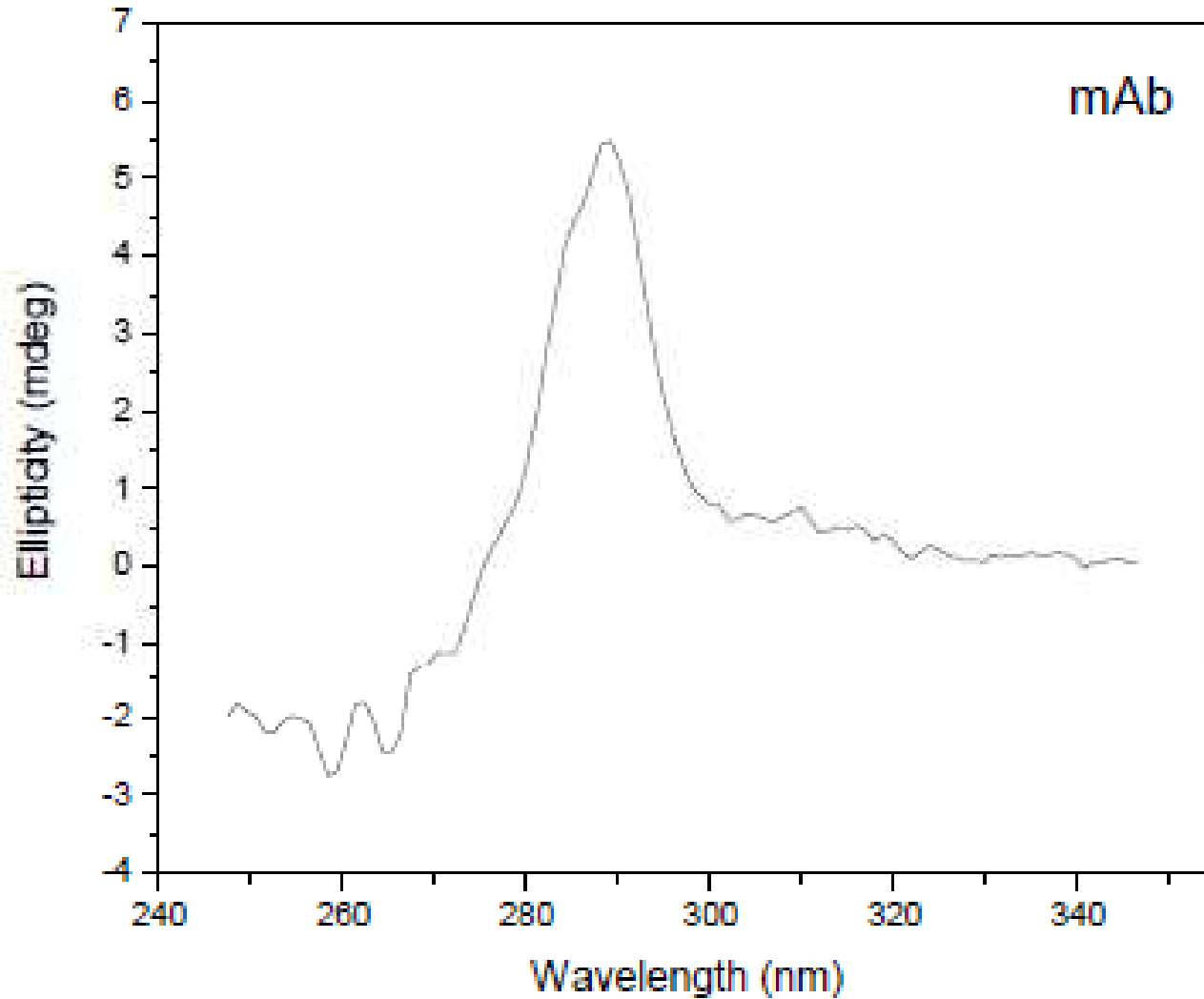
Közeli UV(260-310nm) CD: Harmadlagos szerkezet

Elnyelési sávok:

Tyr (275-282 nm), Trp (290-305 nm), Phe (255-270 nm)



Közeli UV(260-310nm) CD: Harmadlagos szerkezet



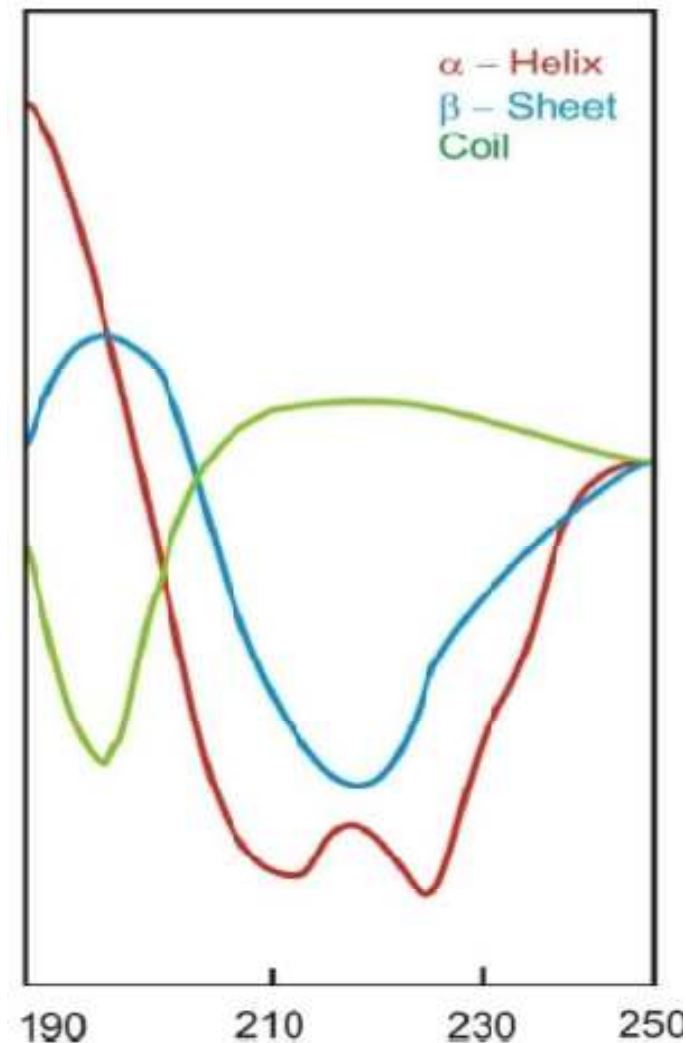
Távoli UV tartomány: Másodlagos szerkezet vizsgálata

Másodlagos szerkezet vizsgálata:

- Peptid váz: elnyelés 240 nm alatt
- n – p* átmenet 220 nm körül
- n - n* átmenet 190 nm körül (intenzív)

Fehérjék jellemző spektrumai:

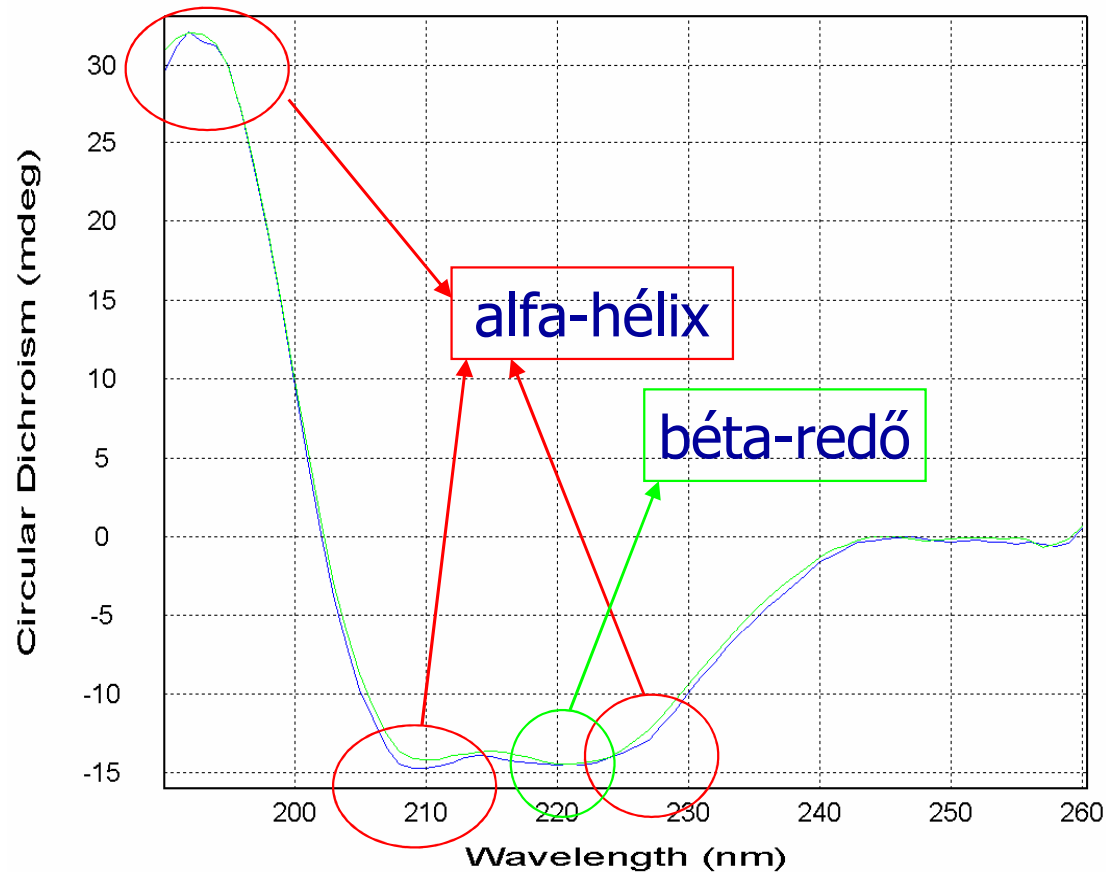
- **Alfa-hélix:** 2 negatív csúcs 208 és 222 nm-nél
- **Béta-redő:** 1 negatív csúcs 218 nm-nél
- **Rendezetlen régió:** 1 negatív csúcs 196 nm-nél



CD spektrumok kiértékelése

- Neurális háló alapú predikciós szoftver (CDNN, K2D)
- Bázis függvények lineár kombinációja (CCA+)
- Referencia vegyületek alapján (SELCON, CDSSTR)

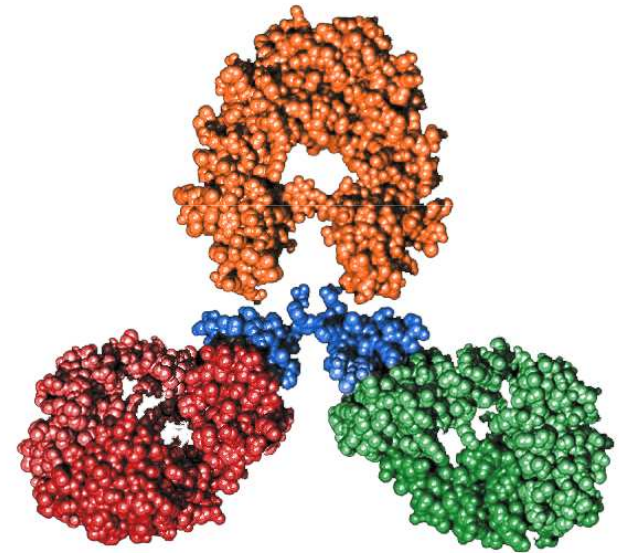
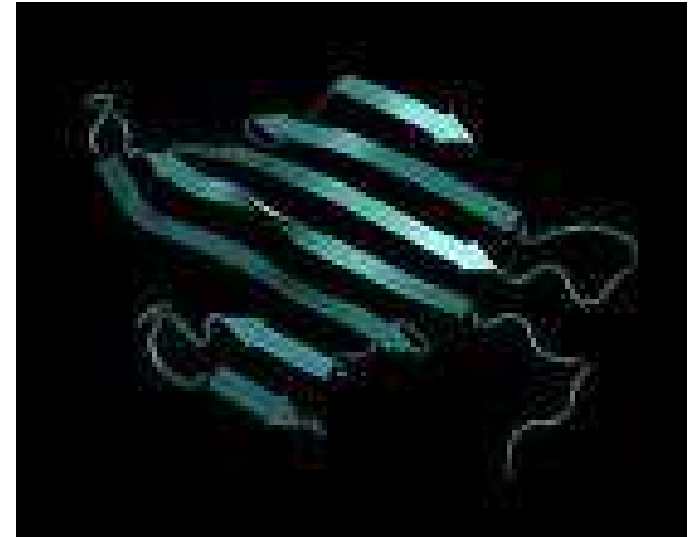
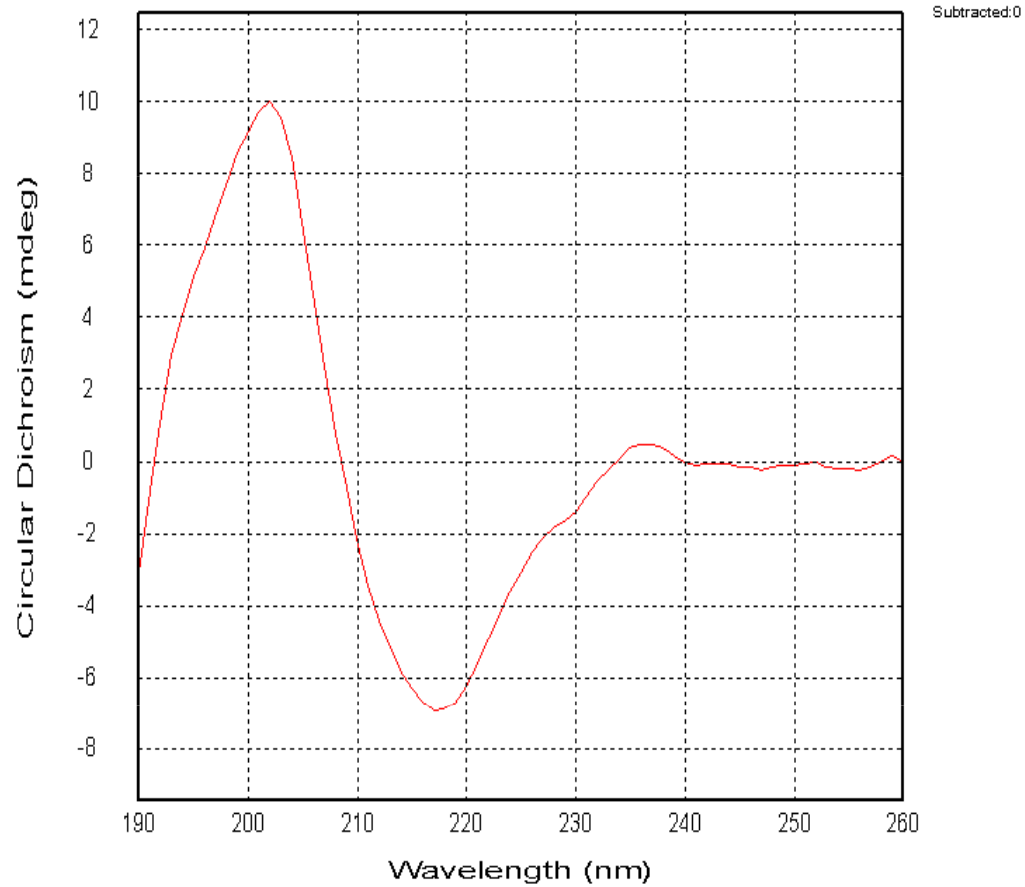
Távoli UV tartomány: Másodlagos szerkezet vizsgálata



Dekonvolúció:

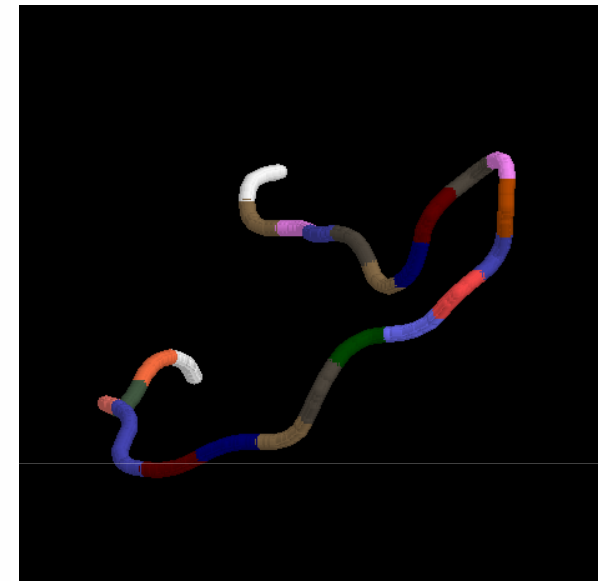
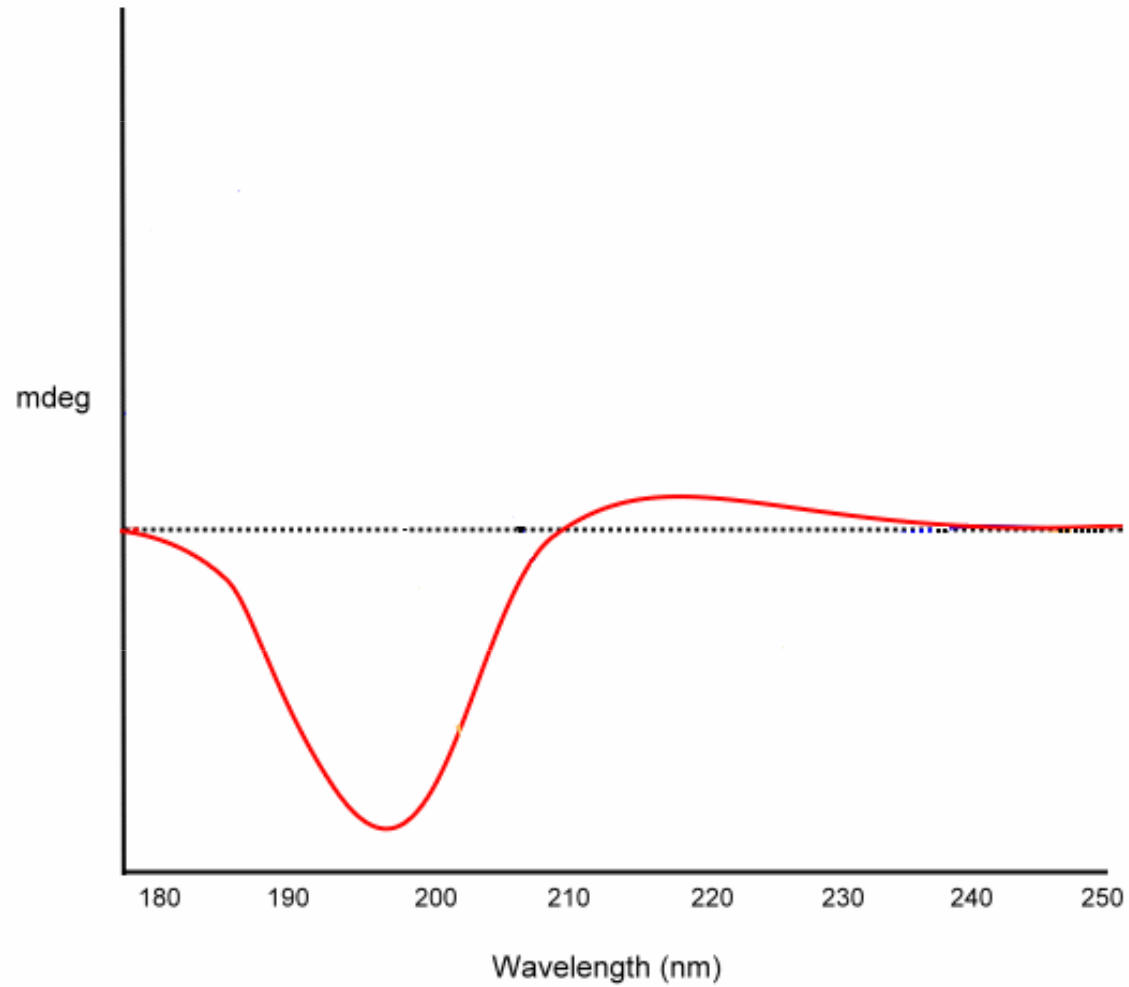
	190-260 nm
Helix	75.0 %
Antiparallel	0.2 %
Parallel	2.9 %
Beta-Turn	10.4 %
Rndm. Coil	11.1 %
Total Sum	99.6 %

β -redő



MAb távoli UV CD spektruma

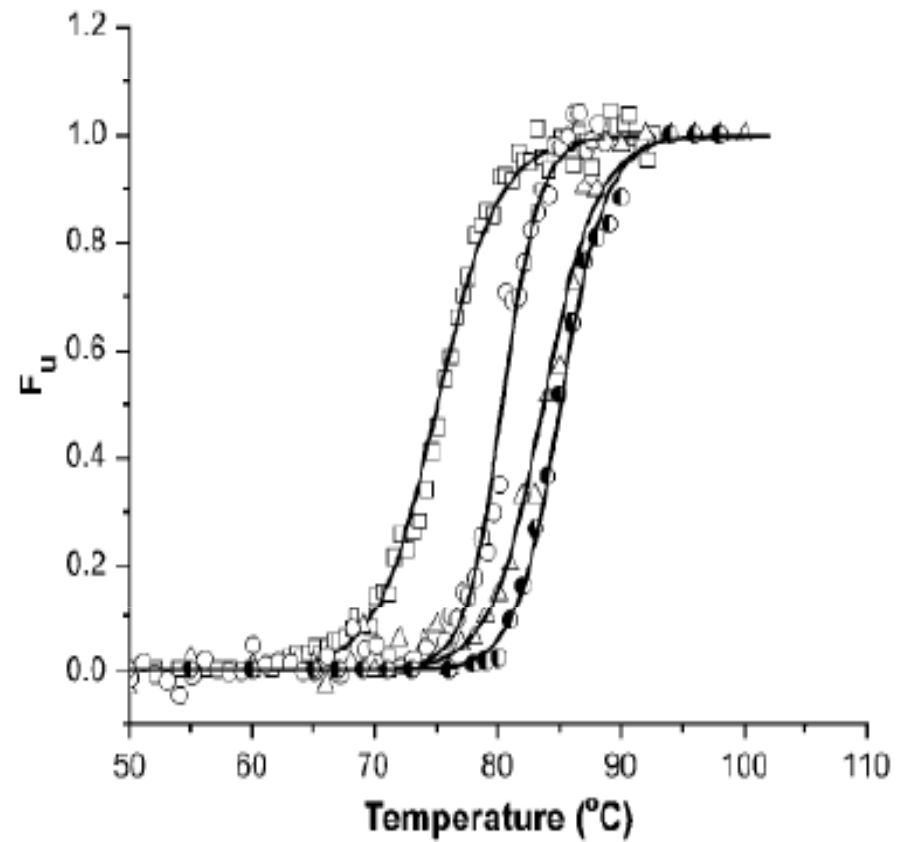
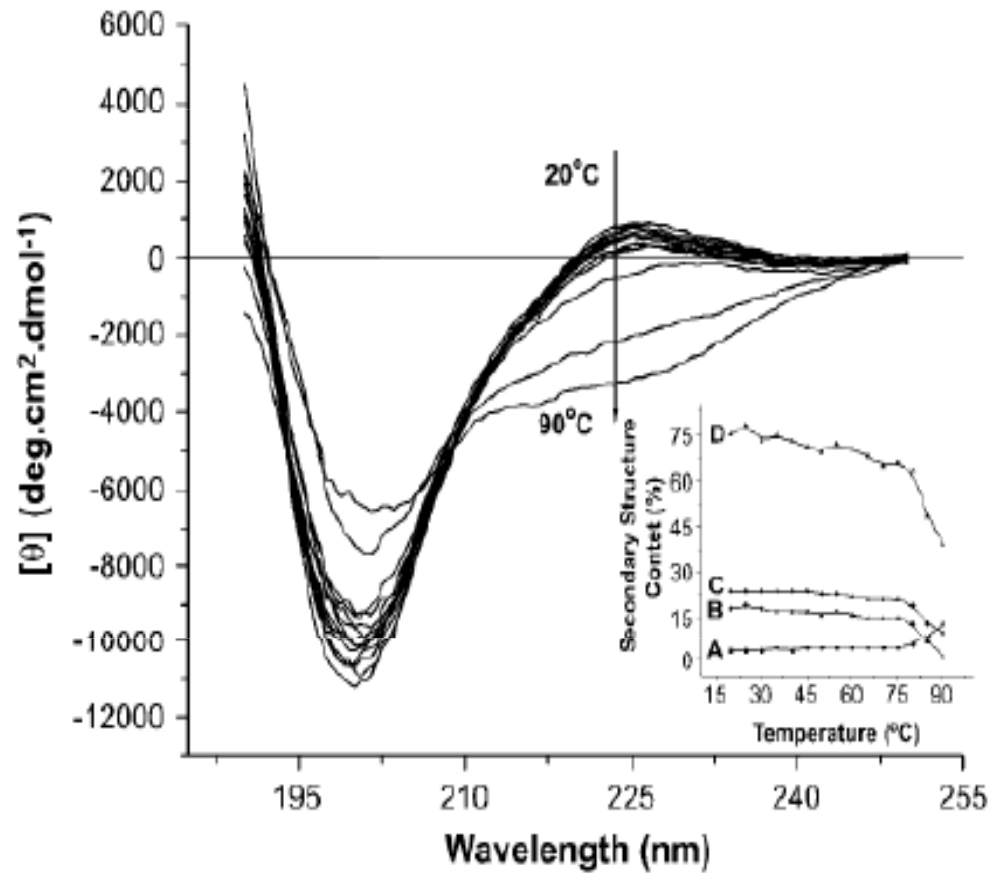
Rendezetlen (random coil)



Fehérjék vizsgálata Cirkuláris Dikroizmus spektroszkópiával

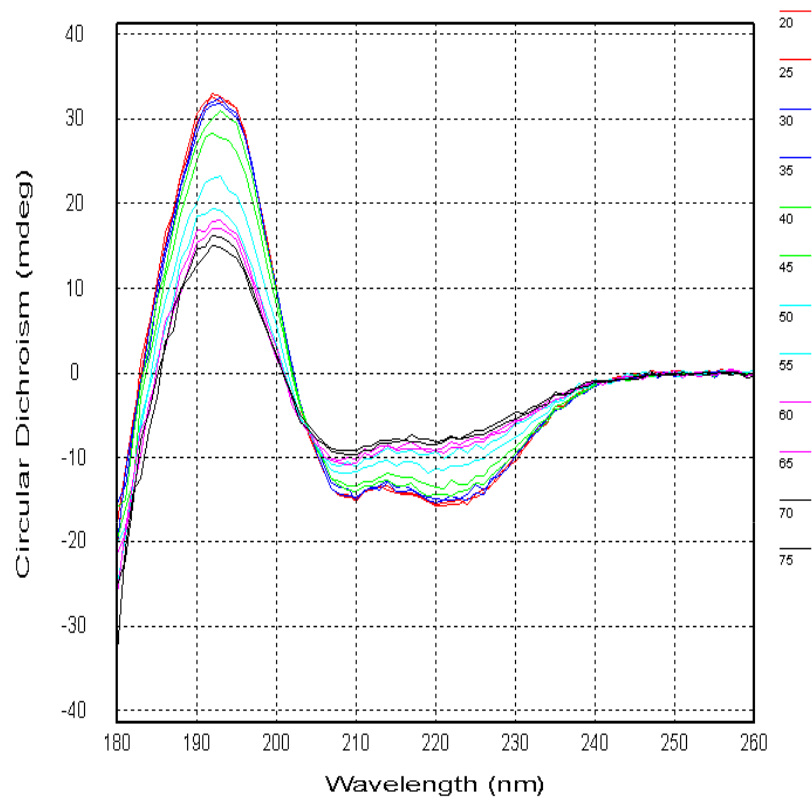
- Fehérjék másodlagos szerkezetének meghatározása (háttérkorrekció, NN alapú dekonvolúciós szoftverek)
- Oldószer, puffer hatásának vizsgálata (pH, ionerősség, sók, adalékok – preformulálás)
- Stabilitás vizsgálat
- Összehasonlító vizsgálatok
- Hőstabilitási vizsgálatok: „hőindukált unfolding” görbék felvétele

Hőstabilitás vizsgálat

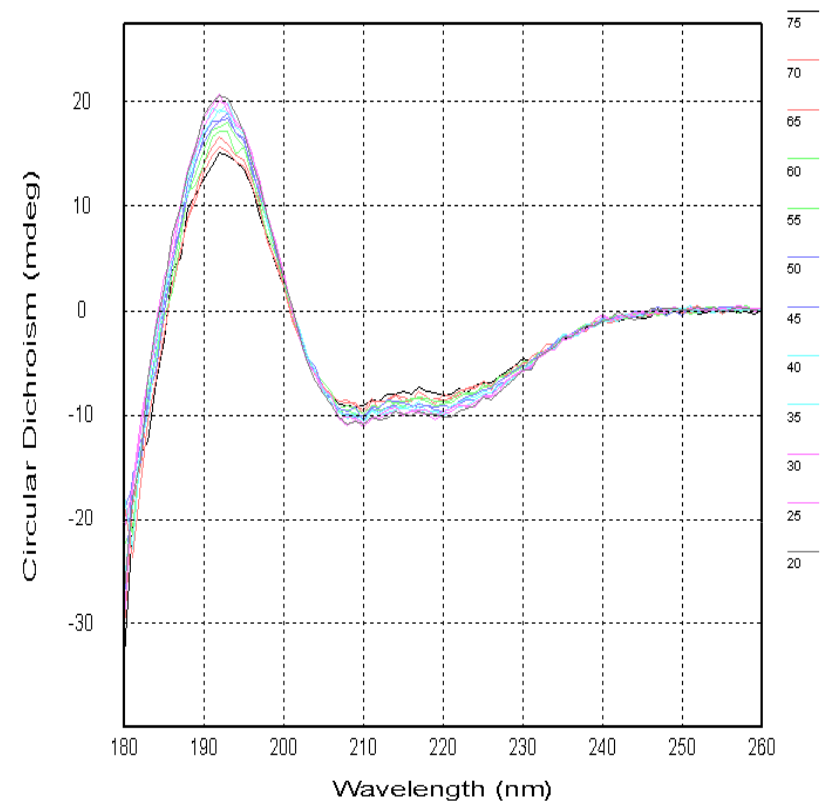


Kinetikai mérések

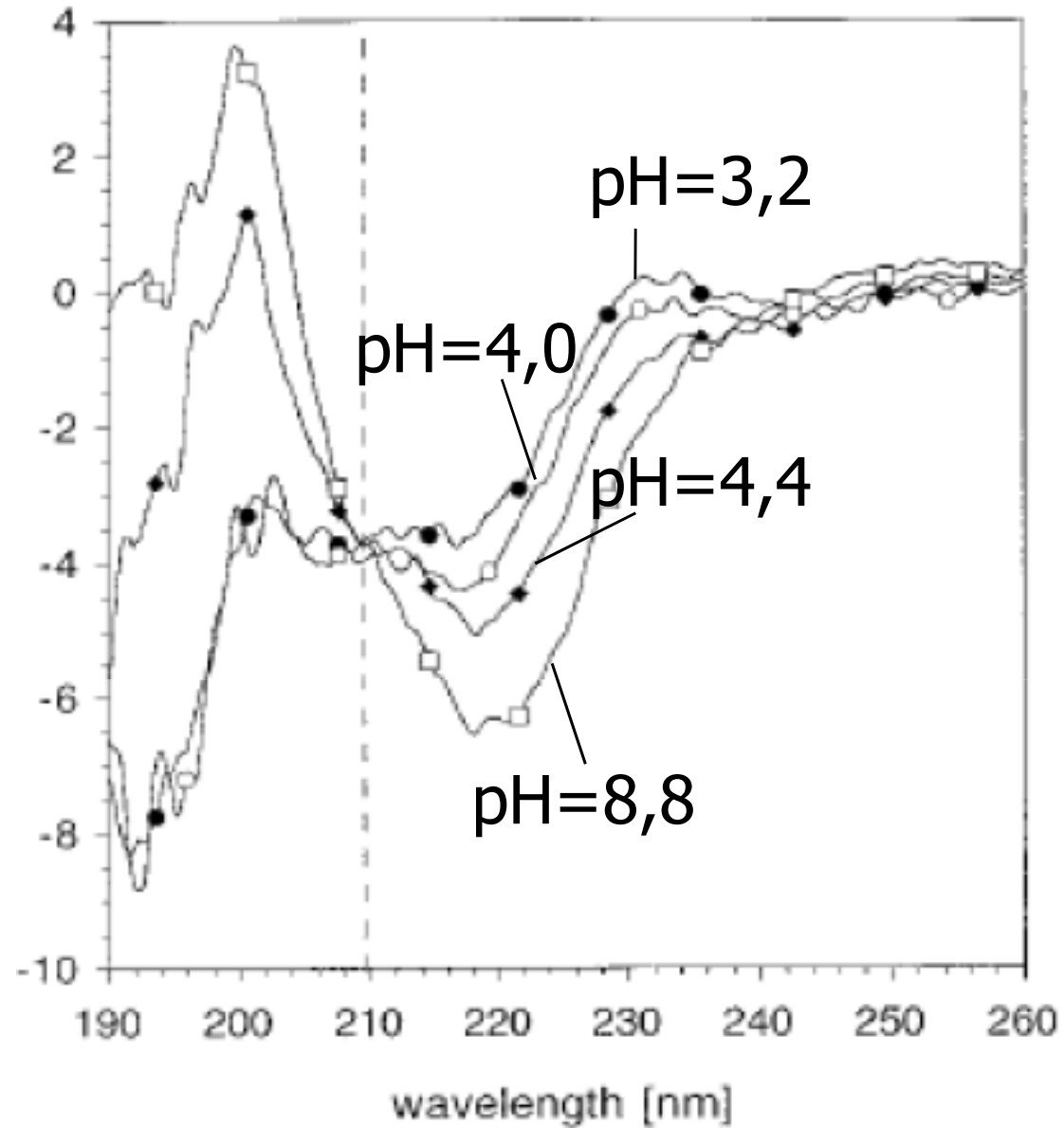
● Felfűtés



■ Lehűlés



Oldó közeg pH-jának hatása



Fluoreszcencia



Fluoreszcencia alapjai

Lumineszcencia: gerjesztett molekulák fényemissziója a hőmérsékleti sugárzáson kívül, „hideg emisszió”

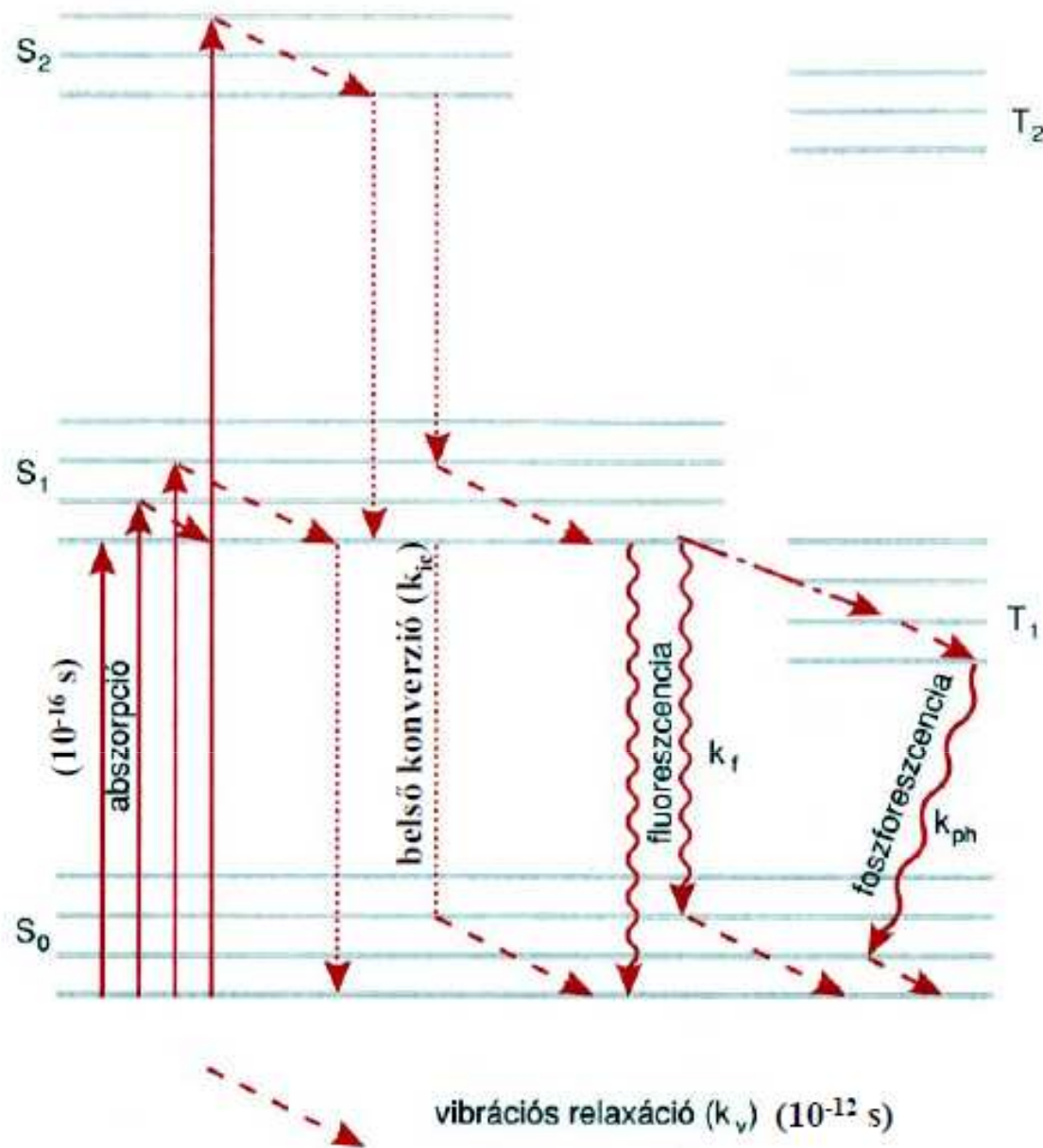
- Fluoreszcencia: szinglet-szinglet átmenet
- Foszforeszcencia: Triplet-szinglet átmenet („tiltott”)

•Gerjesztés módjai:

- fotonabszorpció (fotolumineszcencia)
- kémiai reakció (kemilumineszcencia)
- biokémiai reakció (biolumineszcencia)
- radioaktív bomlás energiája (radiolumineszcencia)

Lumineszkáló molekulák szerkezete: konjugált kettős kötések tartalmazó gyűrűkkel rendelkeznek

Jablonszki diagram



- **Vibrációs relaxáció:** a vibrációs energia hővé alakul
- **Kasha-szabály:** a fluoreszcencia emisszió az első gerjesztett állapot legalacsonyabb vibrációs szintjéről történik.
- **szinglet állapot (S):** minden e^- spinje párosított, eredő spin=0
- **triplet állapot (T):** két e^- spinje párosítatlan, eredő spin=1
- **fluoreszcencia:** nem jár spin-átfordulással, gyors (10^{-9} - 10^{-7} s)
- **Intersystem crossing (isc) és foszforeszcencia:** egy elektron spinje átfordul, „elsőrendben tiltott átmenet”, lassú (10^{-6} - 10 s)
- **belső konverzió:** sugárzásmentes átmenet

Fluoreszcencia alapegyenlete

$$I_F = I_0 * \Phi * \epsilon * l * c$$

I_F : kisugárzott fény intenzitása

I_0 : gerjesztő fény intenzitása

Φ : kvantumhasznosítási tényező

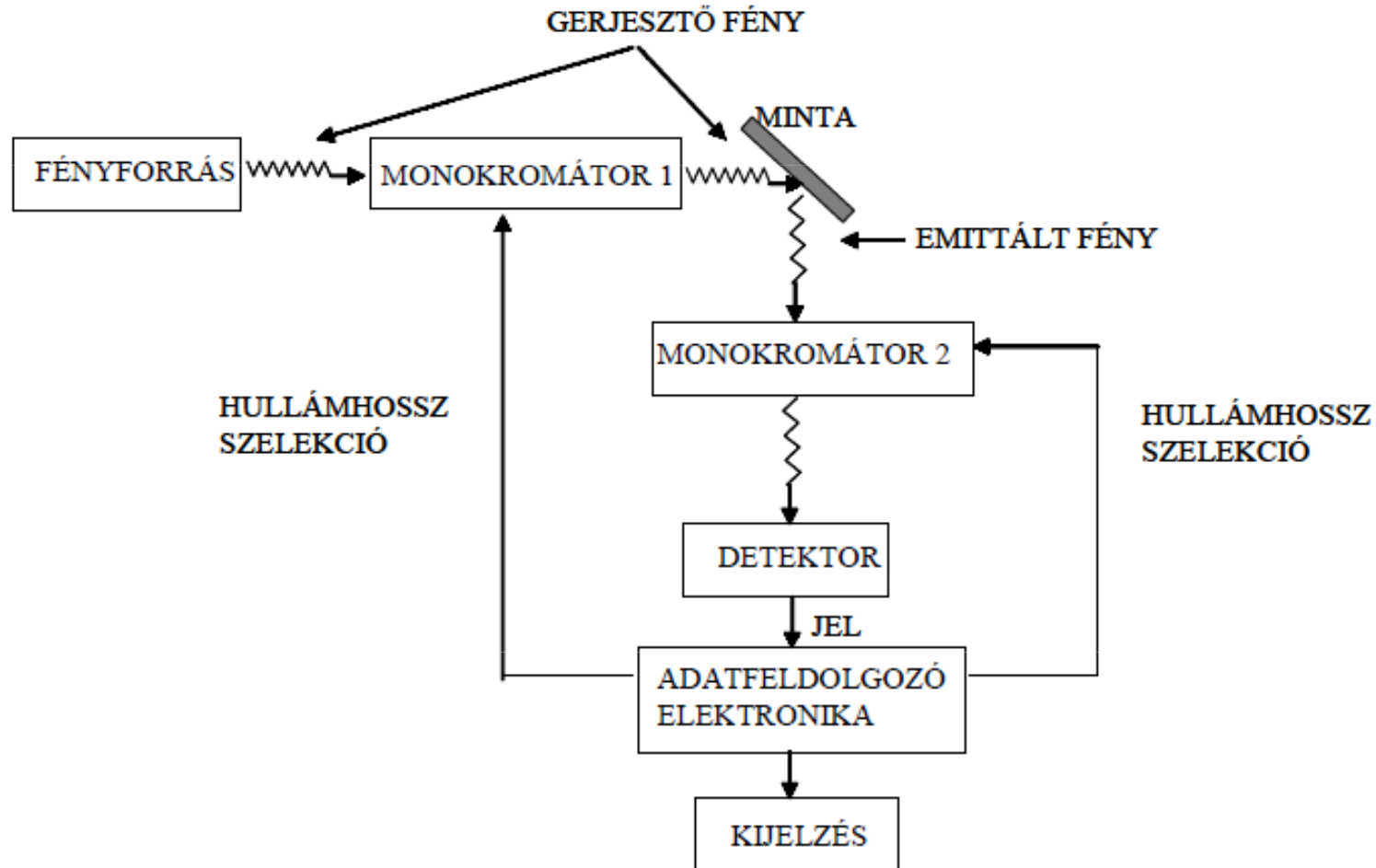
ϵ : moláris abszorpciós koefficiens ($\text{dm}^3 * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$)

l : rétegvastagság, fényút a mintában

c : komponens koncentrációja

Fluoreszcencia nagyban függ az oldószertől (quenching).

Fluoreszcens spektrofotométer felépítése



A gerjesztő és a kisugárzott fény detektálása egymásra merőleges elrendezésű.

Fluoreszcens fényforrások

- halogénlámpák (látható, közeli infravörös),
- xenonlámpák (látható, ultraibolya),
- deutérium lámpák (ultraibolya),
- hangolható **lézerek**, pl. festéklézer (látható);

Lézer Indukált Fluoreszcencia (LIF)

A gerjesztés általában Nitrogén (N_2) lézerrel, másrészt nitrogén lézerrel pumpált festéklézer segítségével történik.

A két gerjesztés közötti legfontosabb különbség, hogy amíg a nitrogén lézer egy önállóan működő ultraibolya lézer, addig a festéklézer gerjesztéséhez a nitrogénlézer szükséges. A festéklézeres mérésnél mindkét lézert alkalmazzuk.

LIF

Nitrogén lézer:

A nitrogén lézer a gázlézerek közé tartozik. A gázok energiaszintjeinek kiszélesedése jóval kisebb, mint a szilárd testekéi. A gázokat általában alacsony nyomáson használják, így az ütközés miatti kiszélesedés kicsi, és a vonalszélességet a Doppler kiszélesedés határozza meg. A gáz lézereket általában elektromos úton gerjesztik, nagy áram átvezetésével.

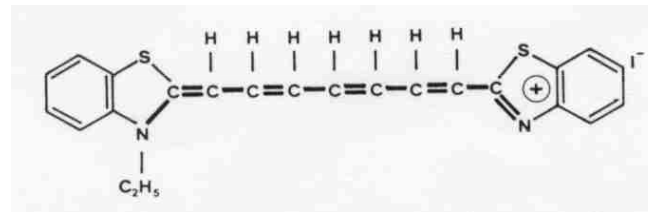
Festéklézer:

A festéklézer az egyetlen olyan jelentős lézer, amelynek lézer-aktív anyaga folyadék halmazállapotú. Az aktív anyag ebben az esetben egy olyan oldat, amelynél az oldott anyag szerves, az oldószer több fajta anyag lehet, például etilalkohol, metil-alkohol, víz, ... stb.

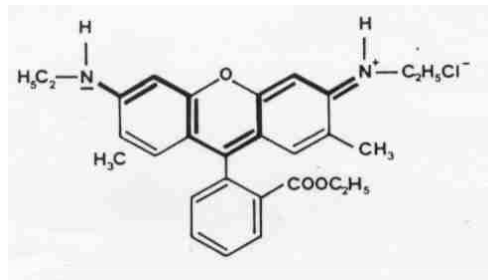
LIF

A lézerfestékek általában a következő osztályokba tartoznak:

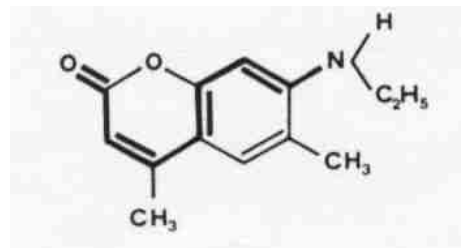
Polymethine festékek: Ezek a lézer oszcillációt vörös, vagy közeli infravörös tartományban produkálják.



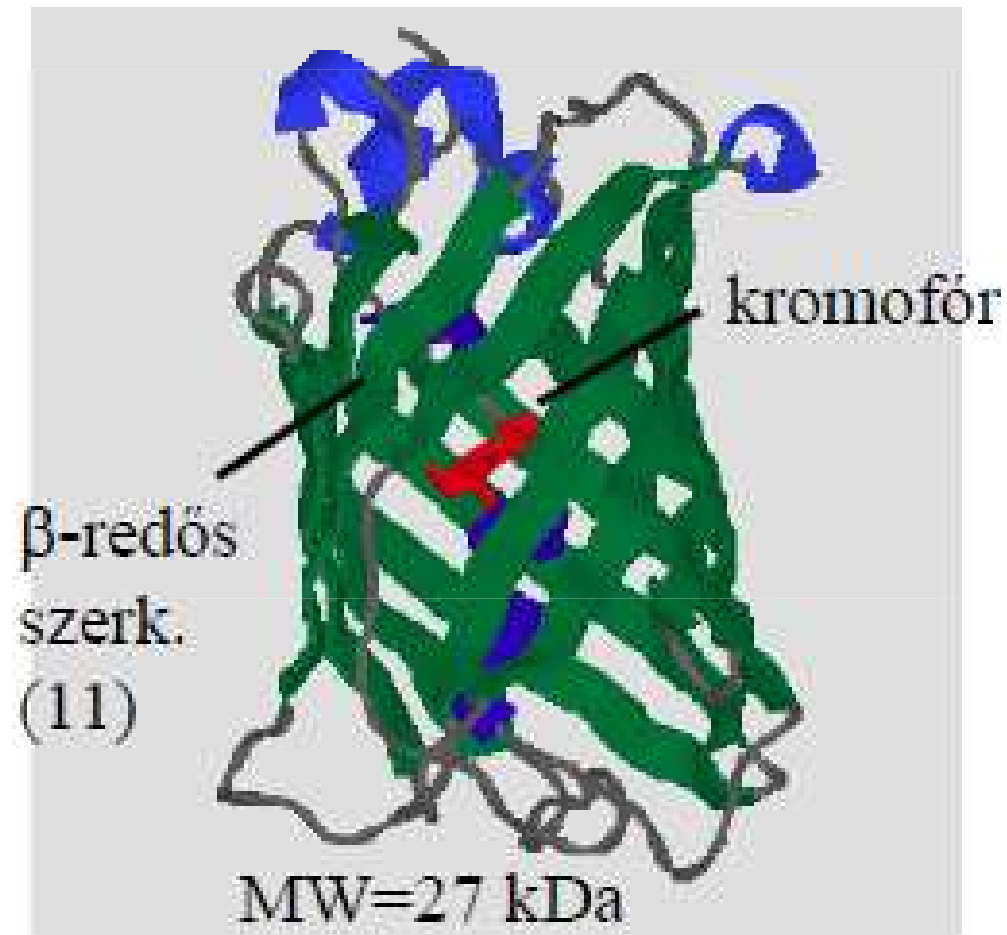
Xanthene festékek: Ezek a látható tartományban (500-700nm) működnek.



Coumarin festékek: A kék-zöld tartomány anyagai (400-500nm).



Fehérjék vizsgálata (saját fluoreszcencia)

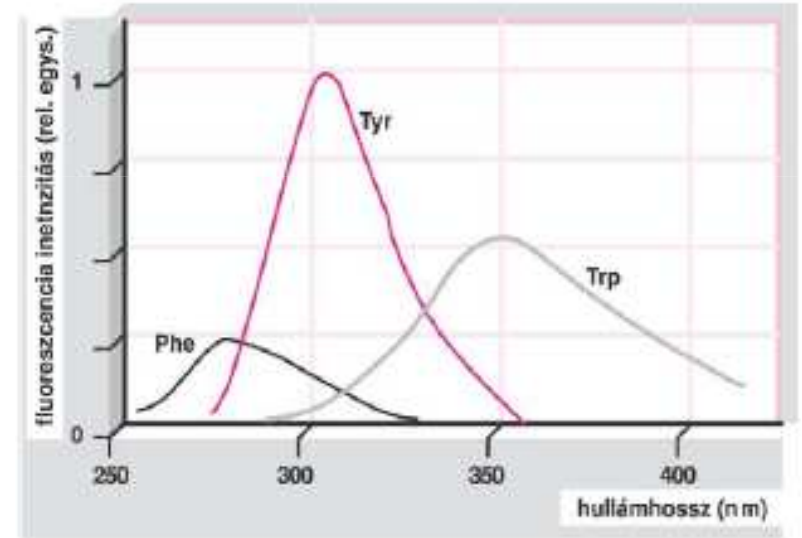


Fehérjék vizsgálata (saját fluoreszcencia)

Flourofór csoportot tartalmazó aminosavak:

Fenilalanin, tirozin, triptofán

A legkevésbé a fenilalanin gerjeszthető,
ezért a **tirozin/triptofán**-t szokták vizsgálni.

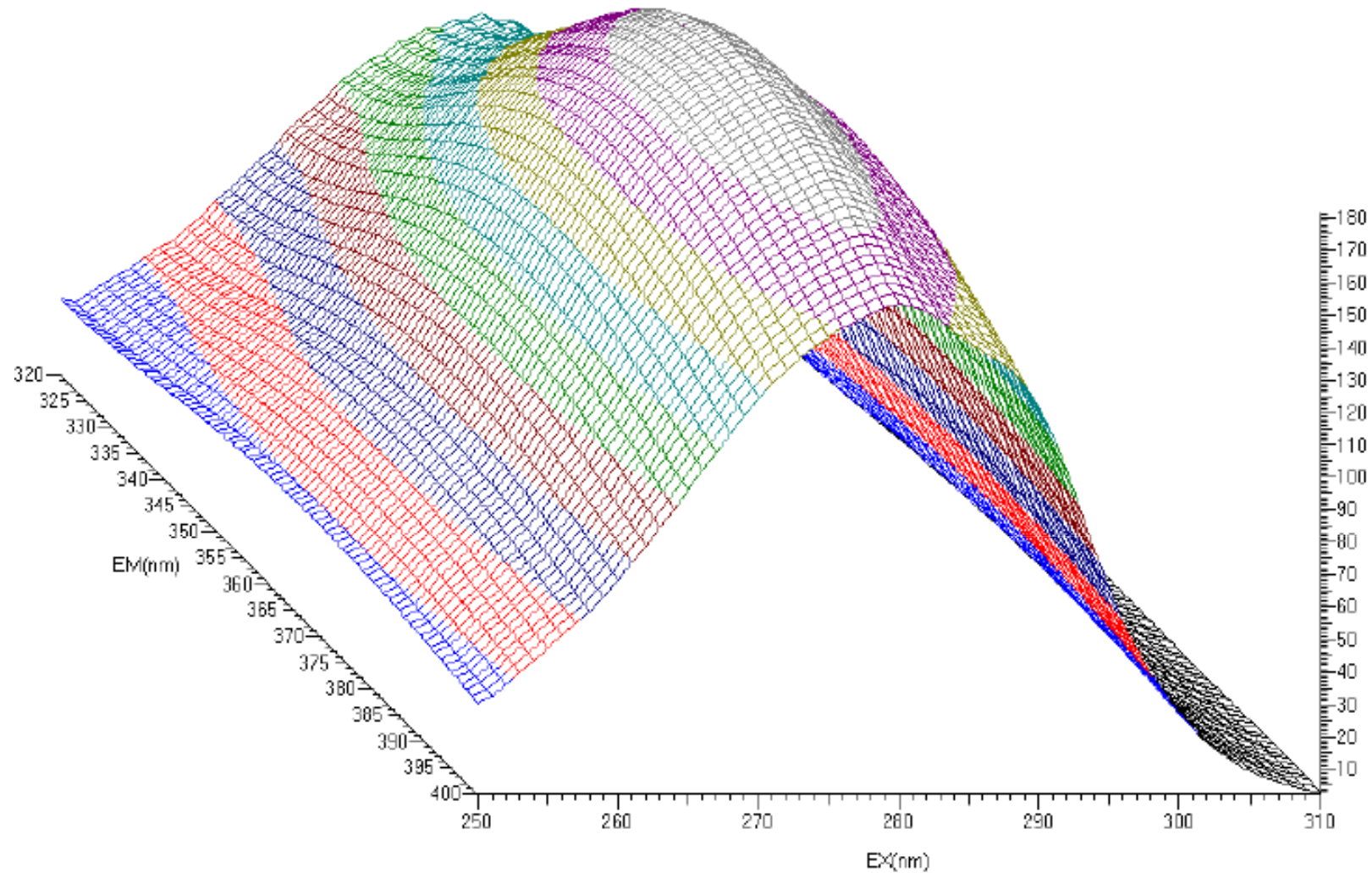


280 nm-en a tirozin és triptofán egyaránt gerjeszthető, míg **295 nm**-en a triptofán szelektíven sugározható be.

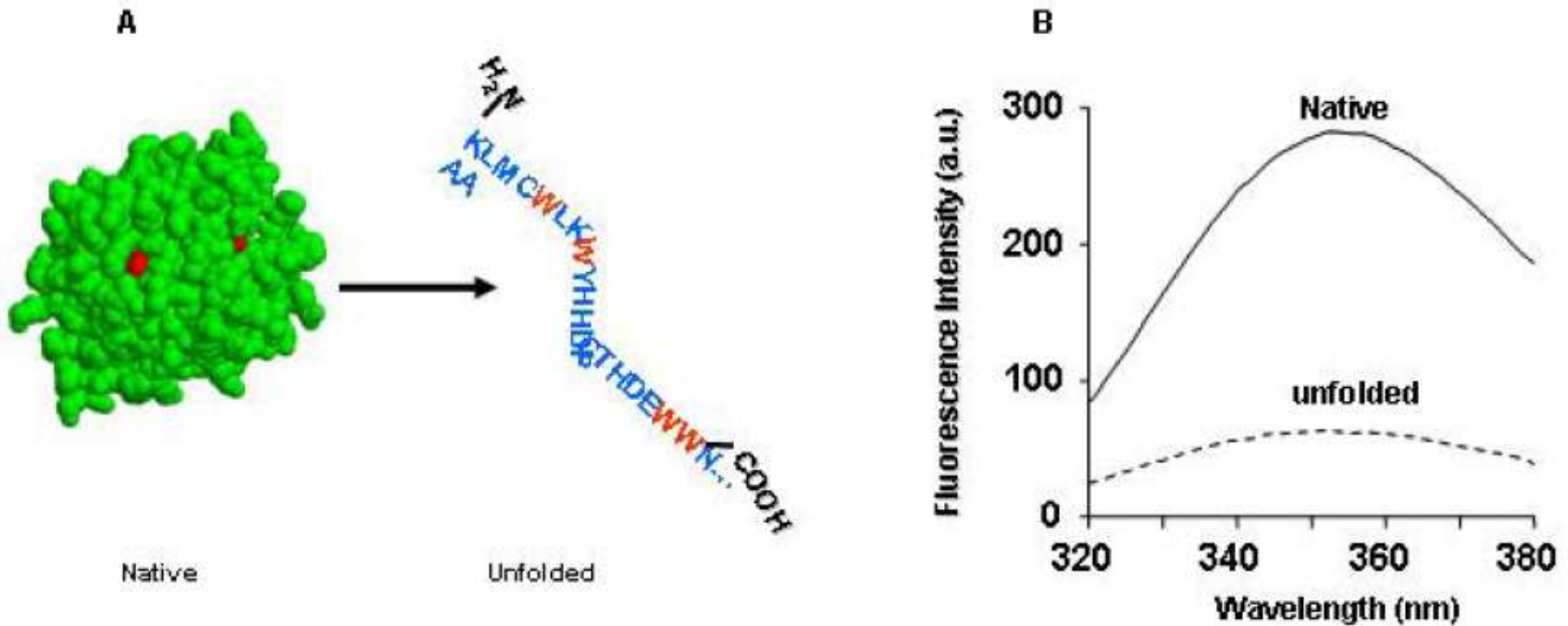
Oldószer hatás: hidrofil közegben csökken, hidrofób közegben nő az emittált fény intenzitása (hiper- és hipokrom eltolás).

Triptofánra jellemző az oldó közegtől függő erős Stokes eltolódás.

Triptofán fluoreszcencia



Harmadlagos szerkezet vizsgálata



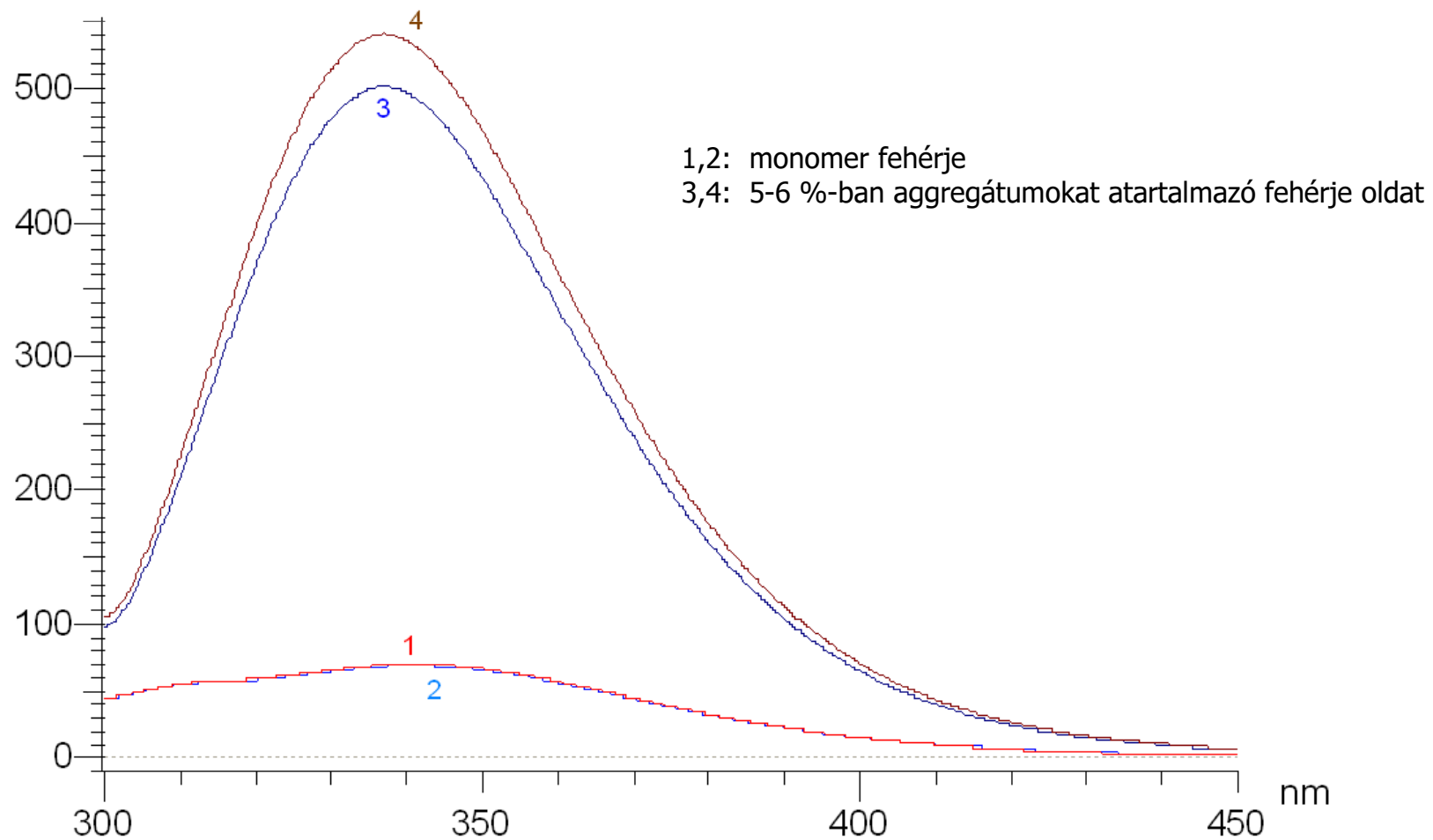
Fehérje aggregátumok vizsgálata

Besugárzási hullámhossz:

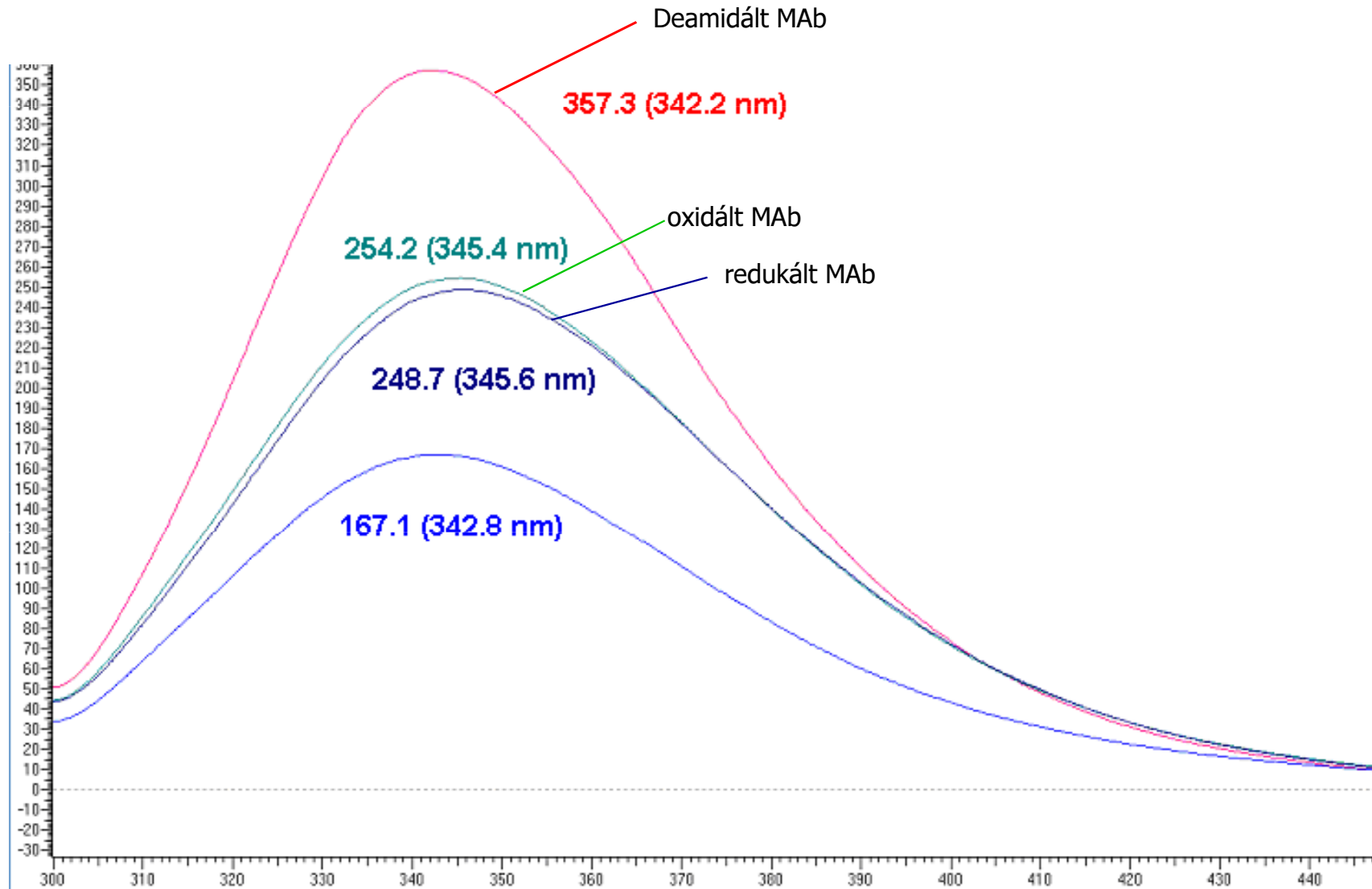
280 nm

Emissziós tartomány:

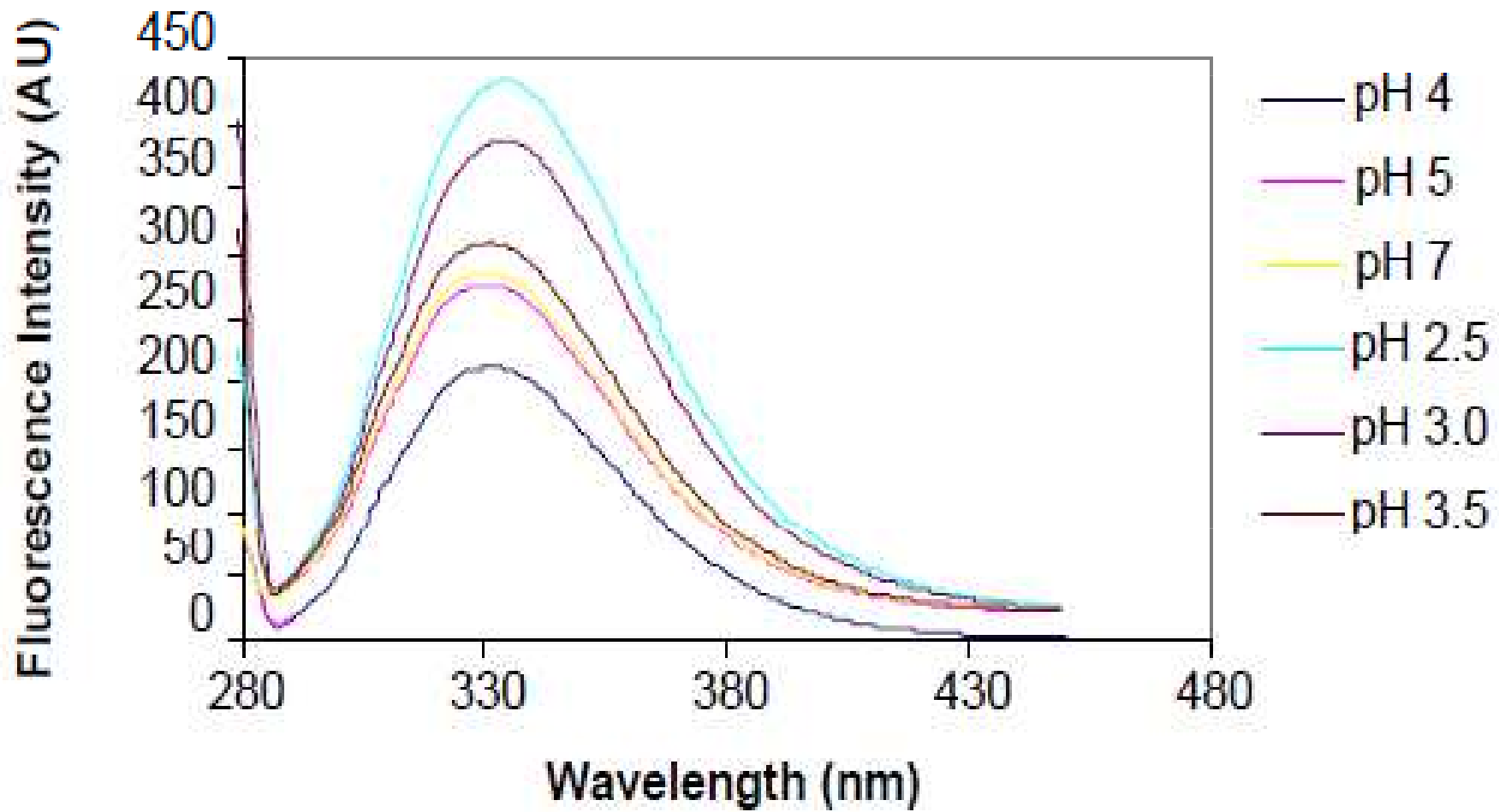
300 - 450 nm



Fehérje bomlási folyamatainak vizsgálata

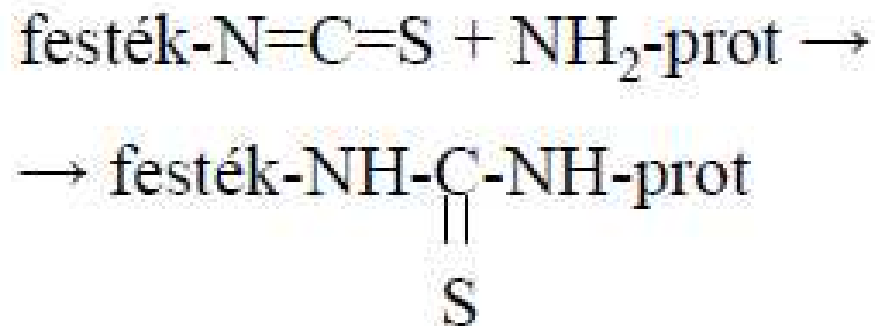
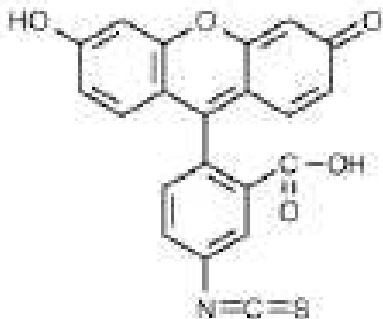


Harmadlagos szerkezet változása a pH függvényében



Fluoreszcens jelzések

Fehérjék direkt módosítása festékekkel: Lys, Arg oldalláncok amino (NH₂)-csoportja, Cys tiol (SH)-csoportja reaktív csoportot (izotiocianát, szukcinimidil észter, ill. maleimid) tartalmazó festékekkel jelölhető. Pl. FITC (fluoreszcein-izotiocianát), ANS (1-Anilidonaphthalene-8-sulfonic acid), Nílus vörös, Nílus kék ...



Fluoreszcens jelzések (adatbázisok)

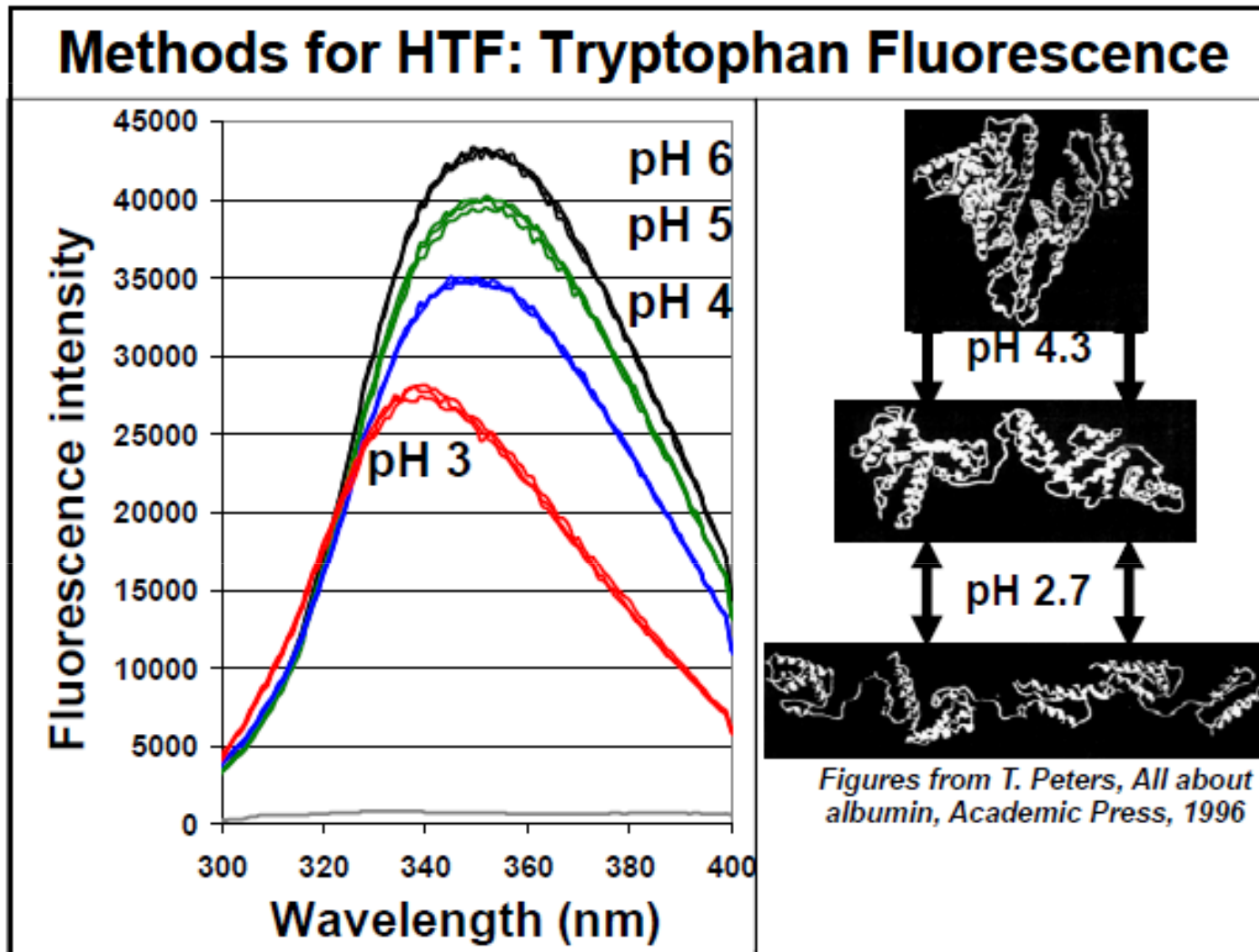
Sample Fluorescent Dyes <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Excitation <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Emission <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
→ 1,8-ANS (1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic acid)	375 nm	480 nm
→ 1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS)	375 nm	479 nm
→ 5-(and-6)-Carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein pH 9.0	504 nm	525 nm
→ 5-FAM pH 9.0	492 nm	518 nm
→ 5-ROX (5-Carboxy-X-rhodamine, triethylammonium salt)	578 nm	604 nm
→ 5-ROX pH 7.0	578 nm	604 nm
→ 5-TAMRA	549 nm	577 nm
→ 5-TAMRA pH 7.0	553 nm	576 nm
→ 5-TAMRA-MeOH	543 nm	567 nm
→ 6 JOE	520 nm	548 nm
→ 6,8-Difluoro-7-hydroxy-4-methylcoumarin pH 9.0	358 nm	450 nm
→ 6-Carboxyrhodamine 6G pH 7.0	526 nm	547 nm
→ 6-Carboxyrhodamine 6G, hydrochloride	525 nm	547 nm
→ 6-HEX, SE pH 9.0	534 nm	559 nm
→ 6-TET, SE pH 9.0	521 nm	542 nm
→ 7-Amino-4-methylcoumarin pH 7.0	346 nm	442 nm
→ 7-Hydroxy-4-methylcoumarin	360 nm	447 nm

Fluoreszcenciával kombinált technikák

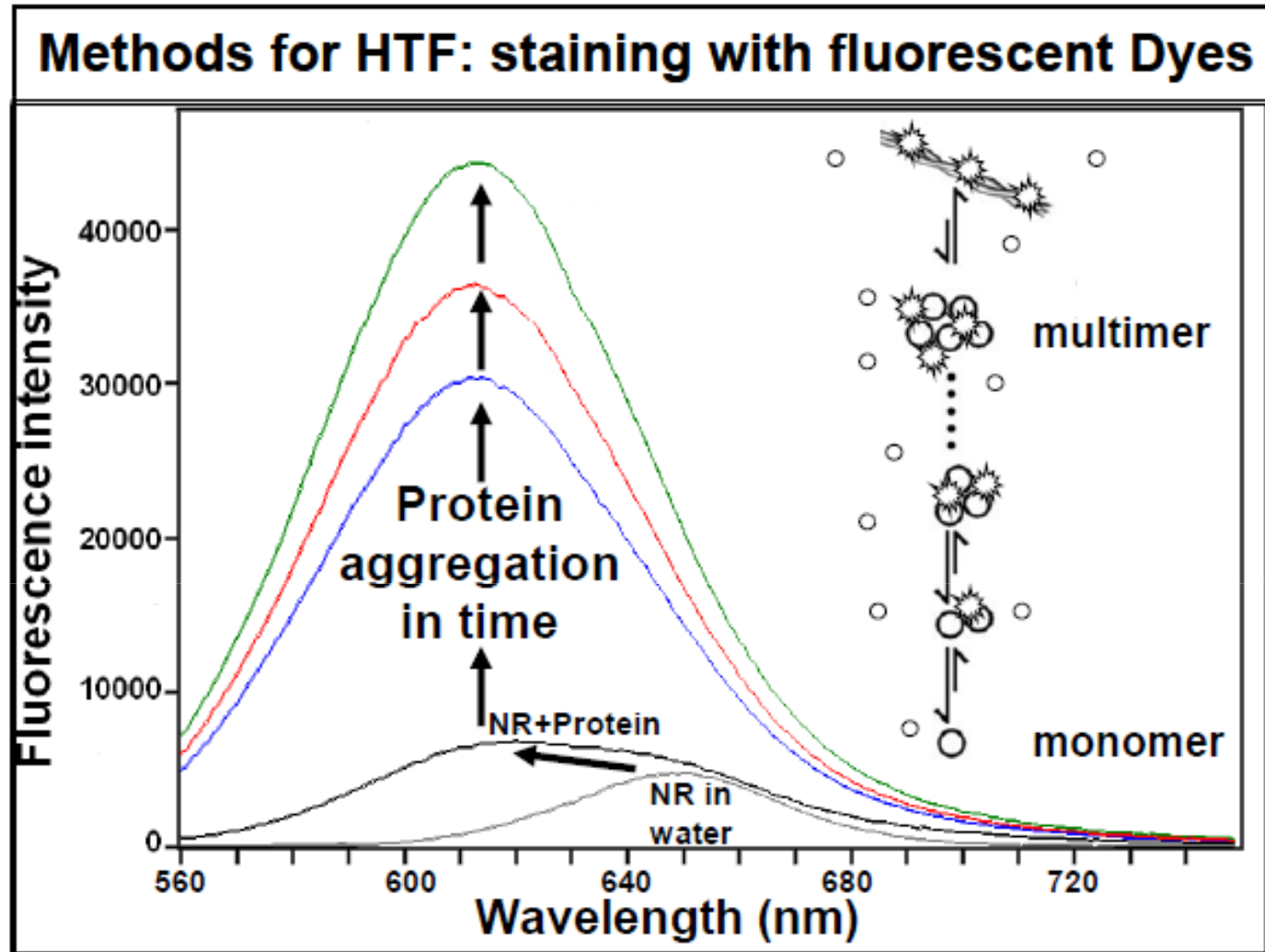
- UV abszorbancia
- Fényszórás
- Fluoreszcencia (saját és festés)



Fluoreszcenciával kombinált technikák



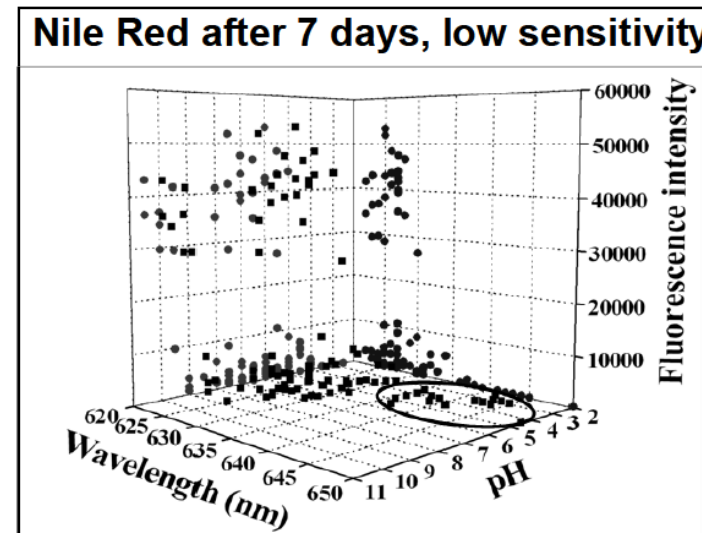
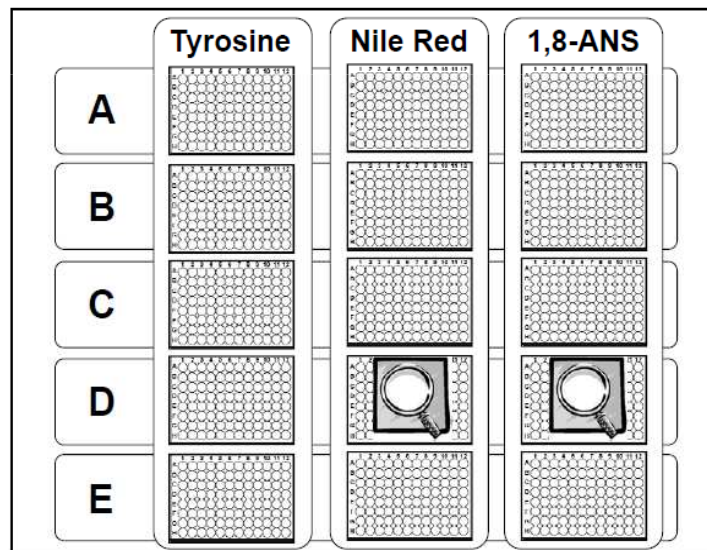
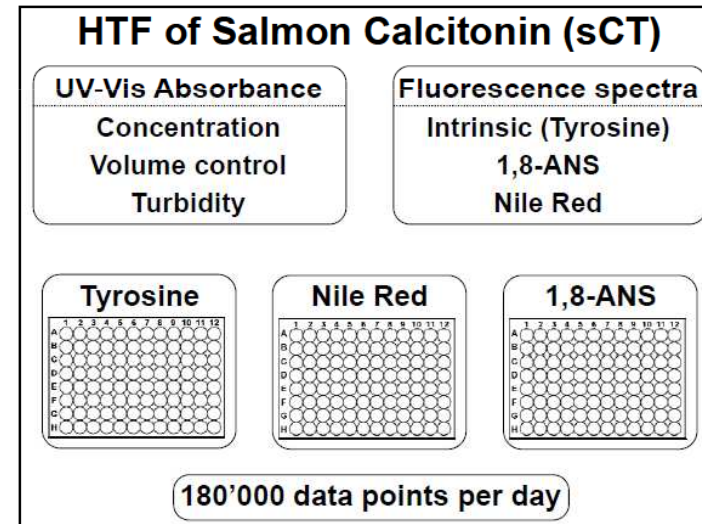
Fluoreszcenciával kombinált technikák



Fluoreszcenciával kombinált technikák

Fehérje formulálás kísérlettervezéssel

	pH									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Glycine-HCl	×	×	×							A
Citric Acid-NaCitrate	×	×	×	×	×	×				
Citric Acid-Na ₂ Phosphate	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
KPhtalate-NaOH			×	×	×	×				B
Succinic Acid-NaOH			×	×	×	×				
Ammonium Acetate-Acetic Acid			×	×	×	×				
Histidine-HCl				×	×	×	×	×	×	
Na Acetate-Acetic Acid		×	×	×	×	×				C
DimethGlutaric Acid-NaOH		×	×	×	×	×	×	×	×	
Tris-Maleate					×	×	×	×	×	
Na Phosphate					×	×	×	×		D
ADA-HCl					×	×	×	×	×	
Citric Acid-K ₂ Phosphate	×	×	×	×	×	×	×	×		
MOPS-KOH					×	×	×	×	×	
HEPES-NaOH						×	×	×		E
TES-HCl						×	×	×	×	
Tris-HCl						×	×	×	×	
Glycine-NaOH							×	×	×	
CAPSO-NaOH								×	×	
NaCarbonate-Bicarbonate								×	×	
								×	×	



Fluoreszcenciával kombinált technikák

- Fényszórás (aggregátumok vizsgálata)
- Fluoreszcencia (saját, szerkezet)

- Dinamikus mérések (30 – 95 °C)
- Kis mintaigény (ultra-low volume 1-8 μ l)
- 48 mintahely
- Automatizált adatgyűjtés
- Automatizált adat feldolgozás
- Kombinált értékelés

(pl. olvadáspont meghatározás fényszórásból és fluoreszcens intenzitásból együtt.)



