

# FÜGGELÉK

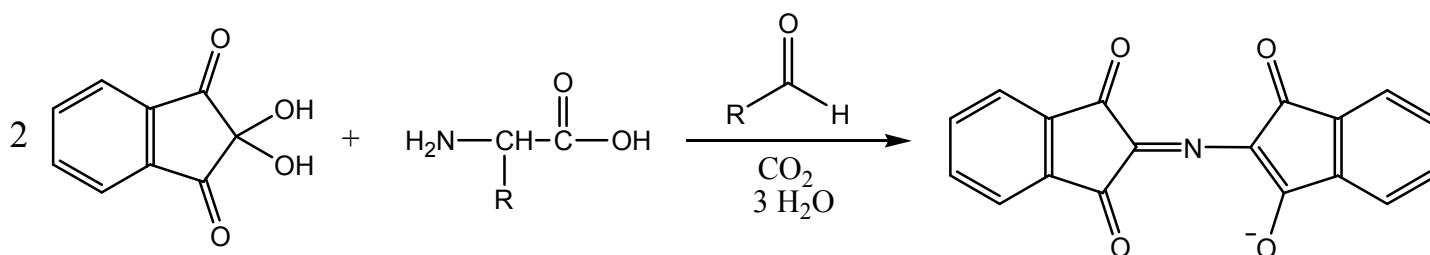
## 1. számú függelék: protokollok

### 1.a.) Szilárdfázisú peptidszintézis, Fmoc/tBu stratégia

A szintézis megkezdése előtt a gyantát megfelelő oldószerben duzzasztani kell, hogy a rajta lévő összes funkciós-csoport hozzáférhetővé váljon. Az egyes aminosavak felkapcsolásakor az alábbi lépéseket kell elvégezni:

1. A gyanta mosása 3-szor 0,5-1 percig DMF-fel.
2. A gyantán lévő aminosav Fmoc védőcsoportjának lehasítása 2% piperidin + 2% DBU/DMF elegyével, 2+2+5+10 perc. (A DBU a hasítószer, a piperidin a felszabaduló dibenzofulvén megkötője.)
3. A gyanta mosása 8-szor 0,5-1 percig DMF-fel.
4. A szekvenciában következő Fmoc-védett aminosav felkapcsolása DIC/HOBt elegyével DMF-ben, 60 perc alatt. (Minden reagensből a gyantakapacitás 3×-os mennyiségét kell alkalmazni.)
5. A gyanta mosása 2-szer 0,5-1 percig DMF-fel.
6. A gyanta mosása 2-szer 0,5-1 percig DCM-mel.
7. Ninhidrines detektálás a kapcsolás sikerességének ellenőrzésére. Ha a teszt eredménye megfelelő (sárga szín), akkor az 1.), ha nem (kék szín), akkor a 4.) ponthoz kell visszatérni.

A ninhidrin (2,2-Dihydroxyindane-1,3-dione) a szabad aminosavakkal képes reakcióba lépni. A keletkező vegyület (Ruhemann-bíbor) kék színű ( $\lambda=570$  nm). Ha a kapcsolás nem volt megfelelő, a gyantán lévő aminosavak szabad  $-NH_2$ -csoportját indikálja a ninhidrin. Kivételt képez ez alól a prolin, annál ugyanis pozitív ninhidrin-teszt esetén is sárga színt kapunk. Ilyenkor egy másik (ún. Isatin-tesztet) kell alkalmazni.



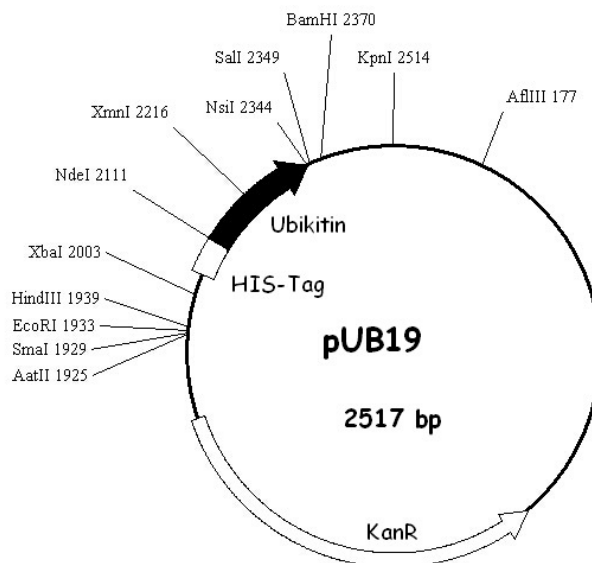
1. ábra: a ninhidrines detektálás reakcióegyenlete

## 1.b.) A génexpresszió DNS-munkájának eljárásai

Az exendin-5 előállításánál BL21 Star pLysS (DE3) típusú kompetens *E. Coli* sejtvonalat alkalmaztam. Ezek úgynevezett pET vektort tartalmaznak, melynek részletezésére, illetve az expresszió szabályozásának pontos molekuláris hátterére jelen dolgozatomban nem térek ki.

### Az exendin-4 expressziós vektora

Az exendin-4 génjét egy 2517 bázispárnyi pET-17 eredetű pUBK vektorral transzformáltam a bakteriális sejtvonalba. Az eredeti plazmid replikációs origóját kicserélték egy nagy kópiaszámú pUC origóra (hogy minél könnyebb legyen felszaporítani a rekombináns DNS-t), Ampicilin rezisztencia-génjét pedig Kanamycinre. A klónozó régió az NsiI és BamHI hasító helyek közti szakasz. A plazmidba eleve be volt építve a fúziós partnert (ubikvitin) kódoló élesztő eredetű cDNS (RNS-szárlól reverz transzkriptáz enzimmal készült DNS átírat), valamint a fehérje tisztításhoz szükséges hisztidin affinitás-címke bázisszekvenciája.



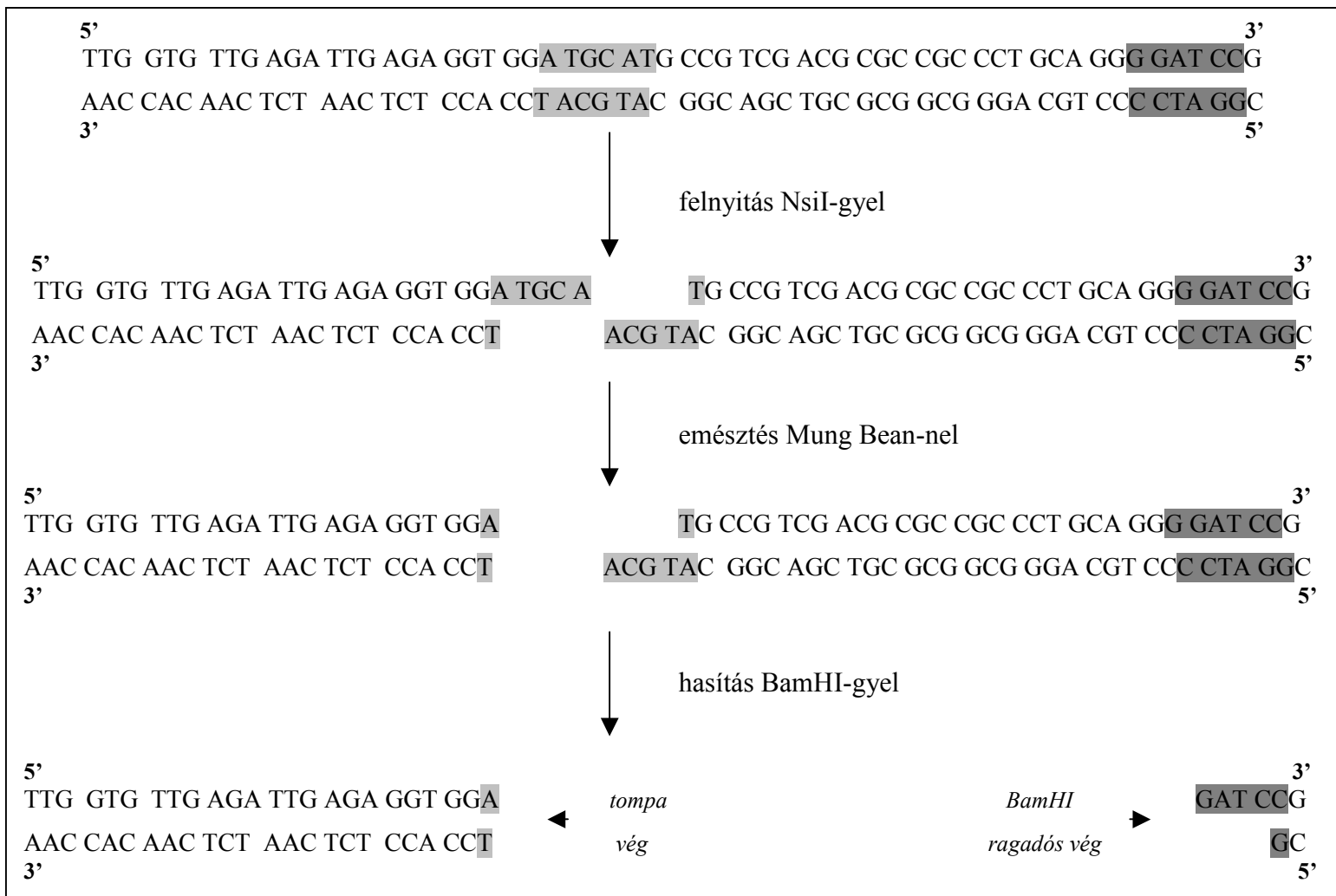
2. ábra: a pUB19 vektor térképe

							NsiI		Sall										BamHI		
2331	TTG	GTG	TTG	AGA	TTG	AGA	GGT	GGA	TGC	ATG	CCG	TCG	ACG	CGC	CGC	CCT	GCA	GGG	GAT	CCG	
776	L	V	L	R	L	R	G	G	▲	C	M	P	S	T	R	R	P	A	G	D	P
	YUH felismerő hely								hasítás helye												

3. ábra: a vektor klónozó régiója

## A vektor előkészítése

Először a pUBK vektort készítettem elő, hogy beligálhasam az exendin-4 génjét. Első lépésként NsiI restriktós enzimmel felnyitottam (protokoll: 4.sz. függelék), majd az így kialakult 3' túlnyúló végeket Mung Bean exonukleázzal emésztettem. Az inszert 3' végének fogadására alkalmas helyet BamHI-gyel alakítottam ki.



4. ábra: a vektor előkészítésének lépései

A DNS-t az egyes emésztési lépések után QUIAGEN *PCR Kit*-tel tisztítottam (az enzimektől, valamint a kisebb nukleinsav fragmensektől). Az izolálás / tisztítás alapja, hogy a DNS-molekula kaotróp\* sók jelenlétében rögzíthető egy szilika membránon, a fehérjék és a kis nukleinsav-fragmensek azonban nem kötődnek. Utóbbiak mosási lépésekkel eltávolíthatók, a DNS pedig eluálható, ha megváltoztatjuk (lecsökkentjük) az ionerősséget. Az emésztések eredményességét agaróz gélelektroforézissel (1%-os töménységű agaróz gélen)

ellenőriztem. Az utolsó hasítási lépésnél a teljes mintát megfutattam, majd az előkészített plazmidot gélből izoláltam (*Viogene Gel Advanced Gel Extraction System Kit*). A gél feloldása lúgos pufferben történt, a tisztítás a gyártó által megadott protokoll szerint zajlott.

### **Az inszert előkészítése**

Az exendin-4 génjét tartalmazó pZErO-2 (*Integrated DNA Technologies Inc*) minigént első lépésben EcoRI\*-gyel nyitottam fel, majd a túlnyúló nukleotidokat Mung Bean exonukleázzal emésztettem. A 3' véget BamHI-gyel alakítottam ki.

A vektor-inszert illesztés tehát egy tompa és egy BamHI ragadós véggel történt. Tompa véget ott alkalmaztam, ahol a két fúziós partner (UBK-EX4) bázisszekvenciája összeér. Így megvalósítható, hogy az ubikvitin C-terminálisa után rögtön az exendin-4 első aminosava következzen.

### **Az EX4-pUBK konstrukció kialakítása**

A megfelelően előkészített vektort és inszertet a T4 ligáz enzim segítségével kapcsoltam (időtartam ~1,5 óra). A ligátum egy részét DH5 $\alpha$  kompetens klónozó sejtvonalba juttattam, hogy a célgént tartalmazó plazmidot felszaporíthassam. A transzformálást követően a sejteket Kanamycines lemezre szélesztettem, és inkubáltam egész éjszakán keresztül 37°C-on. Reggelre azok a telepek nőnek fel, melyek felvették a vektort, így tartalmazták az antibiotikum-rezisztencia gént.

A telepek ellenőrzését PCR-rel végeztem. A PCR reakcióhoz (3.sz. függelék) *Taq* polimerázt és az inszertre specifikus primereket alkalmaztam. Negatív kontrollként üres vektort vizsgáltam. A PCR terméket agaróz gélen futtattam (3.sz. függelék), mely 2%-os töménységű volt. A koncentráltabb gél alkalmazása ebben az esetben azért fontos, mert a beépített inszert csak kevéssé növeli meg a plazmid méretét, így nagyobb felbontás szükséges az üres- és rekombináns vektor közötti tökéletes különbségtételhez. Az előzőleg gondosan megjelölt, és a pozitív eredményt adó telepek közül 5-ből monoklonáris folyadékkultúrát indítottam. 3 ml LB táptalajban – mely 10 mg/l koncentrációban tartalmaz antibiotikumot – ON 37 °C-on rázatva növesztettem a sejteket.

Másnap miniprepet készítettem (*Viogene Mini Plus Plazmid Extraction Kit*), azaz kinyertem a felszaporított rekombináns plazmidot a DH5 $\alpha$  sejtekből. Ezt a gyártó által megadott protokoll szerint, a végeztem. A művelet során először egy RNáz is tartalmazó

natív pufferrel mostam a sejteket, majd lúgos SDS-es közegben dezintegráltam membránjukat. Ennél a lépésnél csak igen óvatosan szabad a rendszert mozgatni. Tilos szuszpendálni vagy Vortex-elni, ekkor ugyanis a genomi DNS fragmentálódna, és a következő kálium-acetátos kezeléskor nem maradna benne a kicsapódó fehérjék aggregátumában. A  $\text{CH}_3\text{COOK}$ -t tartalmazó puffer hatására ugyanis sejtalkotók jelentős része az Eppendorf-cső alján csapadékként gyűlik össze, melyről lepipetázható a plazmidot tartalmazó felülúszó. A kisméretű cirkuláris DNS-ek egy szilika membránon rögzíthetők, ezen mosható, majd eluálható. Az egyes mosási lépések oldatainak eltávolítását rövid ideig (~30 mp) tartó centrifugálással végeztem.

A DNS tisztaságát agaróz gélelektroforézissel (1%-os gélen), majd PCR-rel ellenőriztem. Ekkor egy vektor- és egy inszert-specifikus primert használtam, mellyel a ligálás megfelelő irányát is vizsgáltam. A pozitív eredményt adó DNS-eket megszekvenáltattam (3.sz. függelék), hogy megbizonyosodjak róla, nem következett-e be a korábbi lépések során valamikor pontmutáció, vagy leolvasási keret eltolódás („frame shift”). A szekvenálást a Biomi Kft. gödöllői laboratóriumában végezték.

Ha semmilyen mutációra utaló jel nincs, kezdetét veheti a fehérje munka a sejtekkel. Ehhez ún. expressziós sejtvonalba (pl. BL21) kell a rekombináns plazmidot transzformálni.

## **Kompetens sejt készítés**

Ahhoz, hogy egy sejtvonala nagy hatékonysággal legyen képes plazmidot felvenni, az alábbi módon kell kezelni őket. A kompetens sejt készítésének kulcsa, hogy végig steril körülmények közt dolgozzuk, az egyes lépések időtartamának pontos betartásával. Fontos, hogy elkerüljük a rendszer felmelegedését (jeges hűtés), valamint az, hogy a sejtek szuszpendálását óvatosan végezzük.

-78 °C-on tárolt glicerines stock-ból egy agar lemezre kenünk ki sejteket, majd inkubáljuk ON 37 °C-on. A másnapra felnőtt telepek közül egyet pipetta-heggyel leoltunk 3 ml LB táptalajba, majd növesztjük 12 órán át (37 °C, rázatás). (megjegyzés: Érdeemes egyszerre több kicsi folyadékkultúrát indítani, de mindegyikbe csak egyetlen telepet oltsunk, így kaphatunk monoklonális sejtvonalat.)

Az előzőleg elkészített telített kultúra 500  $\mu\text{l}$ -ét hozzáadjuk 100 ml LB táptalajhoz, inkubáljuk 37 °C-on, rázatás közben). A sejtek szaporodását optikai denzitás-méréssel követjük, majd  $\text{OD}_{600} = 0,4$ -nél leállítjuk a növesztést. A kultúrát 5-10 percre jégbe állítjuk.

A sejtsuszpenziót steril Falcon-csőben lecentrifugáljuk 4 °C-on, 4000 rpm-en, 10 perc alatt. A felülúszót elöntjük, a pelletet 25 ml jéghideg 0,1 M-os MgCl<sub>2</sub> oldatban felszuszpendáljuk. 20 perc jégen való inkubálást követően ismét lefugáljuk, majd 5 ml 0,1 M-os CaCl<sub>2</sub>-ban vesszük fel a sejteket. 1 óra jeges hűtés után, hozzáadunk annyi 80%-os glicerint, hogy a végkoncentráció 20% legyen. A suszpenziót 200 µl-enként steril eppendorf-csövekbe aliquot-oljuk, folyékony nitrogénben hirtelen lefagyasztjuk, és -78 °C-on tároljuk.

A CaCl<sub>2</sub>-os kezelés hatására a sejtek membránján pórusok nyílnak meg, melyek segítik a hatékony vektor felvételt. A steril glicerin hozzáadása, valamint a gyors hűtés azért szükséges, hogy a citoplazma víztartalmának kifagyásakor ne képződjenek a rendszerben tükristályok, melyek kilyuggatnák a sejtek membránját.

### Restriktációs emésztés

A plazmidok restriktációs endonukleázokkal történő hasítása 37°C-on, min. 1 órán át, de lehet ON is, az alábbi összetételű reakcióelegyben (20 µl végtérfogatban) zajlik:

- 12 µl desztillált víz
- 5 µl plazmid
- 2 µl puffer
- 1 µl restriktációs enzim

### Az alkalmazott resriktációs enzimek hasítóhelyei

EcoRI: *Escherichia coli* R-törzséből izolált restriktációs endonukleáz

felismerőhelye: 5' GAATTC	hasítása: 5' ---G	AATTC-- 3'
3' CTTAAG	3' ---CTTAA	G---5'

Mung Bean: A mungó bab (*Vigna radiata*) növényből izolált enxonukleáz. Kizárólag az egyszálú DNS-t / RNS-t képes hasítani 5'-nukleotid-monofoszfátokat eredményezve. A géntechnológiai gyakorlatban túlnyúló végek leemésztésére használatos.

NdeI: a *Neisseria denitrificans* baktériumfajból izolált restriktációs endonukleáz

felismerőhelye: 5' CATATG	hasítása: 5' ---CA	TATG--- 3'
3' GTATAC	3' ---GTAT	AC---5'





A DNS molekulák szeparálásához használt 1%-os agaróz gélek készítése és futtatása 1×-es TAE (tris-acetát-EDTA) oldattal, a 2%-osoké 0,5 ×-es TBE (tris-borát-EDTA) pufferrel zajlik. Az oldatokba bemérjük a kívánt koncentrációnak megfelelő mennyiségű agarózt, majd melegítve feloldjuk. 10000-szeres hígításban hozzáadjuk az előhívó festéket is, majd a „kádba” kiöntve hagyjuk megszilárdulni.

A minták felvitele a gélben kialakított zsebekbe történik, a megfelelő DNS-kezelő hozzáadása után. A DNS-kezelő glicerint (sűrűség-növelő ágens, hogy a zsebek aljára süllyedjen a minta) és a brómfenolkéket tartalmaz, mellyel a futás frontját lehet láthatóvá tenni (negatív töltésű és kis molekulájú, így gyorsan halad az anód felé). Nincs benne viszont semmilyen denaturáló hatású vegyületet, így az agaróz gélelővel elválasztott makromolekulákkal – gélből való izolálást követően – tovább lehet dolgozni. A vizsgált molekulák méretének meghatározásához marker létrát is futtatunk a gélen, ami ismert számú bázisból álló DNS fragmentumok elegye.

Az elválasztás alapja az, hogy a negatív töltéssel rendelkező nukleinsav molekulák a pozitív anód felé mozognak elektromos erőterben (100-200 kV). A vándorlást befolyásolja a DNS mérete (a bázispárok számának 10-es alapú logaritmusával fordítottan arányos az elektroforetikus mobilitás), annak konformációja, a gél koncentrációja, az alkalmazott feszültség nagysága és a futató puffer ionerőssége. Cirkuláris DNS (plazmidok) esetén, elválás nemcsak méret, hanem alakfüggő is - egy molekulára is két egymáshoz közeli sávot kapunk, melyek megfelelnek a kitekert és az ún. „super coiled” (a DNS molekula maximális feltekeredettsége) állapotnak.

A detektálás alapja a gélben lévő interkaláló (a DNS bázisai közé beékelődő) fluoreszcens festék. Régebben erre a célra az etidium-bromidot (EtBr) használták, azonban bizonyított mutagén hatása miatt ma már a biztonságosabb SYBR Green (*Invitrogen*) vagy SYBR Safe festékeket alkalmazzák. Működési elvük: beépülve a DNS molekula heterociklusos bázisai közé megváltozik gerjeszthetőségük, ultraibolya sugárzás hatására fluoreszcens fényt emittálnak. A SYBR rendszereknél nem feltétlenül szükséges UV-t használni, kék fényénél is láthatóvá tehetők. Ennek előnye, hogy gélből izolálás közben nem károsodik a DNS.

## 1.c.) A génexpresszió fehérjemunkájának eljárásai

### OD mérés és az expresszió vége

Az optikai denzitás méréshez az adott lombikban lévő kultúrából először a leoltást követően kb. két óra elteltével, majd félóránként (ti. a baktérium sejtek 20 percenként kettőződnek meg) mintát veszünk. Ennek mérjük az abszorbanációját 600 nm-en, így jutunk az OD<sub>600</sub> értékéhez. Egy másik műszerrel (McFarland denzitométerrel) az opálosságot ún. MF egységekben kapjuk. A kettő közötti váltószám: 1 MF = 0,23 OD<sub>600</sub>. A gyakorlat szerint OD<sub>600</sub> = 0,6-0,7 esetén érte el a bakteriális kolónia a megfelelő egyedsűrűséget, ekkor lehet leállítani a növesztést. Ekkor a sejteket 5000 rpm-en 20 perc alatt lecentrifugáljuk. A felülúszó elöntése után, a pelletet natív feltárával felszuszpendáljuk. Ilyen formában a feltárásig –18 °C-on fagyaszttva tárolható Falcon-csőben. Mélyhűtés előtt – különösen a jelölt minta esetén – proteáz inhibitor koktélt adunk hozzá 1 mg/l-es koncentrációban. Bár a BL21 proteáz-deficiens törzs (a sejtekben ki vannak ütve a fehérje bontó enzimeket kódoló gének), a feltárással előfordulhat, hogy az *E. coli* sejt periplazmatikus (két sejtmembrán közötti) teréből felszabaduló enzimek degradálják a célfehérjét. Ezeket blokkolja az inhibitor koktél.

### <sup>15</sup>N izotópjelölt fehérje előállítása táptalaj-cserés eljárással

Izotópjelölt fehérje esetén kétféle módon járhatunk el. Az egyik lehetőség hogy közvetlenül a <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl-ot tartalmazó minimál-oldatban növesztjük a sejteket. Kissé bonyolultabb, de hatékonyabb az ún. táptalaj-cserés eljárás (*Marley és mts-i.*). Utóbbinál sejteket 2YT-ben szaporítjuk, míg az OD<sub>600</sub> eléri a 0,6-0,7-es értéket, ezután helyezzük át a kultúrát a jelölt minimálba. Táptalajcserekor a sejteket lecentrifugáljuk 3000 rpm-en 15 perc alatt, majd a felülúszó elöntése után 2×5 ml jelölt minimállal mossuk. A folyadékot ismételt fugalással eltávolítjuk, a pelletet kb. 10 ml minimállal vesszük fel. A sejt-szuszpenziót ez alkalommal már az előre elkészített 500 ml térfogatú minimál táptalajba juttatjuk, és indukálás előtt egy órán át rázatjuk.

### Feltáráss

A baktérium sejtek feltáráss már az expresszió utáni –18 °C-ra való mélyhűtéssel, és az azt követő lassú felmelegítéssel megkezdődik. Fagyasztáskor a citoplazma víztartalma jelentős térfogat-növekedést szenved, illetve tükrisztályok képződnek a sejt belsejében, melyek

dezintegrálják a membránt. A módszer sajnos lassú és nem is elég hatékony, így mindenképpen szükséges, hogy mellette még vegyszert is alkalmazzunk. Felengedés után a szuszpenzióhoz adott 30%-os Streptomycin-szulfát oldat és/vagy lizozim enzim felbontja a baktériumok sejtfalát, valamint a Streptomycin kicsapja a DNS-t is. (15-20 perc, RT inkubálás.) A nagyobb DNS-darabok fragmentálására célszerű DNáz-t is pipettázni a szuszpenzióhoz (10 perc inkubálás). Harmadik lehetőség az ultrahangos roncsolás, többszöri (2-3×), rövid ideig (~1,5 perc) tartó kezeléssel, jeges hűtés közben (erőteljes melegedés tapasztalható).

A feltárodott sejteket 19000 rpm-en, 20 perc alatt lecentrifugáljuk, így eltávolíthatók a sejtörmelékek (plazmamembrán darabkák, sejtalkotók, DNS és RNS molekulák). A fehérjék többsége a felülúszóban kolloidális oldat formájában van jelen (szolúbilis). Előfordulhat azonban, hogy a célfehérje – mivel hirtelen, nagy mennyiségben termelődik az expresszióban – kicsapódik ún. inklúziós testek formájában. Ekkor a kiülepedett frakció része lesz, feldolgozása speciális eljárást igényel.

*(inklúziós test:* Rosszul feltekeredett fehérjék zárvány-szerű aggregátuma a sejt citoplazmájában. Benne a fehérjéket erős nemkovalens kötések tartják össze. Az ~ek tipikusan 0,2-1,5  $\mu\text{m}$  átmérőjűek enyhén porózusak, gyakran kristály-szerű szerkezetet mutatnak. Kialakulásukat sok tényező (pH, ozmotikus koncentráció, tápanyag mennyiség, a gazdasejt élettani sajátosságai, hősök stb.) befolyásolja. *In vivo* expresszió során az idegen környezetben (eukarióta fehérje a prokarióta sejtben) termelődő fehérje képezhet ~eket. Ennek mértéke a termelés intenzitásától is függ.)

### **Bradford-próba**

A vizsgálathoz az oszlopról távozó eluátum cseppjéből vett 20  $\mu\text{l}$ -nyi mintához hozzáadunk 50  $\mu\text{l}$  8 M-os urea oldatot (kaotróp molekula, szétzilálja a fehérje konformációját), valamint 500  $\mu\text{l}$  Bradford-reagenst, ami kék színnel indikálja a fehérje jelenlétét.

## SDS-PAGE

Az SDS-PAGE fehérjemolekulák szeparálására alkalmas eljárás. A mozaikszó első fele a nátrium-dodecil-szulfátból származik (SDS, sodium-dodecyl-sulphate,  $(\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{SO}_2 - \text{O}^-) \text{Na}^+$ ) ami egy ionos amfipatikus molekula, míg második része (PAGE, poliakrilamid gélelektroforézis) utal a futtató gélt felépítő anyagra.

Az akrilamid (2-propénamid,  $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$ ) vizes oldatban gyökös polimerizációra képes. A keletkező polimer lineáris, ám ha *N,N*-metilén-bisz-akrilamidot is adunk az oldathoz (1-3%-ban), a láncok között keresztkötések alakulnak ki, ezáltal térhálós szerkezet jön létre. A porózus szerkezetű gél – mintegy molekula-szűrőként – méret és alak szerint szeparál. A poliakrilamid előnye, hogy hidrophil, a legtöbb futtató pufferrel kompatibilis. Nem tartalmaz töltéssel rendelkező csoportokat, amelyek befolyásolnák az elektroforetikus elválasztást. Kémiaailag inert, nem lép kölcsönhatásba a fehérjékkel, és nem zavarja a detektálásra használt festési eljárásokat sem.

A gélek elkészítéséhez – az akrilamidon kívül – szükséges egy megfelelő pH-jú TRIS-Cl (trihidroximetil-aminometán-klorid,  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2 \cdot \text{HCl}$ ) puffer, valamint SDS és APS (ammónium-peroxi-diszulfát,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 10%-os oldata. Utóbbi a polimerizációs folyamat katalizátora (vizes közegben homolitikusan disszociál, gyökök keletkeznek), azonban csak iniciátor vegyület – TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametil-etán-1,2-diamin) – jelenlétében hasítja a kettős kötést. Az elkészített elegyet két üveglap pipettázzuk majd fölé egy másik, hígabb ún. koncentráló gélt öntünk, melyben zsebeket alakítunk ki a minták számára.

A minta előkészítése során a vizsgálandó frakció 10  $\mu\text{l}$ -éhez azonos térfogatú SDS-kezelőt adunk, amely brómfenolkéket (futás frontját teszi láthatóvá; negatív töltésű és kis molekula, így gyorsan halad az anód felé), és glicerint sűrűség-növelő ágens (hogy a zsebek aljára süllyedjen a minta) tartalmaz. Az elegy további összetevői a nátrium-dodecil-szulfát (fehérje denaturáló és detergens), a  $\beta$ -merkaptoetanol (redukálószer, amely gátolja a cisztein - cisztein oxidációt, azaz a diszulfidhidak kialakulását), a TRIS és desztillált víz.

A mintát tartalmazó Eppendorf-csöveket 2-3 percre forrásban lévő vízbe helyezzük, majd lehűlés után Hamilton-fecskendővel viszünk fel a gél zsebeibe 10-10  $\mu\text{l}$ -t. A szélére 5  $\mu\text{l}$ -ét marker létra (adott molekulatömegű fehérjék elegye) kerül, amely segíti a célfehérje méretének meghatározását.

A gélelektroforézis során feszültségkülönbséget hozunk létre a futtató elegyet tartalmazó kádba merülő gél két végpontja között. A fehérjék negatív töltésűek – a felületükön adszorbeálódott szulfát-csoportok miatt, és mert izoelektromos pontjuknál magasabb pH-n dolgozunk – így a pozitív anód felé vándorolnak. A megfelelő kémhatást puffer rendszerek segítségével állítjuk be, melyek ionjai részt vesznek az áramvezetésben is. Az ún. diszkontinuus elektroforetikus rendszerek háromféle pufferrel dolgoznak, mely kétféle aniont tartalmaz. A gélekben az anion komponens (Cl<sup>-</sup>) erős sav savmaradék, melynek disszociáció foka széles pH-skálán állandó. A tank-pufferben viszont glicerint alkalmaznak, mely pH=8,3-n ugyan anionos állapotú, de bruttó töltése erősen függ a közeg kémhatásától. Miután a feszültséget rákapcsoltuk a rendszerre a fehérjék és a tank-puffer anionjai az anód felé kezdenek vándorolni. A koncentráció gélben a pH 6,8-as, amely éppen a glicin izoelektromos pontjának felel meg. Az aminosav tehát ikerionos állapotba kerül, elektroforetikus mobilitása kisebb lesz. Lokálisan csökken a töltéssel rendelkező molekulák száma, ami az elektromos ellenállás növekedését eredményezi. Ohm-törvényének megfelelően – hogy az elektromos kör áramerőssége állandó maradjon – megnő a térerő, így a fehérjék vándorlása felgyorsul. A klorid-ion frontot elérve az ellenállás és a térerő lecsökken. A molekulák futása lassul, így egy vékony sávban feltorlódhatnak a front mögött, és így haladnak a szeparáló gél felé. A szeparáló gélben változik a helyzet. Ennek pH-ja 8,8-9,0 között van, így benne a glicin ismét negatívvá válik. A töltéshiányból eredő koncentráció hatás megszűnését követően a fehérjék fajlagos töltésüknek megfelelően, különböző sebességgel haladnak a gélben.

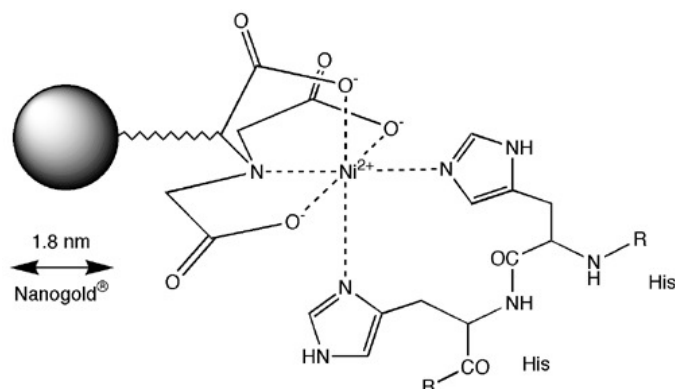
A gél előhívása festéssel történik. SDS-PAGE esetén leggyakrabban Coomassie Brilliant Blue festéket alkalmaznak, mely kék színű. A CBB fiziszopcióval kötődik a fehérjékhez, elsősorban az aromás oldalláncokhoz, valamint a hisztidin és arginin aminosavakhoz. A vegyület a 465-595 nm közötti hullámhosszúságú fényt abszorbeálja. Közvetlenül festés után az egész gél kék színű, a csíkok csak a festéktelenítő oldatban válnak láthatóvá. A sávok vastagsága utal a fehérje mennyiségére.

### **Ni<sup>2+</sup> affinitás kromatográfia**

Az elválasztástechnikai módszerek egyik ágát képviselik a nagyfokú szelektivitással bíró affinitás kromatográfiák. Az eljárások során kölcsönható partnerek egyike rögzítve van az oszlop töltetén, a másik – maga a keresett molekula (ill. annak részlete) – ehhez kötődve választható el az egyéb komponensektől. A Ni<sup>2+</sup> affinitás kromatográfia oszlopa olyan – 1,8

nm átmérőjű – agaróz nanogyöngyöt tartalmaz, melyre Ni-NTA (nikkel-nitrilotriacetát, *Invitrogen*) csoportokat kapcsoltak. Ebben a nikkel-ionok koordinációs szférája telítetlen, így képes még további két ligandum befogadására. Ha a fehérjét úgy expresszáltatjuk, hogy N-terminális végén 6,8 vagy 10 hisztidin aminosav kapcsolódik hozzá, akkor az imidazol csoport,  $\pi$ -nitrogénjének nemkötő elektronpárjával koordinál a  $\text{Ni}^{2+}$  üres d-pályájára. Így kötődik fel az oszlopra a fehérje, ha a pH a hisztidin izoelektromos pontja ( $\text{pI}_{\text{His}}=6,5$ ) felett van. Ezt 8-as pH-jú ún. natív feltáró oldattal biztosítjuk (5.sz. függelék).

Az eluálás kémhatás változtatással és/vagy imidazol tartalmú (250mM) pufferrel való mosással történik. Alapja, hogy a szabad öttagú gyűrűs molekulák kiszorítják az előzőleg immobilizált fehérjét, így az a lecsöpögő eluátumban jelentkezik.



5. ábra: koordináció a  $\text{Ni}^{2+}$  affinitás kromatográfiában

Az affinitás oszlopot mintafelvitel előtt egyensúlyba kell hozni, azzal a natív feltáró oldattal, mely a mintánk oldószere is. Ehhez először 4 oszloptérfogatnyi (1 o.t.  $\approx 5$  ml) vízzel mossuk, majd 20 ml natív pufferrel equilibráljuk a töltetet. A folyadékok áramlási sebességét  $\sim 2$  ml/percre állítjuk be. Ez után vihető fel a minta 1 ml / perccel.

Az elválasztás után két oszloptérfogatnyi elúciós (250 mM imidazolos) pufferrel, majd 20 ml vízzel mosunk. Az első lépéssel az esetleges szennyezőket, másodikkal pedig az imidazolt távolítjuk el. Az oszlopot  $\sim 30$  V/V%-os etanolban rakjuk el, hogy megakadályozzuk a mikroorganizmusok elszaporodását.

Az oldatok cseréjénél és a mintafelvitelnél ügyelni kell arra, hogy a töltet mindig folyadékban álljon. Leszáradás esetén tömörsége megszűnik, az elválasztás hatékonysága romlik. Ilyenkor újra fel kell az egészet szuszpendálni, és ülepíteni.

## 2. sz. függelék: táptalajok és pufferek

**2YT táptalaj** (1 liter): 16 g tripton

10 g élesztő kivonat

pH = 7,5

5 g NaCl

**LB médium** (1 liter): 12 g tripton

5 g élesztő kivonat

pH=7,5

10 g NaCl

**minimál táptalaj** (500 ml):

Ennek összeállításakor első lépésként 0,5 g  $^{15}\text{N}$  jelölt ammónium-kloridot oldunk fel 450 ml desztillált vízben, majd autoklávban 120°C-on, 20 perc sterilizáljuk. Lehűlés után hozzáadjuk a következő filter-sterilizett oldatokat: 50 ml 10×-es minimál

500 µl 1M-os  $\text{MgSO}_4$

500 µl nyomelem mix

6,5 ml 30%-os glükóz ( $^{13}\text{C}$ -forrás lehet)

400 µl 50 mM-os  $\text{CaCl}_2$

500 µl antibiotikum

**10×-es minimál** (1 liter): 68 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

30 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

*autoklávozni,*

5 g NaCl

*vagy filtersterilizelni*

**nyomelem mix** (1 liter):

Először 800 ml desztilláltvízben feloldunk 5 g Na-EDTA-t, pH-ját 7-re állítjuk. Ezt követően adagoljuk az alábbiakat, és minden összetevő után újra pH-zunk.

5 g  $\text{FeCl}_3$

0,5 g  $\text{ZnCl}_2$

0,1 g  $\text{CuCl}_2$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

*1 l végtérfogatra egészítjük ki, majd autoklávban sterilizáljuk*

**LB agarlemez** (1 liter): 12 g tripton

5 g élesztő kivonat

10 g NaCl

15 g agar (nem kell elkeverni, a klávozás során feloldódik)

**0,1 M-os MgCl<sub>2</sub>**: 4,1 g MgCl<sub>2</sub>-ot feloldunk 200 ml desztillált vízben. Autoklávban sterilezzük.

**0,1 M-os CaCl<sub>2</sub>**: 0,7 g CaCl<sub>2</sub>-ot feloldunk 50 ml desztilláltvízben. Autoklávban sterilezzük.

**natív feltáró puffer** (1 liter): 17,5 g NaCl (0,3 M)

6,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM)

pH=8

0,2 g NaN<sub>3</sub> (3 mM).

A NaCl a nagy ionerősséget biztosítja, a NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-nak puffer szerepe van, míg a Na-azid megakadályozza az elfertőződést.

**natív elúciós puffer** (1 liter):

Alap összetételét tekintve megegyezik a natív feltáróval, viszont 250 mM koncentrációban tartalmaz imidazolt.

**a dialízishez használt puffer összetétele** (1 liter): 5,9 g NaCl

6 g TRIS

pH = 8

0,2 g NaN<sub>3</sub>

A dializálni kívánt fehérje-frakciót először 2 liter pufferben kell kevertetve ON, 4 °C-on kezelni, majd másnap 1 liter friss oldatban újabb 2 órán át dializálni.

### ***Agaróz gélelektroforézishez használt oldatok***

**TAE puffer** (50×-es): 242 g tris-bázis

57,1 ml ecetsav

100 ml 0,5 M EDTA (pH=8,0)

desztillált vízzel 1 literre kiegészítve (pH=8,5)



**TBE puffer** (10×-es): 108 g tris-bázis  
55 g bórsav  
40 ml 0,5 M EDTA  
desztillált vízzel 1 literre kiegészítve

**DNS-kezelő:** 300 µl glicerin  
55 µl TE puffer (10×)  
40 µl brómfenolkék  
605 µl víz

### ***SDS gélelektroforézis oldatai, géljei***

**futtató puffer** (1 liter): 14,2 g glicin  
3 g tris  
1 g SDS

**fehérje kezelő** (2×): 2,5 ml 0,5 M tris (pH=6,5)  
2 ml glicerin  
4 ml 20%-os SDS  
0,5 ml β-merkaptóetanol  
0,5 ml brómfenolkék  
0,5 ml víz

**akrilamid** (29,1%-os): 72,5 g akrilamid  
2,5 g bisz-akrilamid  
250 ml-re kiegészítve desztillált vízzel

**TRIS felső** (pH=6,8): 12,2 g tris  
8 ml ccHCl

**TRIS alsó** (pH=8,8): 12,2 g tris  
4 ml ccHCl

*100 ml-re kiegészítve desztillált vízzel*

## **poliakrilamid gélek**

szeparáló (17,5%-os)

2,85 ml 30%-os akrilamid

1,95 ml TRIS alsó (pH=8,8)

50 µl 10%-os SDS

50 µl 10%-os APS

2 µl TEMED

koncentráló

1,75 ml desztilláltvíz

0,425 ml akrilamid

0,325 ml TRIS felső (pH=6,8)

25 µl 10%-os SDS

25 µl 10%-os APS

2,5 µl TEMED

**festék** (1 liter): 2,4 g CBB-R250

500 ml 96%-os metanol

96 ml 99%-os ecetsav

*használat előtt át kell szűrni*

**festéktelenítő** (1 liter): 70 ml cc ecetsav

50 ml 96%-os etanol

### 3.számú függelék: Kiegészítések az NMR-es szerkezetvizsgálathoz

#### NOE-érték

Egy adott mag NOE értéke alatt azt a jelintenzitás változást értjük, mely egy másik proton jelének lecsatolása hatására következik be. Ez általában pozitív (jelintenzitás-növekedés tapasztalható), de lehet negatív is (intenzitás-csökkenés). Matematikailag a következő képlettel írhatjuk le a lecsatolt  $s$  mag függvényében:  $\eta_i(s) = (I - I_0) / I_0$  ( $I_0$  az egyensúlyi intenzitás). Az  $\eta$  tulajdonképpen egy térfogatintegrál, a spektrumban lévő csúcs alatti terület nagysága. Homonukleáris esetben ez fordítottan arányos a két spin közti távolság ( $r$ ) hatodik hatványával:  $1/\eta_i(s) = (p^* / \tau_c) r^6$ . A kifejezésben szereplő  $p^*$  a többi spin hozzájárulását adja meg,  $\tau_c$  pedig a molekula korrelációs ideje, mely annak méretével arányos, és oldatbeli forgását jellemzi.

#### Az NMR mérések pulzusszekvenciái:

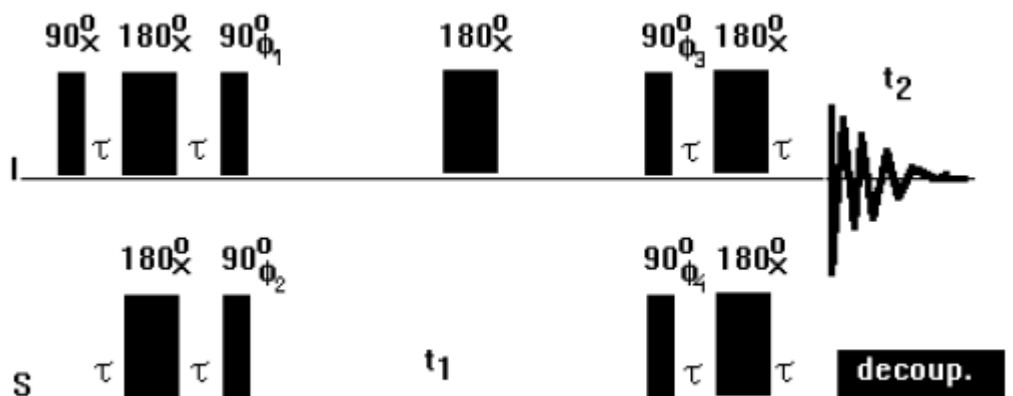
##### 2D-TOCSY



##### 2D-NOESY



##### 2D-HSQC

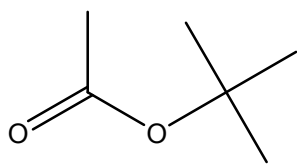


## A relaxációs mérések pulzusszekvenciáinak leírása

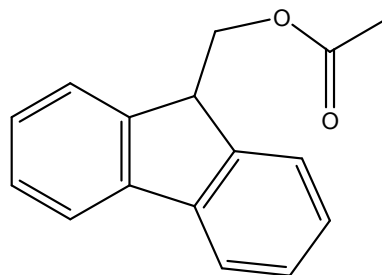
T<sub>1</sub> mérésére olyan pulzusszekvenciák felelnek meg, melyben a jel intenzitás a relaxációs időtől függően változik. Legáltalánosabban az ún. „átfordítás-visszatérés” („inversion-recovery”) eljárást alkalmazzák. Először egy 180°-os pulzussal felcseréljük az  $\alpha$ -alap és  $\beta$ -gerjesztett állapot betöltöttség viszonyát, majd ezt követi egy  $\tau$  várakozási idő, mely alatt a spinek egy része felszökik alapállapotba (minél tovább várunk, annál több spint érint a folyamat). Végül egy 90°-os pulzust követően detektáljuk a FID-jelet. A jel intenzitása és előjele  $\tau$ -tól függ. Ha  $\tau=0$ , az olyan, mintha egyetlen 270°-os pulzust alkalmaztunk volna, azaz maximális negatív jelet eredményez.  $\tau$  növelésével a negatív jel nagysága csökken, pozitívvá válik, majd az növekedve telítésbe megy át.

A T<sub>2</sub> méréséhez használt pulzusszekvencia alapja a spin-echo (spin-visszhang) jelensége. A szekvencia első eleme egy 90°-os pulzus, mely szelektív a heteromagra. Ezt követi  $\tau$  idő múlva egy 180°-os átfordítás, majd újabb  $\tau$  idő elteltével megismételjük a 90°-os pulzust, végül detektáljuk a FID-jelet. Így biztosítjuk, hogy a mérés kezdetén csak az <sup>1</sup>H mágnesezettsége legyen jelen. Tudniillik a heteromag mágneses vektorát 90°-kal elforgatva az x-y síkban kezd el precesszálni,  $\tau$  idő alatt „eljut valameddig”. Az átfordítás után folytatja precesszálsát, de ellentétes irányba, és azonos időtartam alatt visszatér a kiindulási állapotába. Az ilyen pulzusszekvenciát n-szer alkalmazva az x-y irányú mágnesezettségi vektor gyengül, majd kimerül, megszűnik a heteromag koherenciája. Ekkor detektáljuk a FID-jelet.

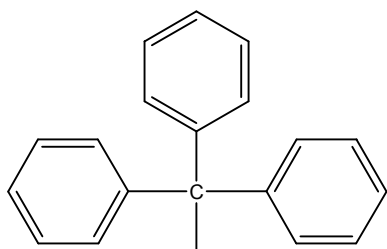
#### 4. számú függelék: Képlettár



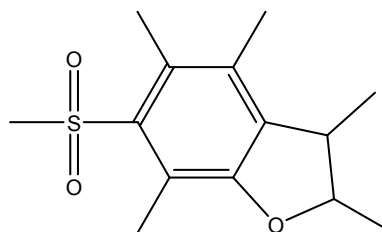
*tert*-butiloxi-karbonil (Boc)



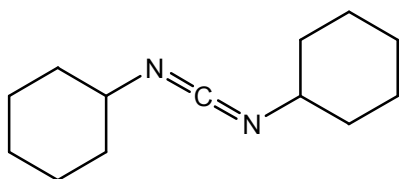
9-fluorenilmetoxikarbonil



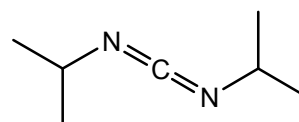
tritol



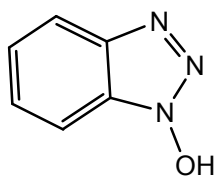
2,2,4,6,7-pentametil-  
dihidrobenzofurán-6-szulfonil (Pbf)



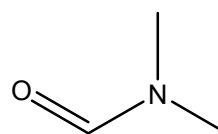
*N,N'*-diciklohexilkarbodiimid



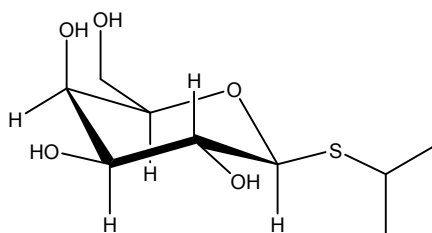
*N,N'*-diiziprilkarbodiimid



1-hidroxibenztriazol  
(HOBt)



*N,N*-dimetilformamid



izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid  
(IPTG)

## **5. számú függelék: A dolgozatban \*-gal jelölt kifejezések értelmezése, magyarázata**

agonista: Azok a vegyületek, melyek kötődnek egy receptorhoz, és biológiai válaszreakciót indukálnak. Az ~ák valamilyen hormon vagy neurotranszmitter hatását utánozzák, azzal, hogy ugyanahhoz a receptorhoz kapcsolódnak, mint az adott endogén ligand.

FID: Free Induction Decay (szabad indukciós lecsengés)

Az NMR mérések során a gerjesztő pulzus megszűnését követően, a különböző Larmor-frekvenciával precesszáló mágnesesmomentum vektorok igyekeznek visszatérni egyensúlyi állapotukba. Ezt relaxációs folyamatok során teszik, melyet FID-nek nevezünk. A spektrométer detektora által regisztrált FID jel, egy időfüggő spektrum, de a megfelelő Fourier-transzformációval frekvencia-függővé alakítható.

homokonformer: Olyan másodlagos szerkezeti elem a fehérjékben, melynél a peptidlánc egy összefüggő szakaszán ugyanolyan konformációjú N-C $\alpha$ -C<sub>karbonil</sub> egységek követik egymást. Heterokonformer esetben az egymás utáni egységek konformációja eltér.

inkretinek: A vékonybél speciális sejtjei által termelt vegyületek, melyek az inzulin-termelődést szabályozzák, a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeit stimulálva. Hatásukat közvetlenül étkezés után fejtik ki, mielőtt még a vércukorszint megemelkedne.

Kanamycin: aminoglikozid antibiotikum (molekula képlete: C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>)

A fehérje szintézist befolyásolja, hatását a riboszóma 30S alegységén keresztül fejt ki. Ez két módon történhet: a riboszómához való irreverzibilis kapcsolódásával gátolja a transzlokációt (a riboszóma elmozdulását a mRNS-en), így a peptid szintézis leáll. Másik lehetőség, hogy a kötődés következtében ún. missens mutációt indukál. Ekkor egy másik antikodonú aminoacil-tRNS komplex annál a mRNS-hez, vagyis az eredetitől eltérő aminosav fog beépülni. Így hibás szerkezetű, funkció képtelen fehérje jön létre.

kompetens sejt: Olyan bakteriális sejt mely nagy hatékonysággal képes a plazmid DNS-ek felvételére. A kompetencia számszerű mértékét az alapján adjuk meg, hogy 1  $\mu$ g DNS molekula hozzáadására, hány felnőtt telepet kapunk a táptalajos lemezen. Például 10<sup>6</sup>-os a

~ja azoknak a sejteknek, melyekbe 1 µg plazmidot transzformálva milliós nagyságrendű kolóniát kapunk. Kísérleti meghatározása a következő lehet: 100 µl sejthez hozzáadunk 10 ng DNS-t. Transzformálás után a kultúra egy adott mennyiségét (pl. 10 µl-ét) antibiotikus lemezre szélesztjük. Inkubáljuk ON 37 °C-on. Másnap megszámloljuk a felnőtt telepeket, majd extrapolálunk 1 µg plazmidra (az összefüggés ugyan nem lineáris, de közelíthetjük azzal).

liofilizálás: A liofilizálás – más néven fagyasztva szárítás – az oldószer mentesítésnek egy speciális formája. Három fő lépése van: a fagyasztás, az elsődleges- és másodlagos szárítás. Először a mintát szárazjéggel (-78,5 °C) esetleg cseppfolyós nitrogénnel (-195,8 °C) hármaspontja alá kell hűteni. Ezt követi az első szárítási lépés melynek során a nyomást igen alacsonyan tartják (rendszerint néhány millibar), és a rendszerrel csupán annyi hőt közölnek, ami az oldószer (legfőképp víz) szublimációját fedezi. A második szárítási lépésben a maradék oldószert eliminálják. A procedúra végére liofilizál minta víztartalma jelentősen (1-4 % alá) csökken.

minigén: Olyan – néhány ezer bázispárból álló cirkuláris DNS – mely egy adott eukarióta fehérjét kódoló szekvenciát hordoz. A ~t a megfelelő helyen restriktív enzimekkel hasítva kivágható belőle a célfehérje génje.

stock: A transzformált baktériumsejtek tárolási formája. Steril glicerint is tartalmazó (20%) tápoldatban, -78 °C-on lefagyasztva a sejtek károsodás nélkül eltarthatók.

TFE: trifluor-etanol (CF<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)

Másodlagos szerkezet stabilizáló hatását azon keresztül fejt ki, hogy növeli a hidrofób csoportok oldhatóságát, valamint megváltoztatja a H-híd kötés viszonyokat az oldatban. Utóbbi alapja a fluor-alkohol és a víz eltérő sav-bázis jellemzője. A TFE igen gyenge bázis, így jelenlétében csökken az oldószer és az amid-protonok közti hidrogén-kötések száma illetve erőssége, aminek egyenes következménye az intramolekuláris H-hidak megerősödése.

YUH: 26 kDa-os, 236 aminosavból álló, a cisztein-proteázok csoportjába sorolható fehérje.