

Spektrofotometria

1. Mely aminosavak adják a spektrofotometriás mérés alapját általában fehérjék esetében? Milyen hullámhosszon nyelnek el? (1 szám, 1 magyarázat)

Aromás aminosavak, ezek közül is a triptofán és a tirozin, amelyeknek 280 nm környékén erős elnyelési csúcsa van.

2. Az EGFP esetében nem ezt a „szokásos” hullámhosszt fogjuk alkalmazni. Hány nm-en mérünk helyette és miért alkalmazhatjuk ezt ennél a molekulánál? (1 szám, 1 ok)

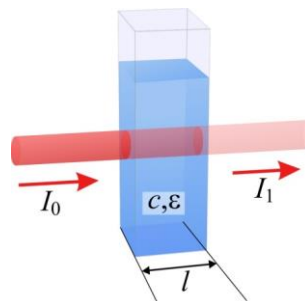
495 nm-en is mérünk az EGFP esetében, mivel ennek a 280 nm-es jellemző elnyelési csúcsa mellett 495 nm-en is speciális elnyelési csúcsa van.

Gerjesztése 488 nm-en van, emisszió pedig 509 nm-en.

3. Írja fel a Lambert-Beer törvény egyenletét, feltüntetve az egyes változók jelentését és mértékegységét!

$$A = \log I_0 / \log I = \epsilon c L$$

- **A:** abszorbancia (vagy E mint extinkció) [nincs mértékegység]
- **I_0 :** fény kezdeti intenzitása
- **I :** fény intenzitása, miután áthaladt az anyagon
- **ϵ :** extinkciós vagy abszorpciós koefficiens – anyagra jellemző állandó [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
- **c :** anyag koncentrációja [mol/dm^3][M]
- **L :** a réteg vastagsága, amelyen a fény áthaladt [cm]



4. Írja fel a fehérjemennyiségek tömegére alkalmazott, Lambert-Beer törvényen alapuló egyenletet!

$c = A / (\epsilon L)$ átrendezése:

$$A_{280} / ((\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) / m(\text{Da})) \times L(\text{cm})) = c(\text{mg/ml})$$

A gyakorlaton ezt 495-re alkalmazzuk.

5. Milyen spektrofotométerekkel találkoztunk a laborban eddig? (2+1)

1. Thermo Scientific NanoDrop 2000
2. TECAN SPARK 20M
3. Jasco V-730 küvettás spektrofotométer *(ezt nem is használtuk még??)*

6. Mi a leglényegesebb előnye a fehérjék spektrofotometriás koncentráció-meghatározásának az 1. gyakorlaton használt kromogén módszerhez képest? (1 kulcsmondat)

Előnye: gyors, egyszerű. Mivel **nem kell a méréshez a fehérjét kémiai reakcióba vinni** → fehérjék ill. peptidek kromatográfiás elválasztásának folyamatos követése

7. Mi a leglényegesebb hátránya a fehérjék spektrofotometriás koncentráció-meghatározásának az 1. gyakran használt kromogén módszerhez képest? (1 kulcsszó)

Hátránya: az egyes fehérjék különböző arányban tartalmaznak aromás aminosavakat - inkább csak **ugyanazon fehérje különböző oldatainak összevetésére alkalmas**, nem abszolút módszer.

A mérést emellett zavarja minden 280 nm-es elnyelést mutató anyag, illetve nukleinsavak is. (260nm-nél van elnyelésük)

8. Melyik változó az a Lambert-Beer egyenletben, ami eltér az általunk alkalmazott spektrofotométerek esetében?

Az **EGFP elnyelési csúcsa** nem teljesen egyezik a **gerjesztési maximummal, 495 nm-en** megfigyelhető. Az **elnyelési jellemzői függenek az oldószer jellemzőitől is, pl. pH**. Az egyszerűség kedvéért ezeket vegyük elhanyagolhatónak, és számoljunk $\epsilon = 55000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ értékkel, és a **Jasco esetében 488**, a **NanoDropos méréseknél pedig 495-ös elnyelési csúcs értékével**.

9. Soroljon fel három példát olyan lépésekre, amelyek a tisztítási folyamat során anyagvesztést okozhatnak!

IMAC során:

- **Nem köt meg az összes fehérje az IMAC-gyöngyön** (letört róla a His-tag, elmutálódott).
- Az IMAC gyöngy is „szökik”, ezáltal a megkötött fehérjéből is veszítünk a gyöngyökkel együtt.
- A **frakció begyűjtése** sosem tökéletes. **SEC-nél is!**
- Az **idő elteltével** folyamatos a **degradáció**. **SEC-nél is!**

SEC tisztítása során:

- Az előkészítő lépésben (töményítés/koncentráálás) a **minta egy része kitapadhat a szűrőre.**
- **Egyik tárolóból a másikba áthelyezés** során elkerülhetetlenek az anyagveszteségek.
- A **frakció begyűjtése** sosem tökéletes. **IMAC-nál is!**
- Az **idő elteltével** folyamatos a **degradáció**. **IMAC-nál is!**

**10. Milyen tisztítási módszereket alkalmaztunk az ultratiszta minta előállítására?
(2 betűszó és annak jelentése)**

IMAC - Immobilized Metal Affinity Chromatography

SEC - Size-Exclusion Chromatography