

## Spektrofotometria 2 (fehérjék abszorbanciájának pH függése)

### 1. Mit nevezünk kromofór csoportnak? (rövid leírás)

A **fény elnyeléséért** felelős molekularész, amely az **anyag színét** adja. Ez viszonylag könnyen átbillenthető egy magasabb energiájú állapotba.

EGFP esetén a **béta-redőkből álló hordó-szerű** szerkezet belsejében lévő, **három módosult aminosavból** (Thr-Tyr-Gly)l álló szekvencia, mely **aromás gyűrűket** tartalmaz.

### 2. A gyakorlaton milyen kromofór csoportot vizsgálunk? Mely aminosavak teszik ki ezt a csoportot? (rövid leírás)

EGFP esetében **három módosult aminosavból** összeálló, aromás gyűrűket tartalmazó kromofór csoport a **Thr-Tyr-Gly** szekvencia; a GFP esetében ez **Ser-Tyr-Gly**. A **három aminosavból spontán gyűrűvé záródás** által egy nagy **delokalizált elektronrendszer** jön létre.

### 3. Mi az a tautomerizáció? Írjon példát! (rövid leírás, 1 példa, ami nem a vizsgálatunk tárgya)

**Konstitúciós** (szerkezeti) **izoméria egyik fajtája**. Könnyen végbemenő (kis aktiválási energiát igénylő) **reverzibilis izomerizáció**, azaz két vegyület akkor tautomer, ha **szabadon átalakulhatnak egymásba**. A tautomer egyensúlyi helyzet a kémiai szerkezet, a hőmérséklet és a halmazállapot függvénye; oldatban függ az oldószer minőségétől, a pH-tól.

Pl. **prop-1-en-2-ol és propanon (acetone)**, keto-enol

### 4. Mit változtat a pH az általunk vizsgált molekulán? (rövid leírás, 1 kulcsszó)

Az EGFPnek **két hullámhosszon** is megfigyelhető egy **lokális maximum**, azonban a **pH változtatásával eltolódik**, hogy melyik a magasabb. Ennek oka a kromofórban található  **tirozin OH csoportjának tautomerizációs állapota**. Elnyelési csúcs változik, ami **befolyásolja** az ebből számított **koncentráció becsléseket**.

### 5. Mit minek a függvényében szeretnénk ábrázolni? (2 ábra tengelyei)

abszorbancia - hullámhossz (nm) függvényében - (összes pH-n mért)

abszorbancia (490 nm-en mért) - pH függvényében

### 6. Melyik két elnyelési értékre vagyunk kíváncsiak? Miért? (2 érték, és mik azok)

(280 nm és 490 nm körüli (egyes eszközökön 488 nm, másokon 495 nm)). A **280 nm** az **aromás gyűrűk** elnyelési maximuma - fehérjékre jellemző érték - . A **490 nm** körüli érték pedig **speciálisan az EGFP-re** jellemző érték, **7,4-es pH-n** (amelyen a legtöbb kísérletünk zajlik) ez már jelentős mértékben megjelenik. Jól **becsülhetjük az oldatban található EGFP és más fehérjék arányát** ezen két érték segítségével.)

**490 nm-en** tapasztalt elnyelési érték, itt van a **natív EGFP fehérje kromofór csoportjából adódó elnyelési maximum** hely, és **395 nm-en** tapasztalt elnyelési érték, itt a **pH okozta tautomerizáció miatt megváltozott kromofór csoportok (tirozin) elnyelési helye** található.

**7. Mire kell figyelniünk az általunk alkalmazott spektrofotométer esetében, ami hibalehetőséget okoz? Gondoljunk az eszköz korábban megismert jellemzőire, amiben eltér a többi, laborban alkalmazott fotométertől! (1 dolog)**

Az üres lemez abszorbanancia értékeit le kell mérniünk, hogy annak az elnyelését is ismerhessük, mivel a TECAN az egész lemezt vizsgálja a lemezen áthaladó fény befolyásolja a mérést.

**8. Mit jelent az EGFP esetében a fehérje maturációja?**

EGFP esetében egy módosított Thr-Tyr-Gly szekvenciából áll a kromofór csoport, e három aminosavból spontán gyűrűvé záródás által egy nagy delokalizált elektronrendszer jön létre – ez a fehérje érése, maturáció.

Ezek a delokalizált elektronok gerjesztődnek 490 nm környékén - natív fehérje elnyelési max.

**9. Mi a GFP és az EGFP? Mi köztük a különbség? (rövidítés jelentése és leírás, elég konkrétumok nélkül)**

**GFP:** Green Fluorescent Protein, vagyis zölden fluoreszkáló fehérje

**EGFP:** Enhanced Green Fluorescent Protein (GFP változata, emlősökben, baktériumokban jó)

**Különbség:** a kromofór csoport az EGFP esetében egy módosított Thr-Tyr-Gly szekvenciából, a GFP esetében ez Ser-Tyr-Gly szekvenciából áll.

**10. Milyen oldatok a pufferoldatok? Mi az a legfontosabb tulajdonságuk, ami miatt használjuk őket? Mit mutat meg a pufferkapacitás? (rövid leírás)**

A pufferoldatok gyenge savnak/bázisnak és annak egy erős savval vagy bázissal alkotott sójának oldata, ami állandó pH-értéket biztosít egy rendszerben.

A puffer kapacitásán egy erős sav (HCl) vagy erős bázis (NaOH) azon mennyiségét értjük mol-ban kifejezve, mely egy egységgel változtatja meg 1 liter puffer pH-ját.

**Szerepe:** pH stabilitás, kompenzálás, kiegyenlítés a külső hatásokkal szemben → imidazol-tartalom az IMAC elúciós pufferben például magasabbra tolja a pH-t.

**11. Hogyan tudod megmérni egy oldat pH-ját, milyen eszközök szükségesek hozzá? Mik azok a savak, mi jellemző rájuk (Lewis-sav definíciója)? (1 kulcsszó)**

A pH értékét indikátorokkal vagy digitális pH-mérővel lehet meghatározni.

**Lewis-sav definíció:** sav az az anyag, ami elektronpár-akceptor, vagyis elektronpár felvételére képes. A bázisok elektronpár-donorok vagyis elektronpár leadására képesek.

**12. Előfordulhat, hogy valamilyen pH-n eltűnik a zöld szín, és ezzel együtt a 490-es csúcs. Ez mivel magyarázható? (Gondoljunk vissza arra, mit (nem) láttunk az SDS-PAGE futtatás során!) (rövid leírás, 1 kulcsszó)**

Az EGFP kromofór csoportjának protonáltsági állapotától függően 490 nm mellett 395 nm-en is megjelenik elnyelési maximum. A pH változásával az, hogy melyik magasabb eltolódik.

Alacsony pH-n a 395 nm irányába tolódik el az elnyelési maximum. Ennek oka a kromofórban található tirozin OH csoportjának tautometrizációs állapota. A kromofór csoport megváltozása okozza a zöld szín eltűnését. (?)