

10. gyakorlat

Fehérje vizsgálat

1. Mi a különbség a fluoreszcencia és a foszforeszcencia között?

Fluoreszcencia esetén a **Hund szabály nem sérül gerjesztés hatására** (szingulett állapot), és **azonnali** az abszorpció után a **fénykibocsátás**, míg foszforeszcencia esetén **sérül a Hund szabály** és létrejön az úgynevezett **triplett állapot**, az abszorpció után **késleltetett a fénykibocsátás**.

Foszforeszcencia esetén, a fluoreszcenciával ellentétben, a **molekula szerkezeti adottságai (például rácshiba) miatt a gerjesztett elektron csapdába esik**, kiesik a vezetési sávjából. Egy idő után kiszabadul, és fényt fog emittálni. De előfordulhat, hogy újra csapdába esik. Ezáltal **foszforeszcencia esetén a gerjesztés megszűnése után napokkal vagy akár egy évvel később is emittálhat fényt a molekula** a fluoreszcenciával ellentétben, ahol a **gerjesztés megszűnése egyben az fényemittálás megszűnését is eredményezi**.

2. Magyarázd el a GFP példáján a Stoke-eltolódás jelenségét!

Röviden a **Stoke-eltolódás** (Stoke's shift) akkor jön létre, amikor **egy fluoreszcens molekulát adott hullámhosszú fénnel gerjesztünk**, a molekula pedig **egy nagyobb hullámhosszú fényt bocsát ki (emittál)** magából.

395nm-es gerjesztési spektrum hatására a TYR66 hidroxil-csoportja (OH) átalakul fenoxid (fenolát) csoporttá, ahol egy **magasabb gerjesztési érték mellett (470nm) 500 nm körüli csúcserővel fog a GFP molekula fényt emittálni**

3. Mit nevezünk hosszú Stoke-eltolódásnak?

Gerjesztési és emittálási spektrumok egymástól jelentős távolságra helyezkednek el.

4. Mit mond ki a Kasha-szabály?

Ez alapján a **létrejövő fluoreszcens emisszió kizárólagosan az S1- illetve T1- állapotokból**, azaz a **legalacsonyabb energiájú gerjesztett állapotból** keletkezhet.

5.A lumineszcencia melyik típusa okozhatta a képen látható jelenséget?
Indokold meg!

Egyik válasz: Foszforeszcencia. Ebben az esetben a **gerjesztés megszűnése után is sokáig képes fényt kibocsátani** az adott anyag

Másik válasz: A képen egy **rádium óra** látható. **Radiolumineszcencia okozhatta** (az a jelenség, amikor egy anyagot **ionizáló sugárzás ér**, és ennek **hatására fényt bocsát ki**). Az 50-es években **rádium és rézzel szennyezett cink-szulfid keveréket** használtak **analóg műszerek skálájának a festésére**, amely **zölden világító színt** adott.



6.A lumineszcencia melyik típusa okozhatta a képen látható jelenséget?
Indokold meg!

https://en.wikipedia.org/wiki/Luminous_paint (kép forrása)

Foszforeszcencia: a második képen is látható részeket **foszforeszkáló festékkel vonták be**. Ebben az esetben a **gerjesztés megszűnése után is sokáig képes fényt kibocsátani** az adott anyag.



7. Mi a különbség a GFP (green fluoreszcens protein) és az RFP (red fluoreszcens protein) között lumineszcencia szempontjából?

amúgy én ide vagy azt írnám, hogy **mást színt bocsátanak ki**, vagy azt, hogy az **RFP sokkal magasabb hullámhosszon gerjeszthető (558 nm míg a GFP 395 nm)**

8. Mi az a kvencselés?

A **fluoreszcencia elfedése** (valamilyen anyag hozzáadásával)

9. Mely aminosavak képesek a fluoreszcencia jelenségét létrehozni? Miért? Ez mennyiben működik GFP esetén?

Aromás gyűrűvel, többszörösen konjugált kettős kötésű (egyszeres és kétszeres kötések egymás után következnek a molekulában, most: szénatomok között) rendszerrel, valamint **merev, sík szerkezettel** rendelkező aminosavak hozzák létre. → **triptofán, a tirozin és a fenilalanin** (benzolgyűrű)

GFP esete: Fluoreszcens tulajdonságát **3 aminosavnak** köszönheti. Ezek közül csak az egyik rendelkezik **aromás gyűrűs szerkezettel (Tyr66)**, a másik kettő (Ser65 és Gly67) nem. Ezeknek is fontos szerepük van!

A **hisztidin is képes fluoreszcenciára**, hiszen **imidazol gyűrűje** aromás. (pl. **BSA**-ban van fluoreszcens tulajdonsága)

10. Az összes GFP egyetlen élőlényből (*Aequorea victoria*) származik, minden GFP-származék egy állatra eredeztethető vissza. Igaz-e a fenti állítás? Indokold meg!

NEM. Először a csalánozók (Cnidaria) törzsébe tartozó ***Aequorea victoria*** fajban mutatták ki a 20. század második felében. De később egy másik csalánozó fajban is felfedezték, a ***Renilla reniformis***-ban.

11. Hány gerjesztési csúcsa van a (Aequorea victoria) GFP-nek? Ezt lehet befolyásolni? Hogyan?

2 gerjesztési csúcsa van, mivel a tirozin aminosav két forma felvételére is képes: **Fenoxid és hidroxil csoporttal** is tud rendelkezni. Előbbiről a **470 nm** körüli, míg utóbbiról a **395 nm** körüli gerjesztés esetén beszélhetünk.

GFP **fehérje elsődleges szerkezetét megváltoztatva** többféle, eltérő színspektrumokban gerjeszthető fehérjéket lehet létrehozni, ezeket kinyerték élőlényekből, amelyek a legkülönbözőbb színspektrumokban emittálják a fényt.

GFP fluoreszcenciája megváltoztatható vagy eltüntethető. A GFP elsődleges szerkezete megváltozik → az egyik, vagy a másik csúcs eltűnik.

1. Két cisztein (**Cys48 és Cys70**) nem alkot kénhidat → ha alkotnának, a fluoreszcencia sérülne.
2. A GFP fehérjelánc **N terminálisának kezdő metioninjánál** több törlődik, vagy a **C-terminálistól számított 7 aminosavnál** több törlődik → fluoreszcencia megszűnik.

12. Milyen fénnel kell megvilágítani a GFP-t, hogy foszforeszcenciát mutasson?

A foszforeszcencia független a gerjesztő fénytől. A GFP nem tud foszforeszcenciát mutatni, csak fluoreszcenciát.

13. Milyen fénnel kell megvilágítani a GFP-t, hogy fluoreszcenciát mutasson?

Kék (475 nm) és **UV** (396 nm) fénnel egyaránt gerjeszthető.

14. Milyen színtartományba esik a GFP emissziós csúcsa?

509 nm az emissziós csúcs, ami a látható fény (alsó) **zöld** tartományába esik.

15. Mit nevezünk egy fehérje denaturációjának? Mi okozhatja?

Fehérje denaturáció: a globuláris fehérjék jellemző **térszerkezetének megváltozása a konformációt kialakító kötések átrendeződése** miatt. A denaturáció következtében a fehérje elveszti biokémiai hatását.

Denaturációt okozhatja:

- a **hőmérséklet emelkedése vagy csökkenése**,
- mechanikai hatás,
- az ionerősség,
- **pH megváltozása** (kritikus pH 4 alatt és pH 10 felett)
- **alkohol**,
- **nehézfém sók**,

- UV sugárzás,
- elektromos áram,
- a közeg koncentrációjának növekedése.

16. Denaturálható-e a GFP? Mondj rá két eltérő típusú példát!

Alkoholos denaturáció, pH megváltoztatása alkalmazható (pl.) GFP esetén.

Magasabb hőmérséklet alacsony pH-érték mellett jobban **gyengíti a fluoreszcens jelet**.

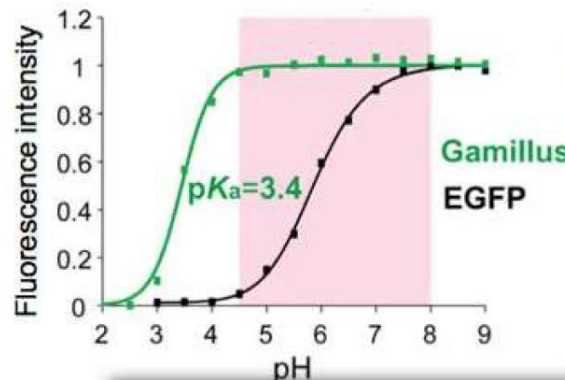
Magas hőmérséklet utáni a **megelőző hőmérsékletre való visszatérés** általi **renaturáció** esetén a **fluoreszcens jel gyengébb** lesz, mint az volt megelőzően azonos hőmérsékleten

1. Ha a benne található két **cisztein aminosav** között létrejön **kénhíd**, akkor **nincs fluoreszcencia**.

2. A GFP fehérjelánc **N terminálisának kezdő metioninjánál** több törlődik, vagy a **C-terminálistól számított 7 aminosavnál** több törlődik → **fluoreszcencia megszűnik**.

17. Befolyásolható-e a GFP denaturáció általi lumineszcenciája? Mondj rá egy példát!

Igen, befolyásolható, pl. pH-érték változtatásával.



GFP esetében a **másod- vagy harmadlagos szerkezet** ad magyarázatot a molekula fluoreszcens képességére. A fehérjék **harmad- illetve negyedleges szerkezete** különféle kémiai behatások által megváltozhat. Ilyen kémiai behatás a **pH-érték** megváltozása, a **magas hőmérséklet**, az **alkoholos denaturáció** vagy a **nehézfémek** jelenléte.

A GFP, érzékeny a pH-közeg változásaira, léteznek azonban olyan fluoreszcens GFP-k, melyek **többé-kevésbé jobban viselik a savas közeget** (pl. Gamillus).

18. Milyen színtartományba eső emittált fényt fogunk látni, ha a GFP-t 600 nm hullámhosszú fénnel gerjesztjük?

475 nm - kék
vagy semmilyen??

19. Mi az a pHluorin? Miért hasznos a biológia számára?

A pHluorin egy **pH-érzékeny GFP**, mely fuzionálása különféle szinaptikus vezikula fehérjékkel lehetővé tette a **szinaptikus vezikulák** újrahasonításának valós időben történő **tanulmányozását**.

Amikor a vezikula **még nem fuzionált** az axon preszinaptikus membránjával, a **belső pH-ja 5.5** körüli, **megszünteti a fluoreszcens fehérje fluoreszcenciáját**. Amikor azonban a **vezikula a membránhoz kötődik** (neurotranszmitter-leadás), a **pH-értéke felugrik 7.4-re**, visszatér a **fluoreszcens képesség**. Követni lehet a **vezikulák ürülését** – a kiürülő vezikula elszíntelenedik.

20. Denaturálható-e a BSA? Indokold meg!

Ahogy **minden fehérje**, így a BSA is érzékeny a pH-változás okozta denaturációra.

A BSA fehérje denaturációja azonban nem fogja a fluoreszcencia kioltódását okozni.

21. Hány alakot képes kialakítani a BSA eltérő pH-szintek esetén?

A BSA egy dinamikus fehérje, ami azt jelenti, hogy eltérő pH-szintek mellett **5** különböző, reverzibilis konformációt képes felvenni.

1. *pH 4,3-8,0 N (normal)-forma*
2. *pH 2,7-4,3 F (fast)-forma*
3. *pH x - 2,7 E (expanded)-forma*
4. *pH 8,0-10,0 B (basic)-forma*
5. *pH 10,0- x A (aged)-forma*

22. Milyen fénnel kell megvilágítani a BSA-t, hogy foszforeszcenciát mutasson?

A foszforeszcencia független a gerjesztő fénytől. BSA nem foszforeszens fehérje?

23. Milyen fénnel kell megvilágítani a BSA-t, hogy fluoreszcenciát mutasson?

270-280nm ultraibolya spektrumú fénnel gerjeszthető, **emissziós csúcsa 360 nm**.

24.Milyen színtartományba eső emittált fényt fogunk látni, ha a BSA-t 600 nm hullámhosszú fénnel gerjesztjük?

700 nm - vörös

25.Milyen színtartományba esik a BSA emissziós csúcsa?

360 nm - **ibolya**

26.Miért hasznos a kinin az orvostudomány számára?

A **malária** mellett alkalmas egy, a **kullancsok által terjesztett betegség**, a **babéziózis kezelésére** is. Ezen kívül **lupus kezelésére** is használták.

27.Miért alkalmazzák vizes oldatban a kinin-szulfátot kinin helyett?

A **szulfát rész miatt jobban oldódik a vízben** mint a kinin (--> kénsav hozzáadásával lehet **vízoldékonyabbá** tenni)

28.A BSA-hoz és a GFP-hez képest hogyan denaturálódik a kinin savas közegben?

A **halogénsavak** (HCl, HBr, HI) **kioltják a kinin fluoreszcenciáját**. (kivéve HF)

29.Mit nevezünk statikus kvencselésnek?

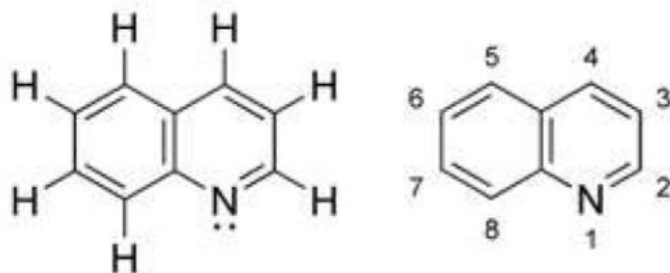
Statikus kvencselésről akkor beszélünk, amikor egy olyan **komplex jön létre**, még a **gerjesztés előtt**, mely **már nem képes a fluoreszcenciára**.

30.Mit nevezünk dinamikus kvencselésnek?

Dinamikusról kvencselésről akkor beszélhetünk, ha **egy donor és egy akceptor molekula**, a kettő között pedig **átadódik a gerjesztés által létrehozott energia**, ahol az **akceptor vagy teljesen kvencseli a fluoreszcenciát**, vagy **egy alacsonyabb energiát fog emittálni**.

31.Mit nevezünk kinolin gyűrűnek?

Heterociklusos aromás szerves vegyület, képlete: C_9H_7N



A kinolin gyűrű

32. Látunk-e fluoreszcenciát a kinin-szulfát oldatban, ha a megfelelő fénnel való gerjesztést megelőzően az oldathoz HF-t adunk? Milyen hullámhosszú fény lehet az említett megfelelő gerjesztés?

Igen, mert bár **halogenidek**, így a **halogénsavak is kioltják a molekula fluoreszcenciáját**, de ez alól a **HF (hidrogén-fluorid) kivétel**.

A gerjesztés 250 nm vagy 350 nm lehet. (emissziós csúcs 450nm)

33. Látunk-e foszforeszcenciát a kinin-szulfát oldatban, ha a megfelelő fénnel gerjesztjük?

Nem, mert nem tud az elektron csapdába esni.

34. **Kioltja-e a káliumion a kinin-szulfát fluoreszcenciáját?** Mely pozitív töltésű ionok oltják ki?

Nem, mert **pozitív töltésű**.

Az **Ag ion kvencselő hatású**.

35. Mely vegyületcsoportból származó anionok kvencselik a kinin-szulfát fluoreszcenciáját? Melyik ion kvencsel ezek közül a leginkább?

A **halogenid ionok**.

Jodid ion jelenlétében a **legerősebb a fluoreszcens jel kioltódása**.

(fluorid ion esetében a legkisebb)

36.Mi okozhatja a BSA 279 nm-es gerjesztési és 360-as emittálási csúcsait? **Hol lehetnek még esetleg kisebb csúcsok?**

A BSA fehérje denaturációja nem fogja a fluoreszcencia kioltódását okozni. Tehát nem a fehérje másod- vagy harmadlagos szerkezete, hanem az **elsődleges szerkezete ad magyarázatot a molekula fluoreszcens képességére.**

Kecskeméti Nelli:

A 66 fluoreszcens aminosav miatt:

~360nm: 17 hisztidin -360 nm

~279nm: 27 fenilalanin – 282 nm

20 tirozin – 303 nm

2 triptofán – 348 nm

kisebb csúcsok: *20 tirozin – 303 nm, 2 triptofán – 348 nm*

37.Gerjeszthető-e a BSA 220 nm hullámhosszú fénnel? **Miért?**

Igen a benne lévő **hisztidin is fluoreszcens aminosav, 220 nm csúcson gerjeszthető.**
Emissziója 448 nm.

38.Mi történik a híg kénsavban oldott kinin-szulfát fluoreszcenciájával, ha H_2CO_3 -at vegyítünk hozzá?

Megkülönböztetünk **gerjesztési és emissziós fluoreszcencia spektrumokat.**
Az **emissziós intenzitás érzékenyen reagál az oldószer pH-jára is.** Mivel **kinin és kénsav oldása során víz is keletkezett a szénsav azzal reagál.** Mind **savas, mind bázikus irányba el tudja tolni, de általában egyensúlyban marad.** Így valószínűleg **nem fog a fluoreszcencia változni.**