

Solu ja molekyylibiologian perusteet 2024 – harjoitus Biokemia 2

Biomolekyylin tunnistus

Molekyylikaavan vertailu

Olette saaneet puhdistettua biomolekyyliä ja haluatte selvittää, mistä aineesta on kyse. Biomolekyylin molekyylikaavaksi on ilmoitettu $C_{917}O_{292}N_{238}S_{11}H_{1418}$ ja moolimassaksi 20918,42 g/mol.

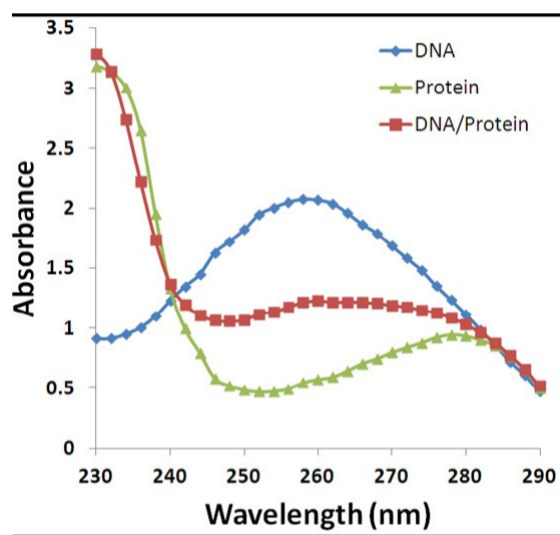
- Yksinkertaisten sokereiden molekyylikaava on tyypillisesti $C_nO_nH_{2n}$
- Proteiinien keskimääräinen suhteellinen molekyylikaava on $C_{131}O_{40}N_{37}SH_{210}$
- Tyypillinen triasyyliglyserolin molekyylikaava on $C_{47}O_6H_{92}$ ja fosfolipidin (PC18:0) $C_{26}O_6NH_{59}$
- 4 nukleotidin DNA pätkän molekyylikaava on suunnilleen $C_{39}O_{20}N_{15}P_4H_{26}$.

Voiko molekyylikaavan perusteella sanoa jotain biomolekyylin rakenteesta? Verratkaa atomien lukusuhteita ja kullekin makromolekyylille ominaisia atomeja.

Spektroskopia

Varmistaaksenne molekyylin tyyppin teette seuraavat kokeet:

1. testaatte biureetin menetelmällä kuparin sitoutumista peptidisidoksiin
2. analysoitte näytteen absorbanssia (valonimeytymistä) ultraviolettivalolla vertaamalla etenkin absorbanssia 280 nm aallonpituudella (jolloin absorptiota tapahtuu aromaattisiin molekyyliin) ja 260 nm aallonpituudella (jolloin DNA:n emäkset absorboivat valoa).



Biureetin testi antaa violetin värin ja näytteen absorbanssi on 280 nm alueella 0,2 ja 260 nm alueella 0,1.

Voiko testeillä varmistua biomolekyylin rakenteesta?

Aminohapposekvenssin määrittäminen

Olette varmistuneet biomolekyylin olevan proteiini ja haluatte tietää, millainen proteiini on kyseessä. Otatte biomolekyylistä näytteitä, joihin lisäätte joko syanobromidia (CnBr) tai trypsiiniä. Molemmat pilkkovat proteiineja ja peptideitä pienemmiksi: syanobromidi leikkaa metioniinin (M) C-terminaalin puolelta ja trypsiini lysiinin (K) ja arginiinin (R) C-terminaalin puolelta. Varmuuden vuoksi teette trypsiinillä leikkauksia eri pitoisuuksilla ja annatte entsyymin pilkkoa molekyylillä vaihtelevan ajan.

Erotatte toisistaan muodostuneet peptidit ja määritätte niiden aminohapposekvenssin Edmannin hajotuksella, jossa fenyyliisotiosyanaatti (C₆H₅N=C=S) leikkaa peptidistä N-terminaalin, joka voidaan määrittää.

Saatte edellisen tulokseksi sarjan lyhyitä peptidisekvenssejä, jotka loppuvat käytetyn entsyymin tunnistamaan aminohappoon.

Koska leikkaus tehdään kahdella entsyymillä, osa sekvensseistä jatkuu toisten päättyessä, jolloin saatte rakennettua niiden avulla koko sekvenssin. Vastaavalla tavalla yhdistetään esim. DNA-sekvenssejä. Muistakaa, että pienet <4 AH:n sekvenssit on jätetty epäluotettavina pois.

esim.

```
aaccggac      tatcgaatt
      ggacaacggttatcg
                aattggctc
```

Saatte aikaan seuraavanlaisia peptideitä. Järjestäkää peptidit oikeaan järjestykseen, jolloin saatte määritetyksi peptidin/proteiinin primaarirakenteen. Vinkki: Joukossa on muutama sekvenssi, jotka eivät pääty K, R, tai M kirjaimen – selvittäkää aluksi, miten se on mahdollista!

Trypsiini:

VCDSGNK

EYMGIEVYVEATLDEPLR

VEATLDEPLRQTTCESEIHK

QTTCESEIHK

YGASVSNGLNLSVDLLNCFNLFHTVGVYTNR

QTTCESEIHKYGASVSNGLNLSVDLLNCFNLFHTVGVYTNR

DTVYAK

FASL

Syanobromidi:

VCDSGNKEYM

FHTVGVYTNRDTVYAKFASL

Proteiinin tunnistus

Kirjoitatte primaarirakenteen hakukoneeseen, joka antaa oheisen tuloksen. Selvittäkää, mikä proteiini on kyseessä

LOCUS WEM03796 221 aa linear VRL 25-MAY-2023

DEFINITION Chemokine binding protein [Monkeypox virus].

ACCESSION WEM03796

VERSION WEM03796.1

DBSOURCE accession OQ570421.1

KEYWORDS .

SOURCE Monkeypox virus

ORGANISM Monkeypox virus

Viruses; Varidnaviria; Bamfordvirae; Nucleocytoviricota;

Pokkesviricetes; Chitovirales; Poxviridae; Chordopoxvirinae;

Orthopoxvirus.

REFERENCE 1 (residues 1 to 221)

AUTHORS Rueca,M., Tucci,F.G., Mazzotta,V., Gramigna,G., Gruber,C.E.M.,

Fabeni,L., Giombini,E., Matusali,G., Pinnetti,C., Mariano,A.,

Butera,O., Specchiarello,E., Mondi,A., Lanini,S., Carletti,F.,

Girardi,E., Vaia,F., Nicastrì,E., Antinori,A. and Maggi,F.

TITLE Temporal intra-host variability of mpox virus genomes in multiple
body tissues

JOURNAL J Med Virol 95 (5), e28791 (2023)

PUBMED 37226579

REFERENCE 2 (residues 1 to 221)

AUTHORS Rueca,M., Tucci,F.G., Gramigna,G., Gruber,C.E.M., Fabeni,L.,

Giombini,E., Butera,O., Matusali,G., Mazzotta,V., Pinnetti,C.,

Mariano,A., Mondi,A., Girardi,E., Vaia,F., Nicastrì,E., Antinori,A.

and Maggi,F.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-MAR-2023) Laboratory of Virology, National Institute
for Infectious Diseases 'L. Spallanzani' - IRCCS, 292, Portuense
street, Rome 00149, Italy

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..221

/organism="Monkeypox virus"

/isolate="INMI-22872022"

/isolation_source="oropharyngeal swab"

/host="Homo sapiens"

/db_xref="taxon:10244"

/geo_loc_name="Italy"

/collection_date="22-Aug-2022"

Protein 1..221

/product="Chemokine binding protein"

Region 32..220

/region_name="Orthopox_35kD"

/note="35kD major secreted virus protein; cl27443"

/db_xref="CDD:421501"

CDS 1..221

/gene="OPG170"

/locus_tag="NBT03_gp146"

/old_locus_tag="MPXV-M5312_HM12_Rivers-151"

/standard_name="OPG170 CDS"

/coded_by="complement(OQ570421.1:145345..146010)"

/note="Taxonomic breadth: chordopoxvirinae; Old product:

MPXVgp151; secreted protein reducing infiltration of

inflammatory cells into the infected area; Chemokine

binding protein; similar to VACV-WR A41L and VACV-Cop

A41L"

/db_xref="GeneID:72551562"

ORIGIN

1 myllfilmy llpfsftse paydksvcds gnkeymgiev yveatldepl rqtteseih

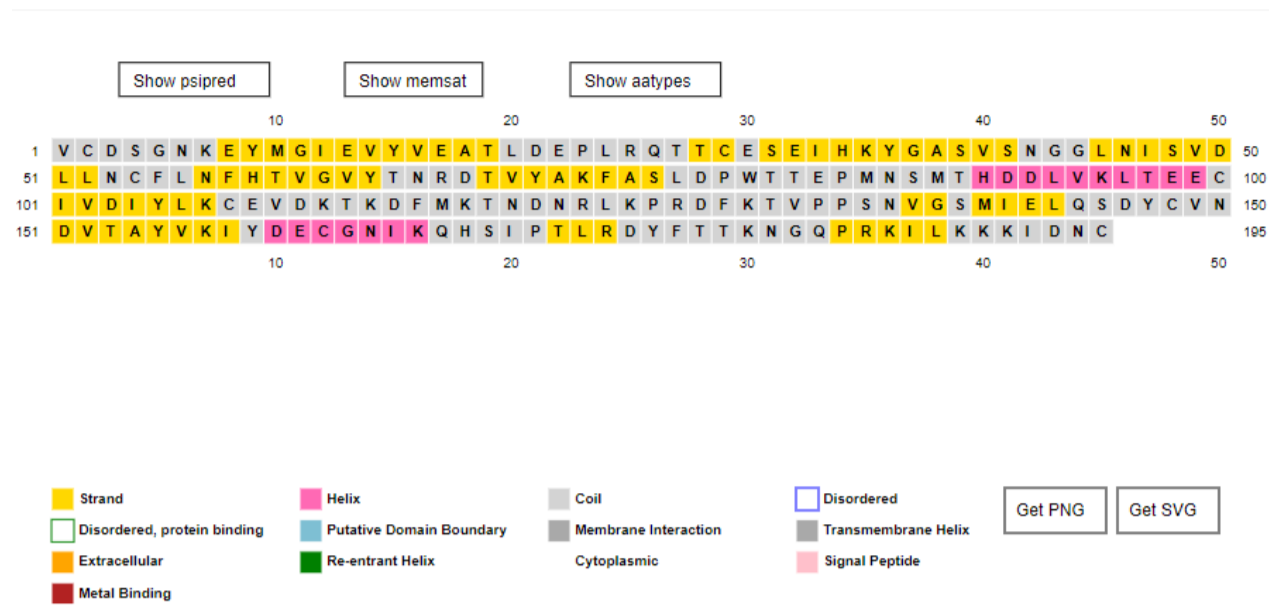
61 kygasvsngg Inisvdlnc flnfhtvgvy tnrdtyakf asldpwttep mnsnthddlv

121 klteecivdi ylkcevdtkk dfmktndnrl kprdfktvpp snvgsmielq sdycvndvta

181 yvkiydecgn ikqhsiptlr dyfttkngqp rkilkkkidn c

Proteiini rakenne

Käytätte sekundaarirakenteen arvioimisessa verkon kautta käytettävää ilmaista PSIPRED-ohjelmistoa, joka laskee proteiinin todennäköistä sekundaarirakennetta 10 minuutin ajan.



Merkitse sekvenssiin arvioidut sekundaarirakenteet ja värityä aminohapot: happamat punaisella, rikkiä sisältävät keltaisella, emäksiset sinisellä, muut hydrofiiliset vihreällä.

Rakenna peptidistä paperinen rakennemalli teippiä apuna käyttäen. Beta-säikeet muodostavat kaksi lähekkäin olevaa levyä: E34, N46, G48 ja E115 ovat vierekkäin vuorotellen erisuuntiin menevissä b-säikeissä. Tähän on kiinnittynyt Q148:n sisältävä säie Y109:ään viereen

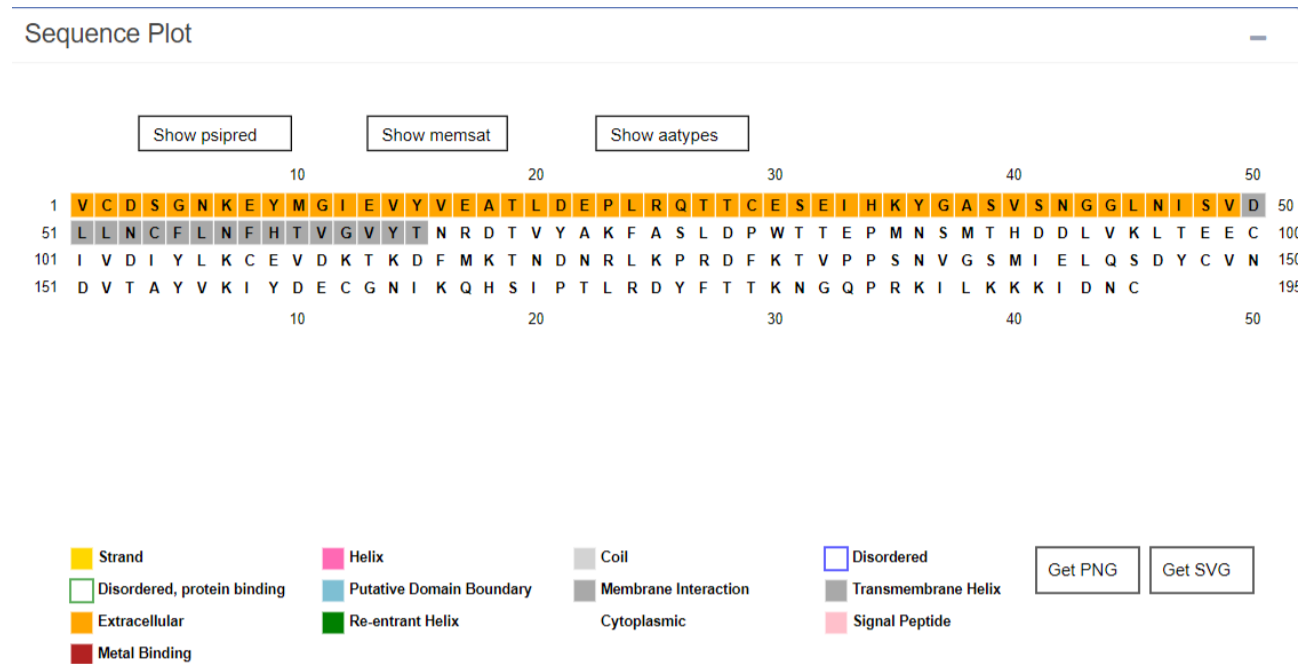
C154 ja D25 ovat vierekkäisiä samaan suuntaan meneviä säikeitä. niihin on kiinnittynyt T23:n kohdalta D72:n ja N70:n sisältävät säikeet ja T157:n kohdalta T183.n sisältävä betasäie

AMINOHAPPOTYYPPI	AMINOHAPOT
RIKKIÄ SISÄLTÄVÄT	C, M
HYDROFOBISET	A, G, F, I, L, P, V, W
HAPPAMAT	D, E
EMÄKSISET	H, K, R
MUUT HYDROFIILISET	N, Q, S, T, Y

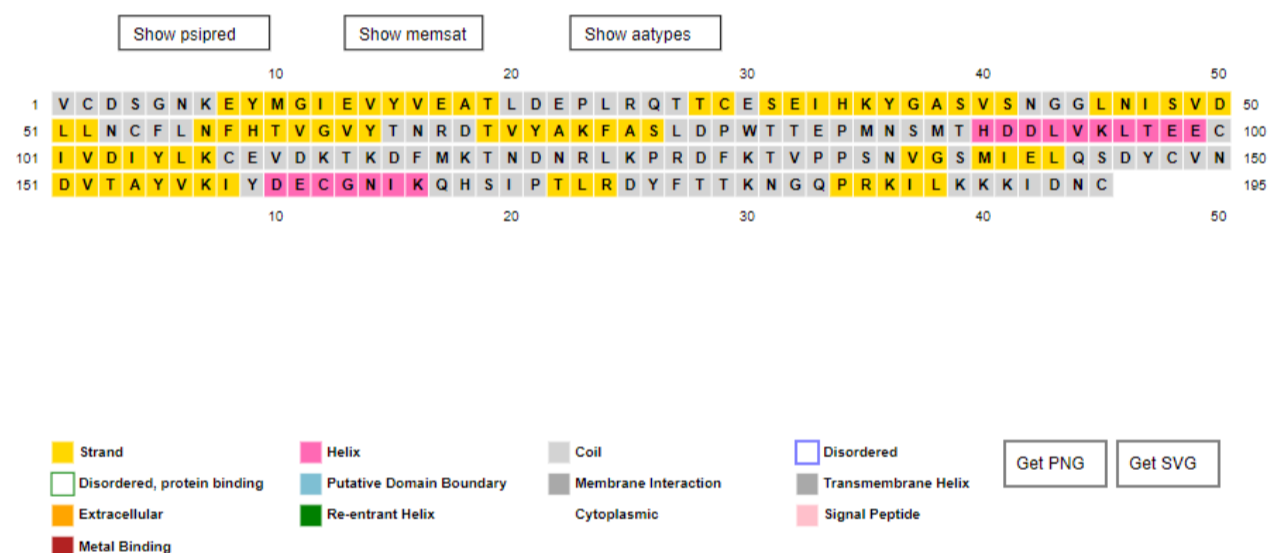
Hydrofobisuus

Sama ohjelma etsii rakenteesta myös hydrofobisia alueita. Kyseinen proteiini sisältää yhden solukalvoon liittyvän alueen, muttei esimerkiksi solukalvon läpi meneviä alfa-kiereteitä.

Merkitkää edellä rakentamaanne primaarisekvenssiin solukalvon kanssa vuorovaikuttava alue. Millaisia aminohappoja siinä on?



Käytätte sekundaarirakenteen arvioimisessa verkon kautta käytettävää ilmaista PSIPRED-ohjelmistoa, joka laskee proteiinin todennäköistä sekundaarirakennetta 10 minuutin ajan.



Merkitse sekvenssiin arvioidut sekundaarirakenteet ja väritä aminohapot: happamat punaisella, rikkiä sisältävät keltaisella, emäksiset sinisellä, muut hydrofiiliset vihreällä.

Rakenna peptidistä paperinen rakennemalli teippiä apuna käyttäen.

AMINOHAPPOTYYPPI	AMINOHAPOT
RIKKIÄ SISÄLTÄVÄT	C, M
HYDROFOBISSET	A, G, F, I, L, P, V, W
HAPPAMAT	D, E
EMÄKSISSET	H, K, R
MUUT HYDROFIILISSET	N, Q, S, T, Y

V C D S G N K E Y M G I E V Y V E A T L D

E P L R Q T T C E S E I H K Y G A S V S N

G G L N I S V D L L N C F L N F H T V G V

Y T N R D T V Y A K F A S L D P W T T E P

M N S M T H D D L V K L T E E C I V D I Y

L K C E V D K T K D F M K T N D N R L K P

R D F K T V P P S N V G S M I E L Q S D Y

C V N D V T A Y V K I Y D E C G N I K Q H

S I P T L R D Y F T T K N G Q P R K I L K

K K I D N C

Proteiinin atomirakenne

Testaatte NCBI:llä mahdollisia rakennetietoja proteiinistaja huomaatte, että proteiinin atomirakenne on jo selvitetty. Vastaako se manuaalisesti luomaanne mallia?



Molecular Graphic ?

A 3D ribbon diagram of a protein structure, colored in a vibrant magenta. The structure is complex, showing multiple alpha-helices and beta-strands. The ribbon is thick and has a slight transparency, allowing overlapping parts to appear darker. The background is solid black, making the magenta structure stand out prominently.

3D view full-featured 3D viewer

VCDSGNKEYMGIEVYVEATLDEPLRQTTCESEIHKYGASVSNGLNISVDLLNCFLNFHTVGVYTNRDTVYAKFASLDPWTT
EPMNSMTHDDLVLKLTCECIVDIYKCEVDKTKDFMKTNDNRLKPRDFKTVPPSNVGSMIELQSDYCVNDVTAYVKIYDECG
NIKQHSIPTLRDYFTTKNGQPRKILKKKIDNC

VCDSGNK

EYMGIEVYVEATLDEPLR

VEATLDEPLRQTTCESEIHK

QTTCESEIHK

YGASVSNGGLNISVDLLNCFLNFHTVGVYTNR

QTTCESEIHKYGASVSNGGLNISVDLLNCFLNFHTVGVYTNR

DTVYAK

FASL

VCDSGNKEYM

FHTVGVYTNRDTVYAKFASL

VCDSGNK

EYMGIEVYVEATLDEPLR

VEATLDEPLRQTTCESEIHK

QTTCESEIHK

YGASVSNGGLNISVDLLNCFLNFHTVGVYTNR

QTTCESEIHKYGASVSNGGLNISVDLLNCFLNFHTVGVYTNR

DTVYAK

FASL

VCDSGNKEYM

FHTVGVYTNRDTVYAKFASL