

M. Hryc

# Pomiar widma dichroizmu kołowego wybranych białek.

3 lutego 2025

## Spis treści

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <b>1. Opis metody</b>                | 1 |
| <b>2. Badane białka</b>              | 2 |
| 2.1. Lizozym białka kurzego          | 2 |
| 2.1.1. Informacje                    | 2 |
| 2.1.2. Funkcja                       | 2 |
| 2.1.3. Aktywność katalityczna        | 2 |
| 2.1.4. Struktura                     | 2 |
| 2.2. Albumina surowicy wołowej (BSA) | 2 |
| 2.2.1. Informacje                    | 2 |
| 2.2.2. Funkcja                       | 3 |
| 2.2.3. Struktura                     | 3 |
| 2.3. $\beta$ -laktoglobulina         | 3 |
| 2.3.1. Informacje                    | 3 |
| 2.3.2. Funkcja                       | 4 |
| 2.3.3. Struktura                     | 4 |
| <b>3. Procedura</b>                  | 4 |
| <b>4. Parametry pomiaru</b>          | 5 |
| 4.1. Jasco Spectra Measurement       | 5 |
| 4.2. CDSSTR, DichroWeb               | 5 |
| 4.3. BestSel                         | 6 |
| <b>5. Wykresy danych</b>             | 6 |
| <b>6. Przewidziana struktura</b>     | 6 |
| 6.1. Lizozym                         | 6 |
| 6.2. BSA                             | 6 |
| 6.3. $\beta$ -laktoglobulina         | 9 |
| <b>7. Dyskusja</b>                   | 9 |

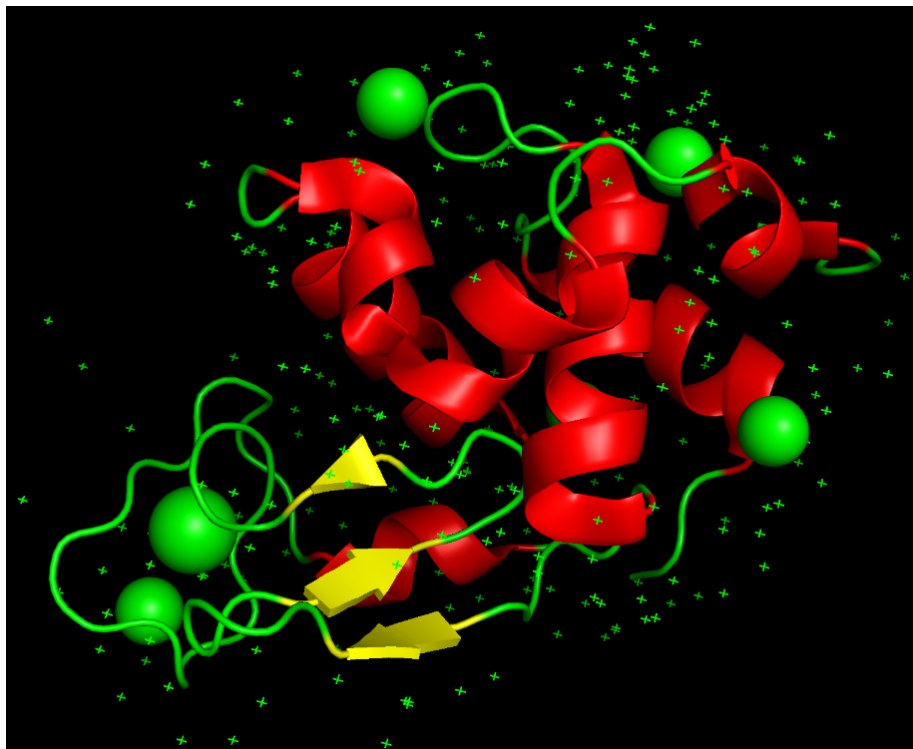
## 1. Opis metody

Spektroskopia dichroizmu kołowego polega na pomiarze różnicy absorbancji kołowo spolaryzowanego monochromatycznego światła lewo- i prawoskrętnego. Wartość dichroizmu kołowego jest wyrażana jako różnica molowych współczynników ekstynkcji dla światła lewo- i prawoskrętnego, lub eliptyczność molowa:

$$\Delta\epsilon = \Delta\epsilon - \Delta\epsilon_R$$

$$[\theta] = 3298\Delta\epsilon$$

Poziom absorpcji światła lewo- i prawoskrętnego jest zależny od sprzężenia ekscytonowego sąsiadujących chromoforów w obrębie cząsteczki [Telfer et al., 2011]. CD pozwala więc na odróżnienie konformacji (struktury drugorzędowej) polipeptydów (helisy  $\alpha$ , arkusze  $\beta$ ) oraz na wyznaczenie procentowego wkładu jakie dany tym struktury drugorzędowej ma w całkowitą strukturę białka.



Rysunek 1: Struktura lizozymu, białka składającego się z różnych struktur drugorzędowych. Numer akcesyjny: 1IEE.

## 2. Badane białka

### 2.1. Lizozym białka kurzego

#### 2.1.1. Informacje

Abs 0.1 % (=1 g/l) 2.338,  
Length 147,  
Mass (Da) 16 239.  
Sekwencja

MRSLLILVLCFLPLAALGKVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTDYGILQINSRW  
WCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNC AKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCRL

#### 2.1.2. Funkcja

Kataliza hydrolizy ściany komórkowej bakterii (właściwości bakteriolityczne)

#### 2.1.3. Aktywność katalityczna

Hydroliza wiązań między kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetylo-D-glukozaminą w peptydoglikanie, oraz między N-acetylo-D-glukozaminami w chitodekstrynach. link UniProt

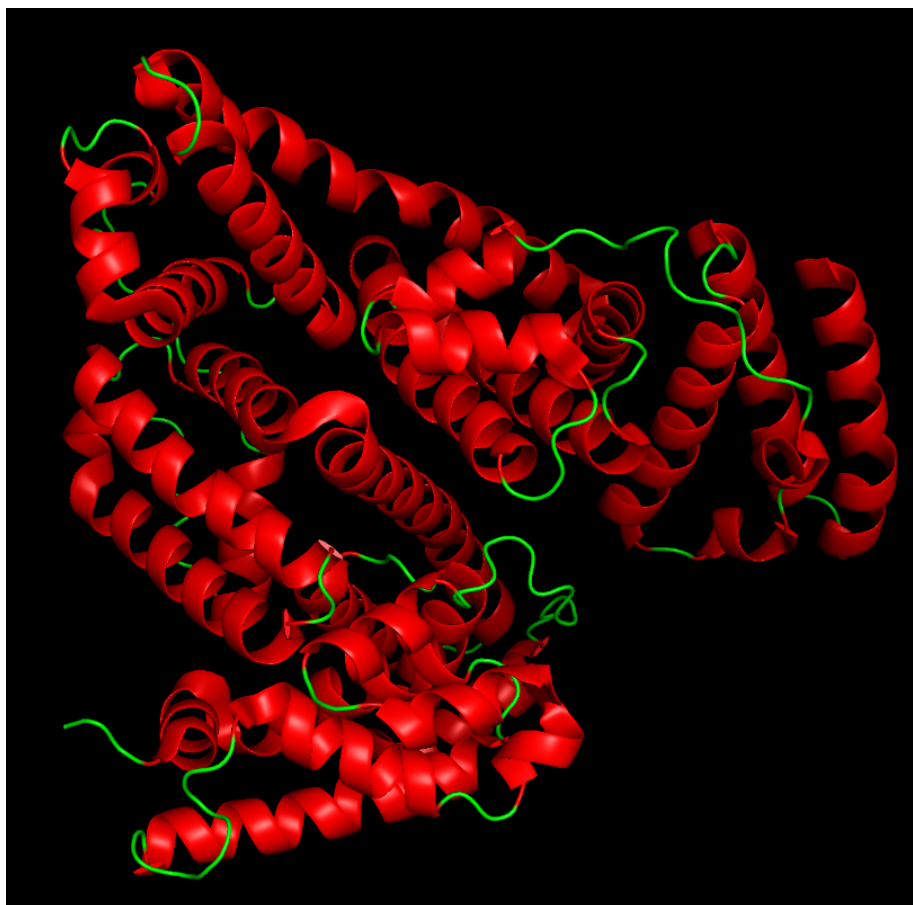
#### 2.1.4. Struktura

Większość struktury stanowią helisy  $\alpha$  oraz pętle, ale obecny jest też mały antyrównoległy arkusz  $\beta$ .

### 2.2. Albumina surowicy wołowej (BSA)

#### 2.2.1. Informacje

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.690,  
Length 607,



Rysunek 2: Struktura BSA, białka składającego się głównie z helis  $\alpha$  oraz łączących je pętli. Numer akcesyjny: 8WDD.

Mass (Da) 69 293.

Sekwencja

MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVLNELTEFAKTCVAD  
 ESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHKDDSPDLPKLKPDPTLNCDEFKADEKKFWGK  
 YLYEIAARRHPYFYAPELLYYANKYNGVFQECCQAEDKGACLLPKIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGERALKAWSVA  
 RLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTQVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPPLEKSHCIAEVEKDA  
 IPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAQDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAADDPHACYSTVFDKL  
 KHLVDEPQNLIKQNCDFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLIL  
 NRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKP  
 KATEEQLKTMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA

### 2.2.2. Funkcja

Regulacja ciśnienia osmotycznego krwi. Główny transporter cynku, magnezu i wapnia w osoczu. link UniProt

### 2.2.3. Struktura

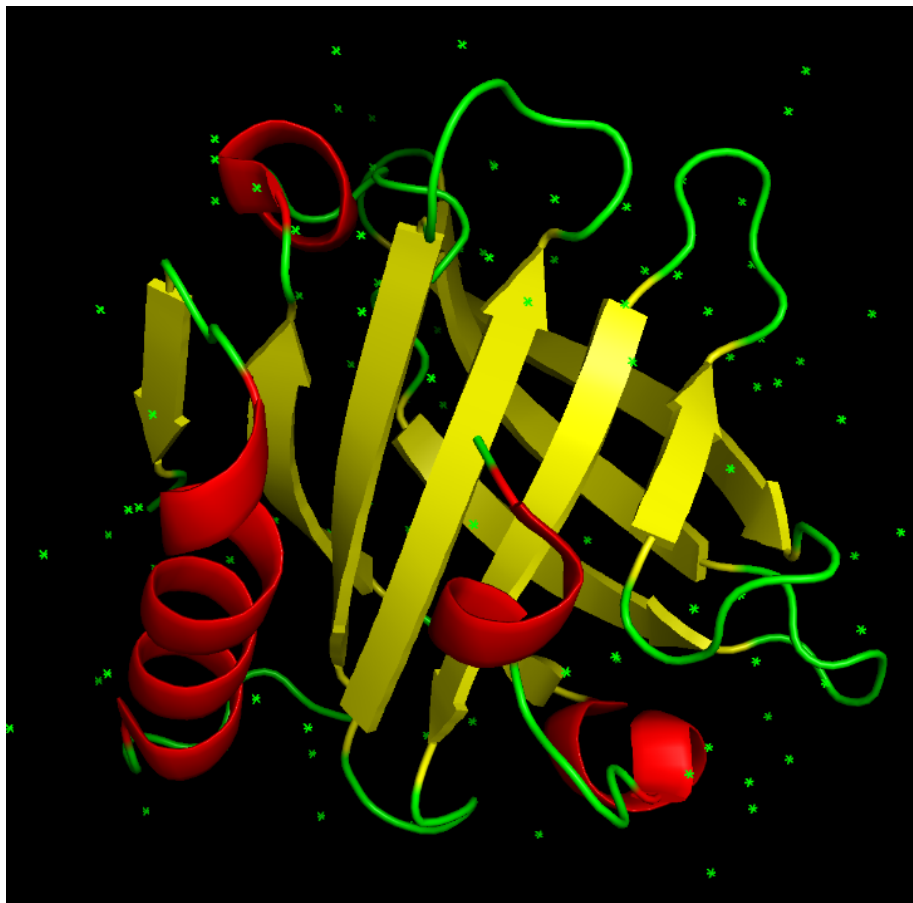
Białko składa się z 583 aminokwasów. W strukturze nie występują arkusze  $\beta$ . Większość struktury stanowią helisy  $\alpha$  połączone pętlami różnej długości.

## 2.3. $\beta$ -laktoglobulina

### 2.3.1. Informacje

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.853,

Length 178,



Rysunek 3: Struktura  $\beta$ -laktoglobuliny, białka składającego się w dużej mierze z akuszy  $\beta$ . Numer akcesyjny: 1B8E.

Mass (Da) 19 883.

Sekwencja:

MKCLLLALALTCGAQALIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQKWENG  
ECAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKYLLFCMENSAEPEQSLACQLVRTPEVDDEALEKFDKALKALP  
MHIRLSFNPTQLEEQCHI

### 2.3.2. Funkcja

Wiąże retinol i prawdopodobnie bierze udział w jego transporcie. link Uni-Prot

### 2.3.3. Struktura

Większość struktury stanowią arkusze  $\beta$ , obecne są też małe helisy  $\alpha$  oraz krótkie pętle.

## 3. Procedura

Do probówek eppendorf naważono około 3 mg białka i rozpuszczono 1 ml wody MiliQ. Próby wirowano przez 10 minut w 4 °C przy 14000 rpm. Następnie zebrano supernatant i przeniesiono do czystej probówki eppendorf. Za pomocą spektrofotometru DeNovix zmierzono absorbancję przy  $\lambda = 280$  nm. Zapisano wartość uśrednioną z trzech pomiarów. Dla sekwencji białek pobranych z Uni-Prot za pomocą narzędzia ProtParam obliczono wartości Abs 0.1 %. Otrzymane wyniki podzielono przez odpowiednie wartości obliczonych Abs 0.1 %. 300  $\mu$ l

roztworu o stężeniu  $0.3 \frac{mg}{ml}$ . Stężenie molowe obliczono korzystając z masy białek podanej w UniProt korzystając z narzędzia Molarityform. Liczbę wiązań peptydowych uzyskano przez odjęcie 1 od długości białek podanej w UniProt.

Wykonano widma CD dla rozpuszczalnika ( $H_2O$ ), Lizozymu, BSA i  $\beta$ -laktoglobuliny.

## 4. Parametry pomiaru

### 4.1. Jasco Spectra Measurement

#### General

Start: 260 nm

End: 185 nm

Sensitivity: Standard

D.I.T.: 2 sec

Band width: 1.00 nm

Data pitch: 0.5 nm

Start mode: immediately

Scanning mode: Continuous

Scanning speed: 50 nm/min

Accumulation: [tak]

Accumulations: 10

#### Control

Correction: None

Shutter is opened and closed automatically: [tak]

#### Information

Comment: 0,3 mg/ml

Solvent: H2O

Display the [Comment] dialog box before measurements: [tak]

#### Data

Auto save: [tak]

Format: Sample-No.

Send data to Spectra Analysis: [tak]

Widma BSA i  $\beta$ -laktoglobuliny dodatkowo wygładzono.

### 4.2. CDSSTR, DichroWeb

File Format: FREE (with preview)

Input Units: mean residue ellipticity

Initial Wavelength (nm): 260

Finale Wavelength (nm): 185

Wavelength Step (nm): 0.5

Lowest nm datapoint to use in the analysis: 185

Analysis Programme: CDSSTR

Reference Set: Set 3 (Optimised for 185-240 nm)

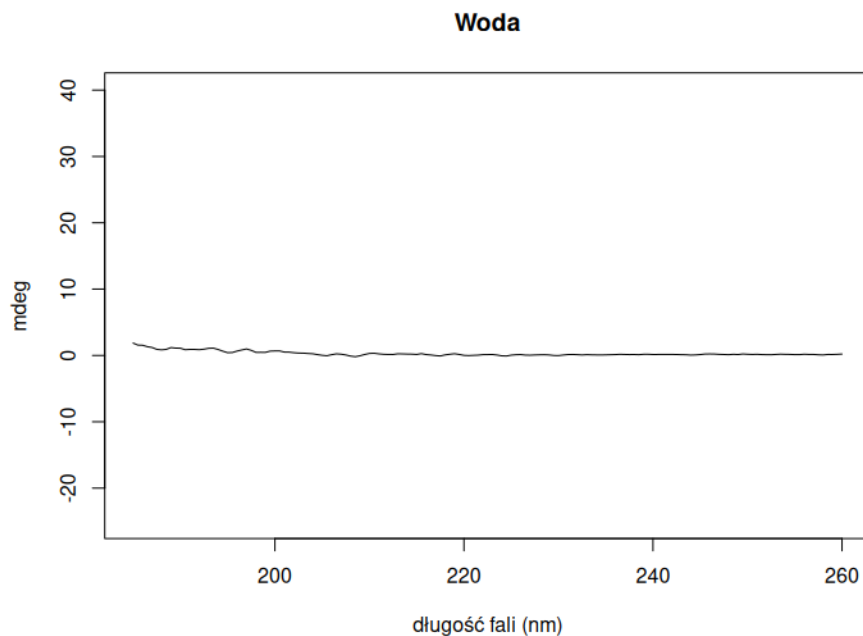
Optional Scalling Factor: 1.0

Output Units: mean residue elipticity

Mean Residue Weight (daltons): 111.703

Protein Concentration (mg/ml): 0.3

Path Length: 0.05



Rysunek 4: Widmo CD wody.

#### 4.3. BestSel

Długość optyczna 0.05 cm. Liczba łańcuchów bocznych zgodnie z informacjami zawartymi w sekcji dot. struktury i funkcji badanych białek. Stężenie molowe obliczono wykorzystując masy białek z UniProt.

## 5. Wykresy danych

## 6. Przewidziana struktura

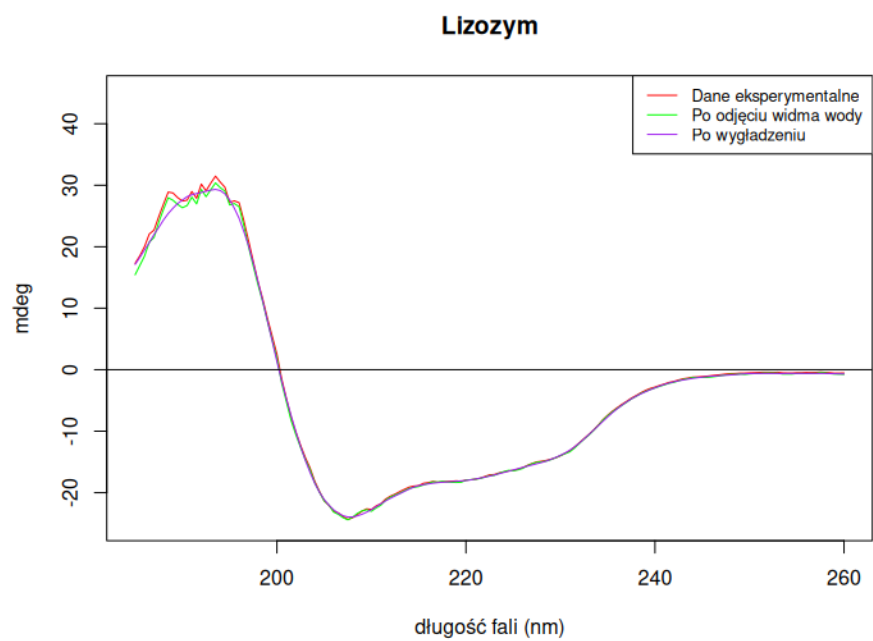
W tabelkach porównano udział struktur drugorzędowych w strukturze białka przewidziany przez BestSel i CDSTTR z wartościami podanymi przez PDBSums (podaje informacje o helisach 3-10, natomiast o pętlach nie, więc nie uwzględniono tej wartości w tabelkach).

#### 6.1. Lizozym

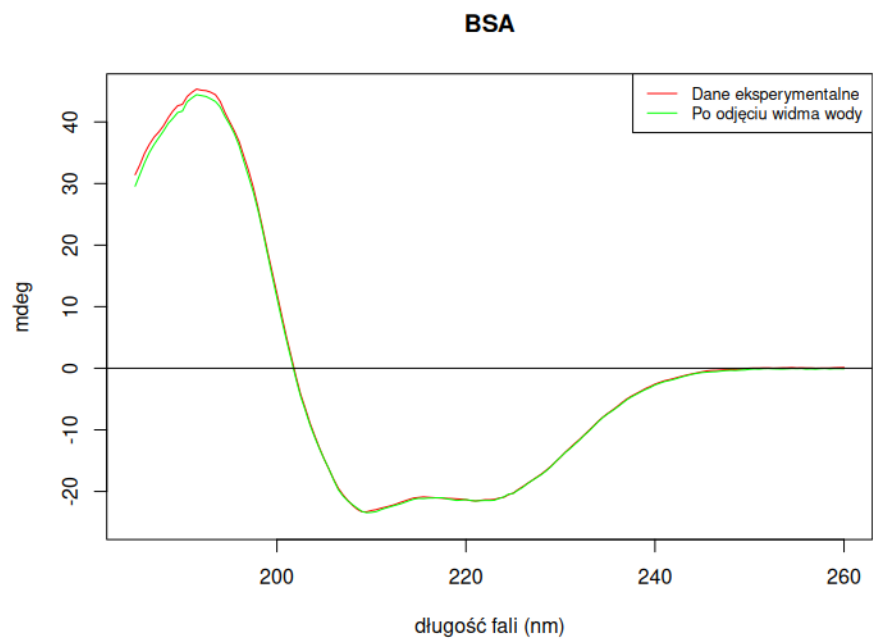
| Struktura drugorzędowa | CDSSTR | BestSel | PDBSums |
|------------------------|--------|---------|---------|
| $\alpha$ -helisy       | 54 %   | 39 %    | 30.2 %  |
| $\beta$ -arkusze       | 8 %    | 2.5 %   | 6.2 %   |
| zwroty                 | 20 %   | 13.6 %  | -       |
| inne                   | 18 %   | 44.8 %  | 52.7 %  |

#### 6.2. BSA

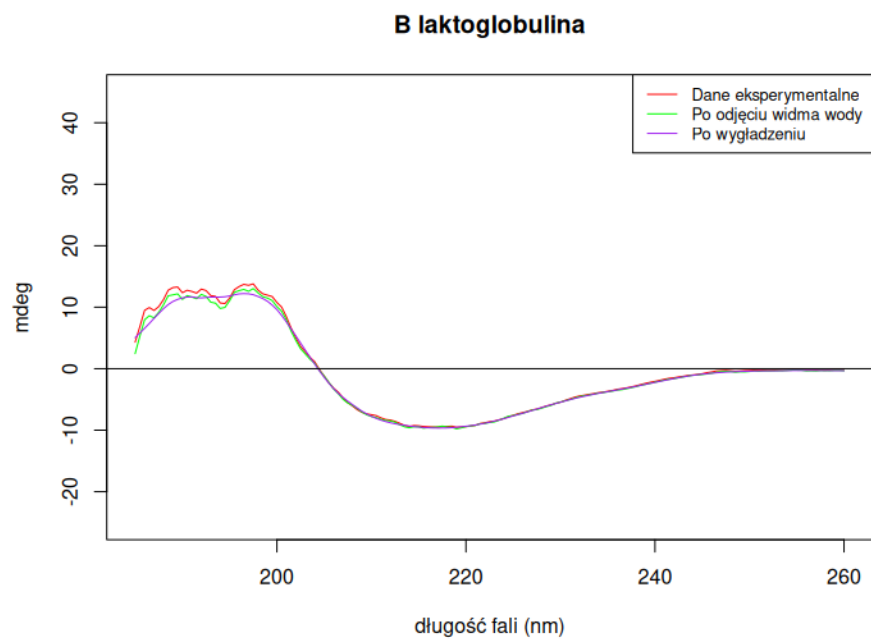
| Struktura drugorzędowa | CDSSTR | BestSel | PDBSums |
|------------------------|--------|---------|---------|
| $\alpha$ -helisy       | 57 %   | 45.8 %  | 69.4 %  |
| $\beta$ -arkusze       | 9 %    | 11 %    | 0 %     |
| zwroty                 | 13 %   | 11.6 %  | -       |
| inne                   | 22 %   | 31.5 %  | 27.5 %  |



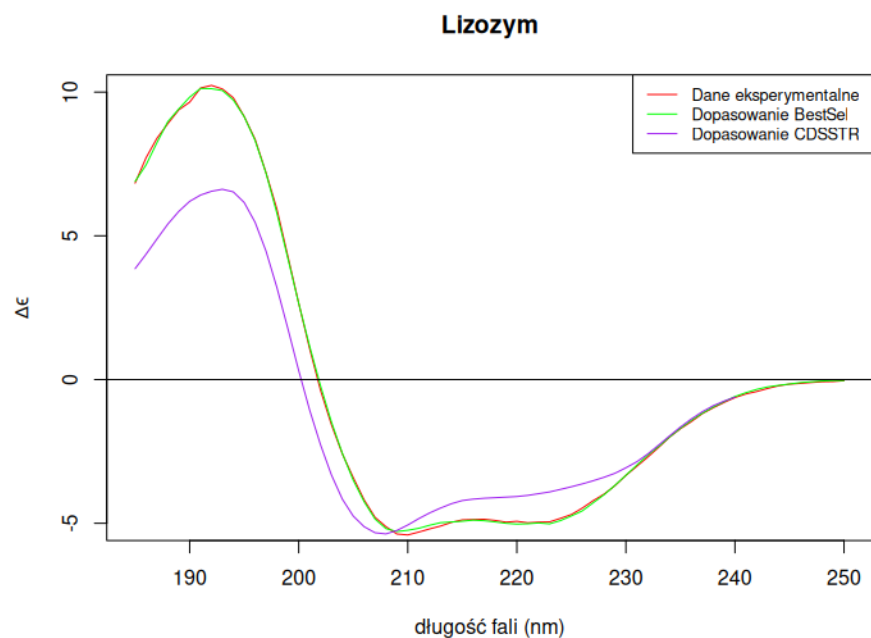
Rysunek 5: Widma CD lizozymu, przed i po odjęciu widma wody oraz po wygładzeniu.



Rysunek 6: Widma CD BSA, przed i po odjęciu widma wody.

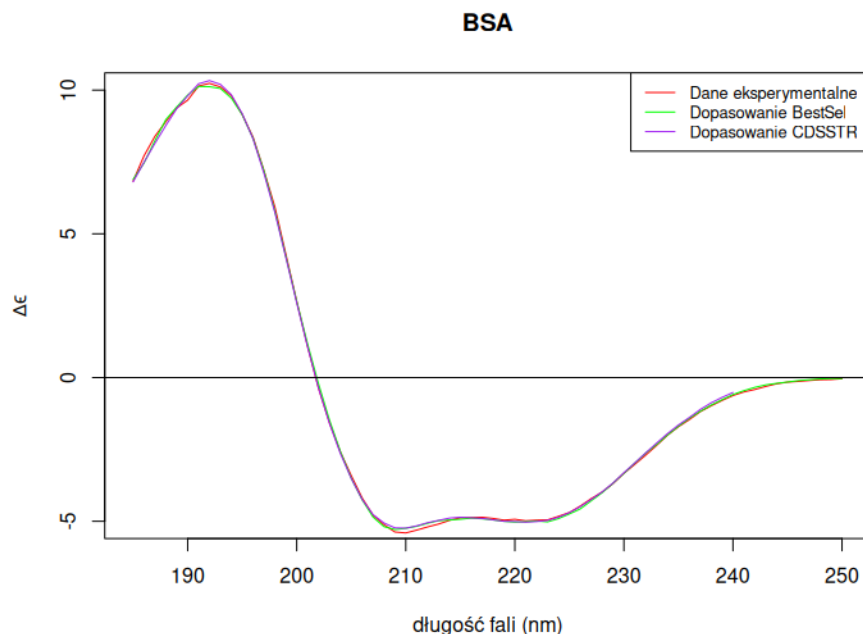


Rysunek 7: Widma CD  $\beta$ -laktoglobuliny, przed i po odjęciu widma wody, oraz po wygładzeniu.



Rysunek 8: Porównanie dopasowania CDSSTR i BestSel z danymi eksperymentalnymi.





Rysunek 9: Porównanie dopasowania CDSSTR i BestSel z danymi eksperymentalnymi.

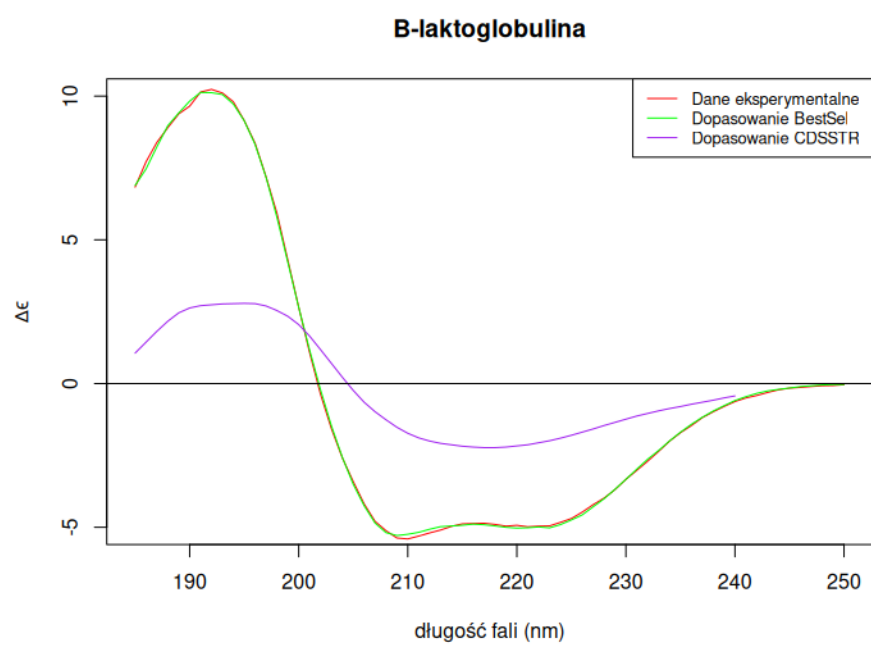
### 6.3. $\beta$ -laktoglobulina

| Struktura drugorzędowa | CDSSTR | BestSel | PDBSums |
|------------------------|--------|---------|---------|
| $\alpha$ -helisy       | 7 %    | 7.2 %   | 8.6 %   |
| $\beta$ -arkusze       | 39 %   | 36.8 %  | 44.7 %  |
| zwroty                 | 23 %   | 13.1 %  | -       |
| inne                   | 31 %   | 42.9 %  | 40.8 %  |

## 7. Dyskusja

Pomiar i interpretacja widma CD pozwala na oszacowanie udziału określonych struktur drugorzędowych w ogólnej strukturze białka. Na podstawie uzyskanych wartości i porównania z danymi z PDB można stwierdzić, że metoda nie jest zbyt precyzyjna, i pozwala określić udział struktur drugorzędowych tylko z grubsza. przykładowo, w przypadku BSA zarówno BestSel jak i DichroWeb podają ok. 10 %  $\beta$ -arkuszy natomiast faktyczna struktura jest ich pozbawiona.

BestSel zwraca dobre dopasowanie do danych eksperymentalnych, natomiast w przypadku Lizozymu i  $\beta$ -laktoglobuliny dopasowanie CDSSTR wyraźnie odstaje. Krzywe tych dopasowań wydają się być przeskalowane (taki sam kształt jak dopasowanie BestSel ale zmniejszony zakres wartości).



Rysunek 10: Porównanie dopasowania CDSSTR i BestSel z danymi eksperymentalnymi.