

M. Hryc

# Pomiar widma dichroizmu kołowego wybranych białek.

6 marca 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	2
2.2.3. Struktura	2
2.3. $\beta$ -laktoglobulina	2
2.3.1. Informacje	2
2.3.2. Funkcja	5
2.3.3. Struktura	5
<b>3. Procedura</b>	5
<b>4. Parametry pomiaru</b>	6
4.1. Jasco Spectra Measurement	6
4.2. CDSSTR, DichroWeb	6
4.3. BestSel	7
<b>5. Wykresy danych</b>	7
<b>6. Przewidziana struktura</b>	7
6.1. Lizozym	7
6.2. BSA	7
6.3. $\beta$ -laktoglobulina	10
<b>7. Dyskusja</b>	10

## 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.

## 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  
WCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNCAKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGRL

#### 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 chitodekstrinach. 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,  
Mass (Da) 69 293.  
Sekwencja

MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVLNELTEFAKTCVAD  
ESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCQEPERNECFLSHKDDSPDLPKLKPDPNTLCDEFKADEKKFWGK  
YLYEIIARRHPYFYAPELLYYANKYNGVFQECQAEDKGACLLPKIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGERALKAWSVA  
RLSQKFPAEFVEVTKLVTDLT KVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDA  
IPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAQDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLECCAKDDPHACYSTVFDKL  
KHLVDEPQNLIKQNCQDFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLIL  
NRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKP  
KATEEQKLTVMENFVAFVDKCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA

#### 2.2.2. Funkcja

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

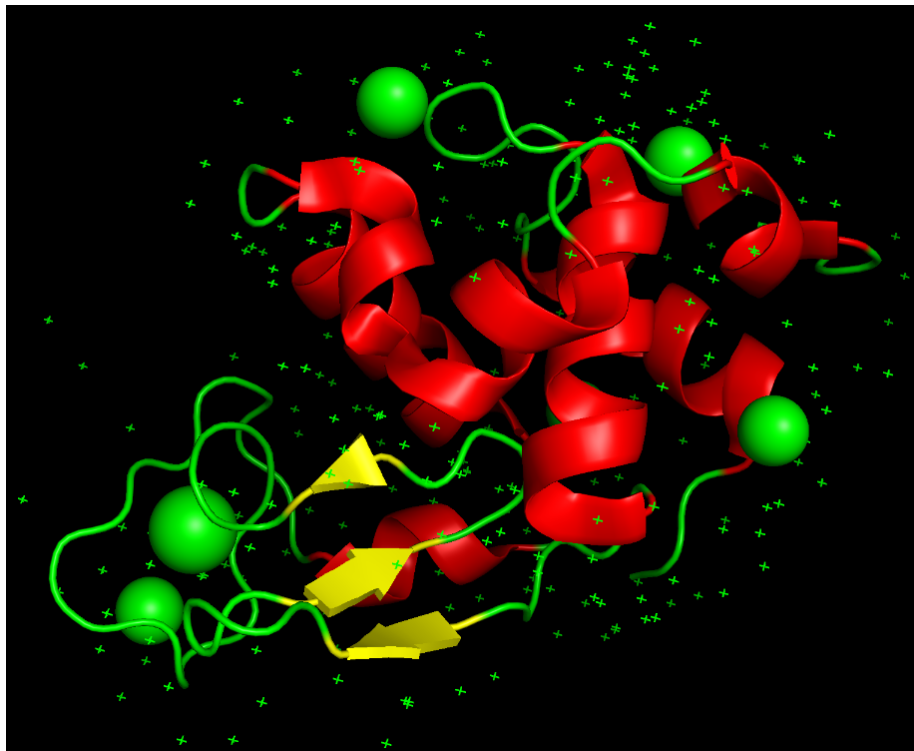
#### 2.2.3. Struktura

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

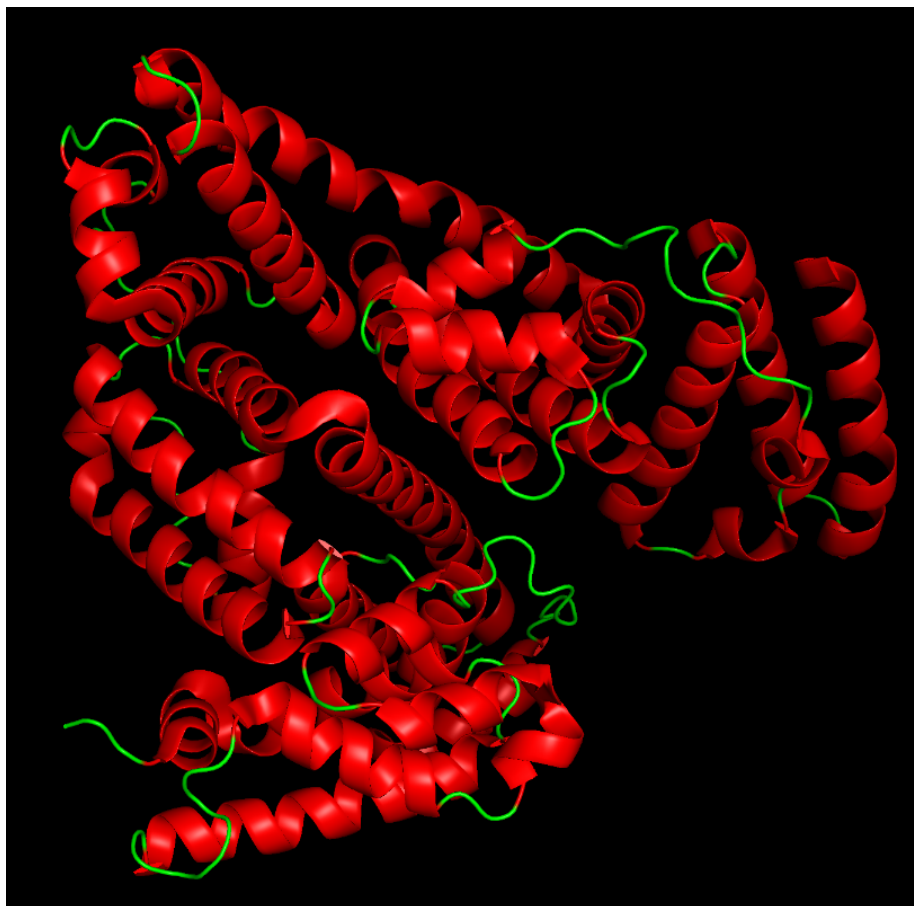
### 2.3. $\beta$ -laktoglobulina

#### 2.3.1. Informacje

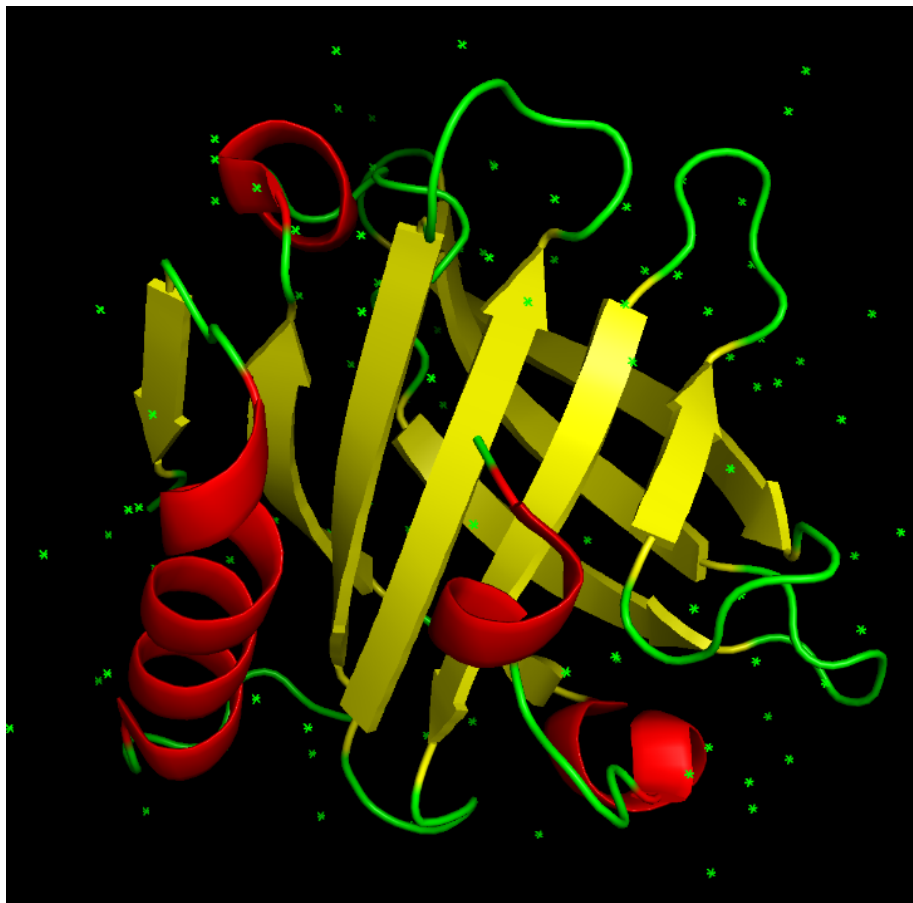
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.853,  
Length 178,  
Mass (Da) 19 883.  
Sekwencja:



Rysunek 1: Struktura lizozymu, białka składającego się z różnych struktur drugorzędowych. Numer akcesyjny: 1IEE. Procedura krystalizacji: Metoda: Counter-Diffusion in modified APCF reactors; pH: 4.5; Temp. (K): 293; Opis: Crystallisation took place in the european space agency (ESA) advanced protein crystallisation facility (APCF) onboard the nasa space shuttle's sts-95 mission. A new apcf reactor with a long protein chamber (67 mm) was designed to perform crystallization using the counter-diffusion method under microgravity conditions. The protein chamber was filled with a solution of 99 mg/ml of hen egg white lysozyme (supplied by seikagaku, batch number 100940, lot E96302) dissolved in 0.05 M acetate buffer (pH 4.5). the salt chamber contained 20% w/v NaCl and 0.05 M acetate buffer (pH 4.5). the rotatory plug connecting the protein and the salt chambers was filled with 10% w/v NaCl, 0.5% w/v agarose gel and 0.05 M acetate buffer. Crystallisation took place in microgravity at  $20 \pm 0.1$  C., Counter-Diffusion in modified APCF reactors, temperature 293K



Rysunek 2: Struktura BSA, białka składającego się głównie z helis  $\alpha$  oraz łączących je pętli. Numer akcesyjny: 8WDD. Procedura krystalizacji: Metoda: VAPOR DIFFUSION; Temp. (K): 291.15; Opis: 0.2M CaAC2, 22% PEG3350, 0.1M Tris pH6.0



Rysunek 3: Struktura  $\beta$ -laktoglobuliny, białka składającego się w dużej mierze z akruszy  $\beta$ . Numer akcesyjny: 1B8E. Procedura krystalizacji: Metoda: VAPOR DIFFUSION, HANGING DROP; pH: 7.9; Opis: METHOD IN PRESENCE OF AMMONIUM SULPHATE 2.5 M, 180MM TRIZMA BUFFER AT A PROTEIN CONCENTRATION OF 20MG/ML, pH 7.9, VAPOR DIFFUSION, HANGING DROP

MKCLLLALALTCGAQALIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQKWENG  
ECAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKYLLFCMENSAEPEQSLACQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALP  
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)

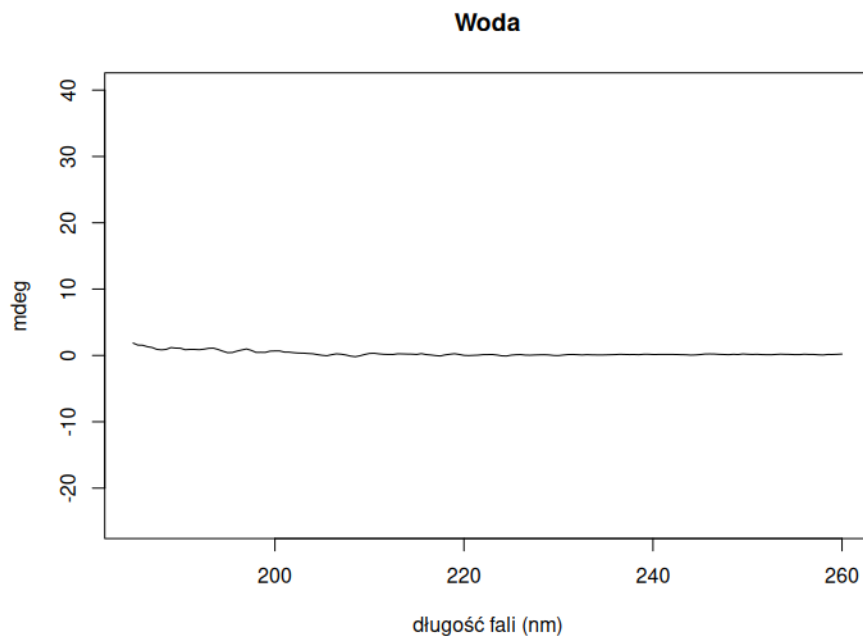
Optional Scalling Factor: 1.0

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

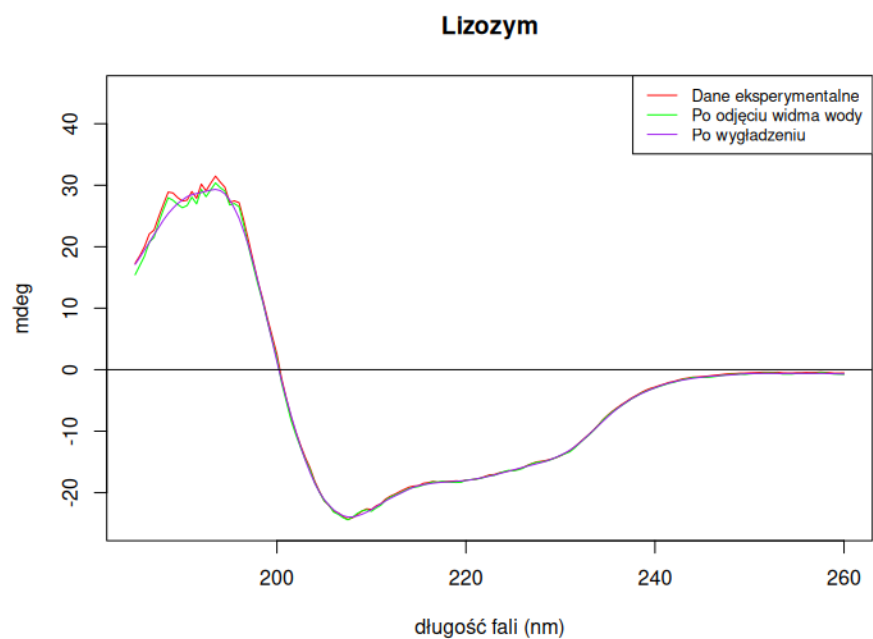
W tabelkach porównano udział struktur drugorzędowych w strukturze białka przewidziany przez BestSel i CDSTTR z wartościami podanymi przez PDBSums (podaje informacje o helisach 3-10, natomiast o pętlach nie, więc nie uwzględniono tej wartości w tabelkach).

#### 6.1. Lizozym

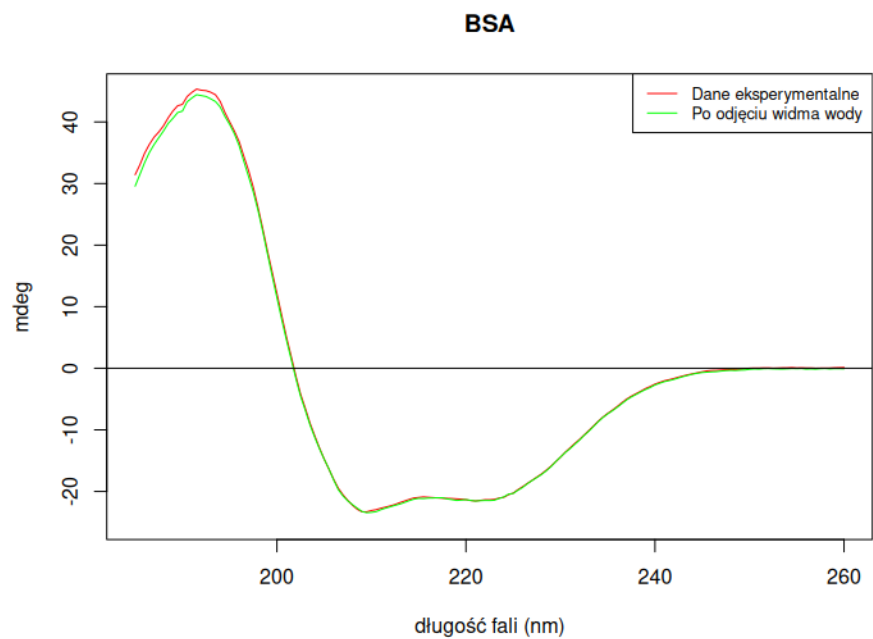
Struktura drugorzędowa	CDSSTR	BestSel	PDBSums
$\alpha$ -helisy	54 %	39 %	30.2 %
$\beta$ -arkusze	8 %	2.5 %	6.2 %
zwroty	20 %	13.6 %	-
inne	18 %	44.8 %	52.7 %

#### 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 %

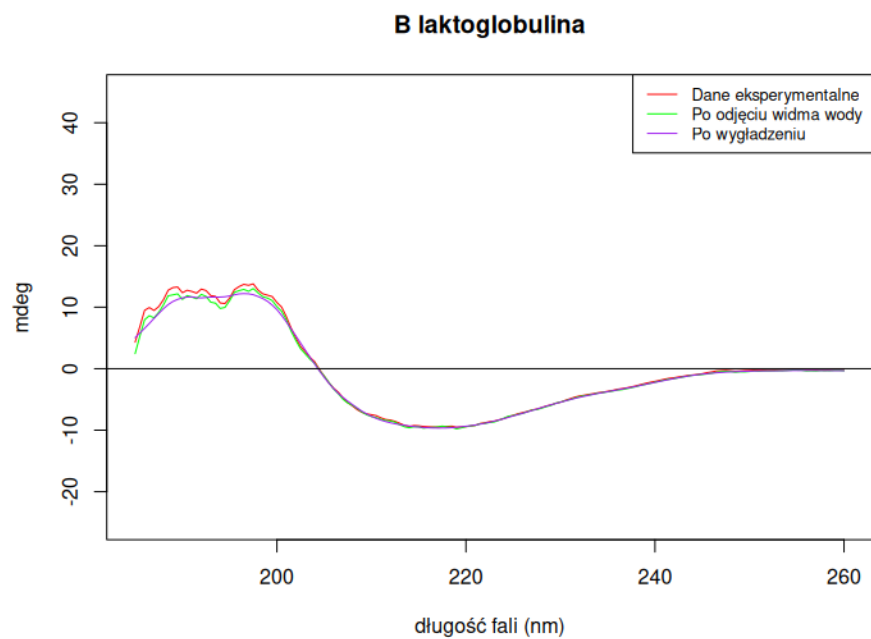


Rysunek 5: Widma CD lizozymu, przed i po odjęciu widma wody oraz po wygładzeniu.

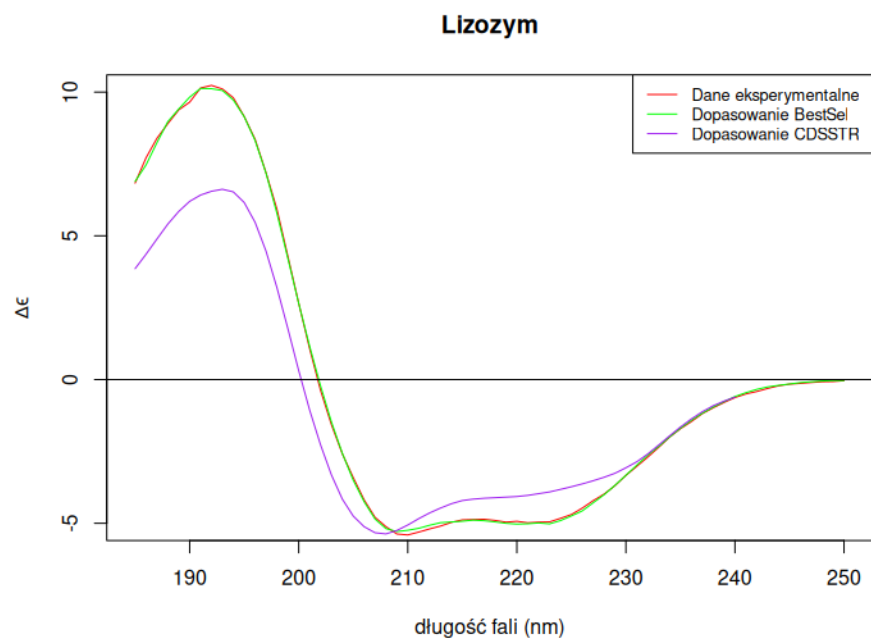


Rysunek 6: Widma CD BSA, przed i po odjęciu widma wody.

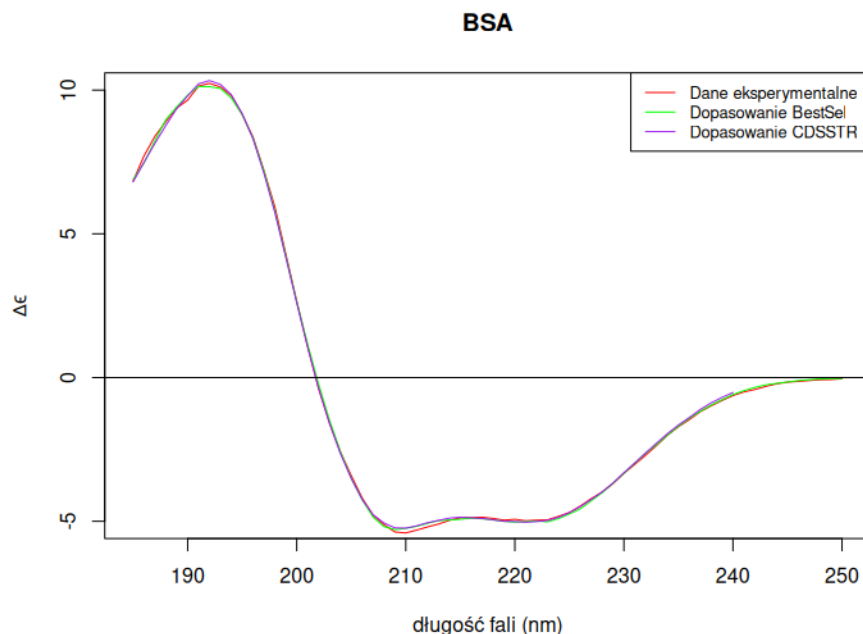




Rysunek 7: Widma CD  $\beta$ -laktoglobuliny, przed i po odjęciu widma wody, oraz po wygładzeniu.



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



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

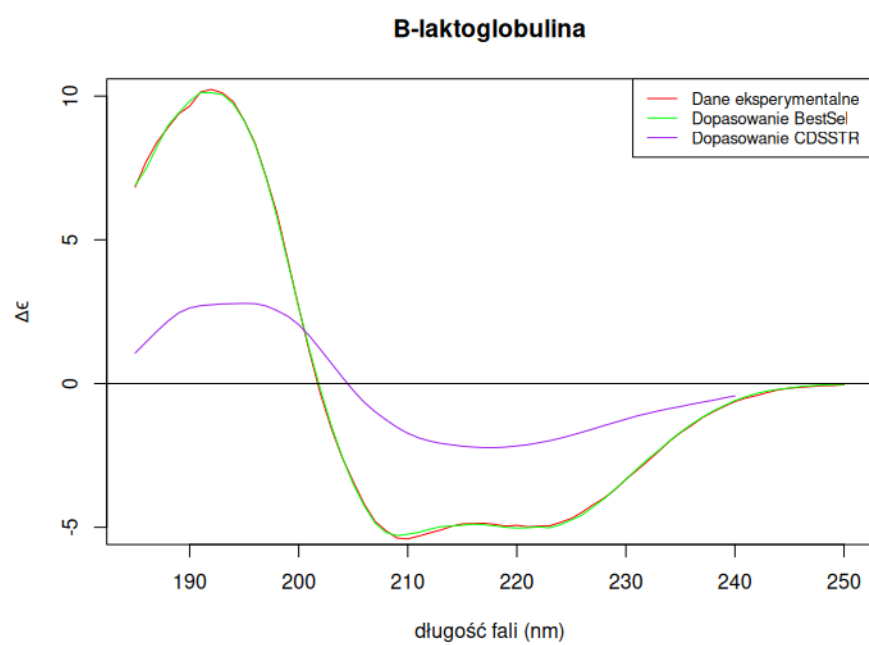
### 6.3. $\beta$ -laktoglobulina

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.