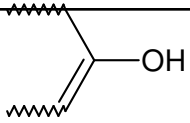

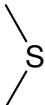
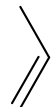


Célcsoportok

Funkciós csoport	Fehérjék	Szénhidrátok	Nukleinsavak	Lipidek
-NH ₂	α(N), Lys	+ (N-glikozid)	-	+ Ser, etanol amin
-COOH/-PO(OH) ₂	α(C), Glu, Asp	-	+ 5'	+ Ser, zsírsavak
-CHO	-	+	-	
-OH	Ser, Thr	+ primer, szekunder (O-glikozid)	+ szekunder 3'	+ glicerin, inozitol, ganglioizid
	Tyr	-	-	-
	Cys	-	-	-
	Met	-	-	-



Funkciós csoport	Fehérjék	Szénhidrátok	Nukleinsavak	Lipidek
------------------	----------	--------------	--------------	---------



Phe

-

-

-

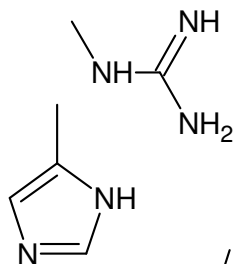
-CONH₂

Gln, Asn

-

-

-

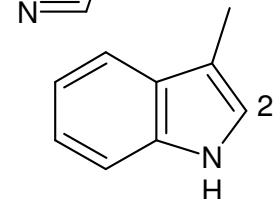


Arg

-

-

-

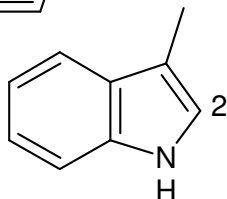


His

-

-

-

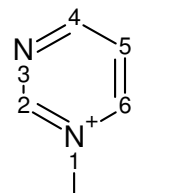


Trp

-

-

-

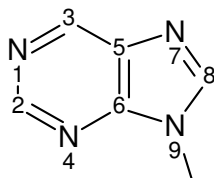


-

-

+4,6 S_N
+2,3,4(5) S_E

-



-

-

+2,6,8 S_N
+1,3,4,7,8 S_E

-



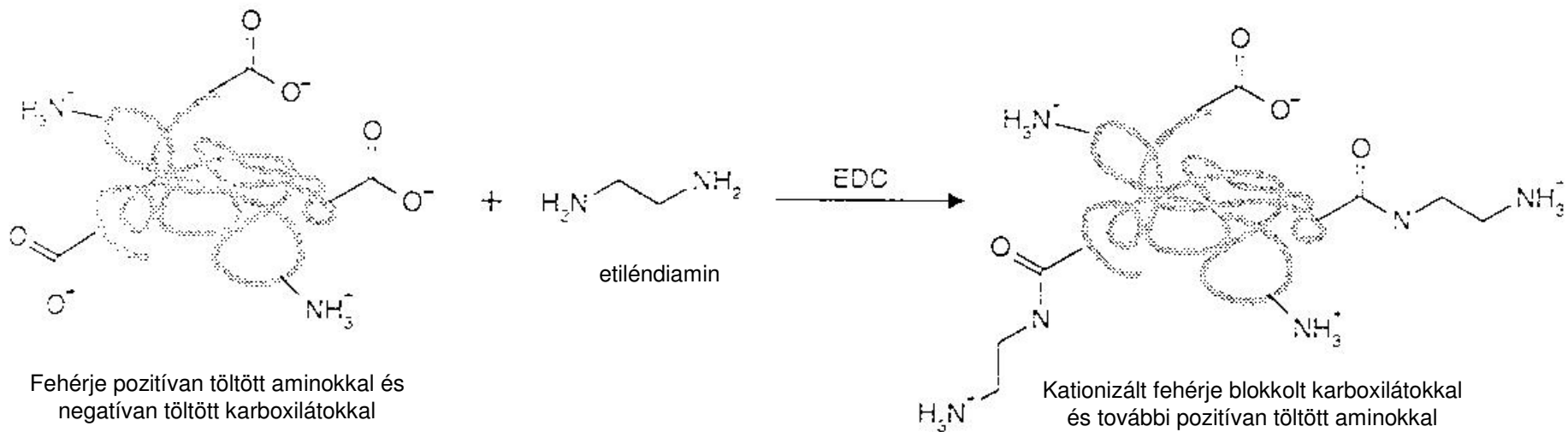
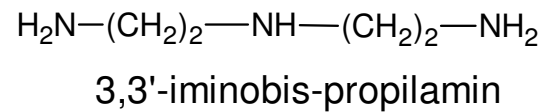
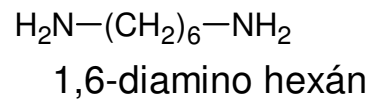
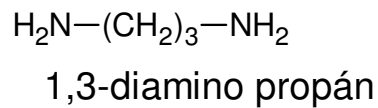
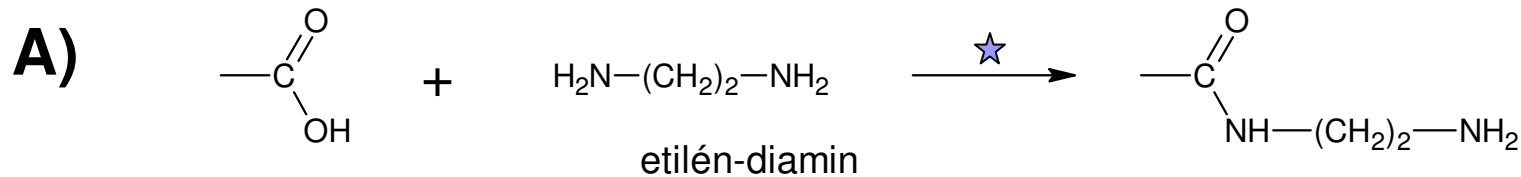
Miért hozunk létre funkciós csoportot?

1. Nincs jelen ami kell pl. $-\text{COOH} \rightarrow -\text{NH}_2$
2. Nagyobb reaktivásra van szükség pl. $-\text{OH} \rightarrow -\text{CHO}$
3. Szelektivitás pl. $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{SH}$
4. Távolságtartás pl. „spacer”

Taktika: „Trial and error”

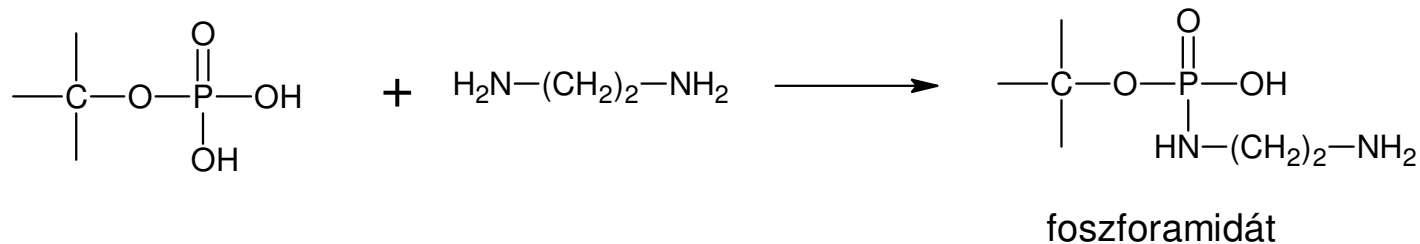
1. - NH_2 csoport kiépítése
2. - NH-NH_2 csoport kiépítése
3. - COOH csoport kiépítése
4. - CHO csoport kiépítése
5. - OH csoport kiépítése
6. - SH csoport kiépítése

Amino csoport kiépítése I.



1. Aktiváláshoz szükséges: ☆ = EDC; aktív észter; N,N'-karbonil-diimidazol
2. Csökkenti a – és növeli a + számot pI!
pl. BSA pI 4.9 → pI 9.5-11
3. Közvetett (spacer) → hidrofób kölcsönhatás
4. Alkalmazás: fehérje pl. HRP, csak 2 NH₂ van
glikoprotein → szíálsav

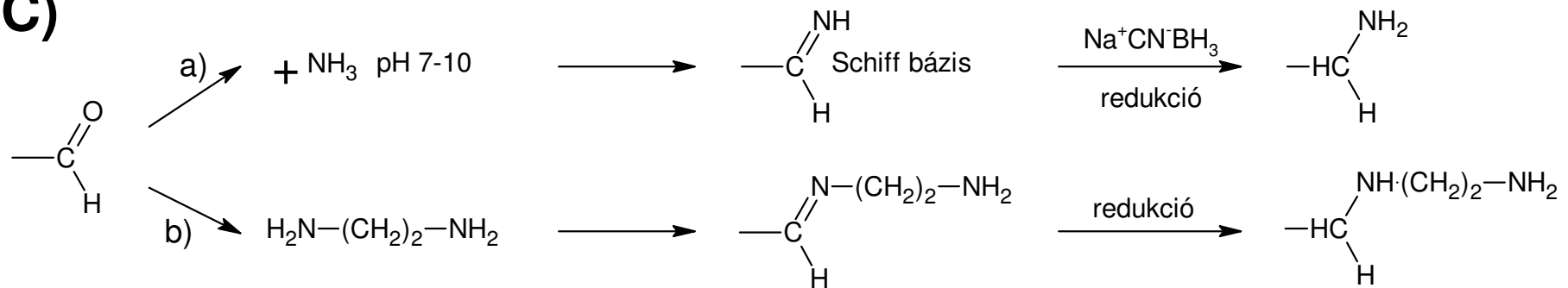
B)



Alkalmazás RNS, DNS (5'-OH)

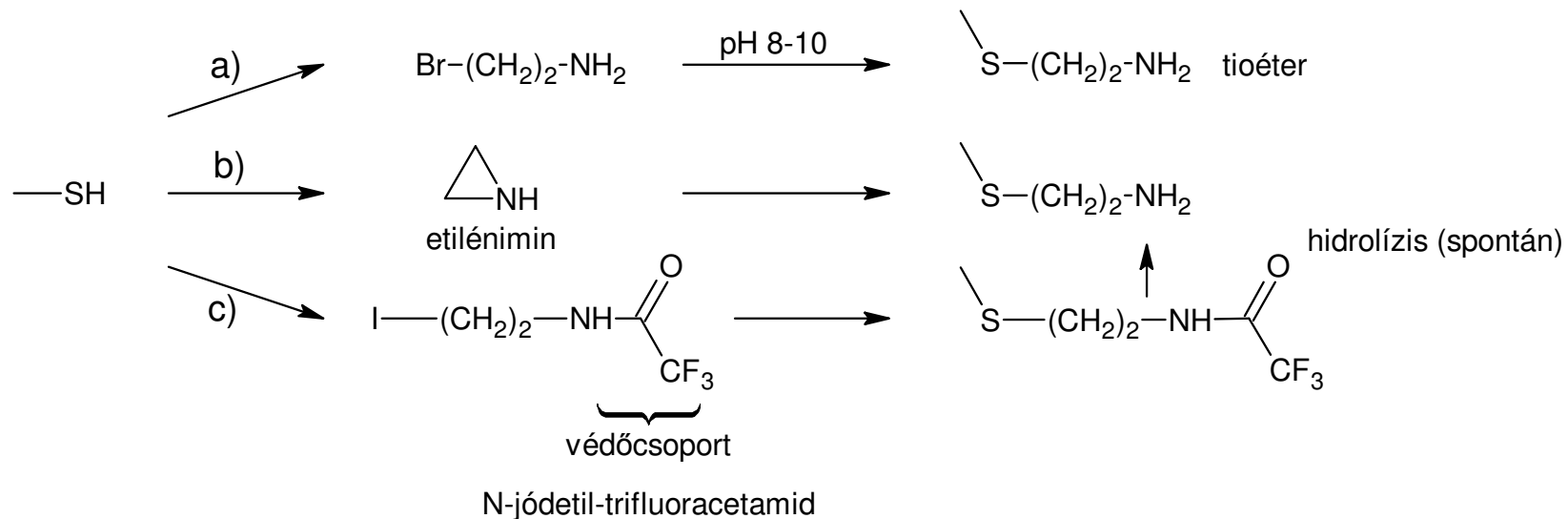
Chu, BCF et al. *Nucleic Acid Res* 14 5591 (1986)

C)



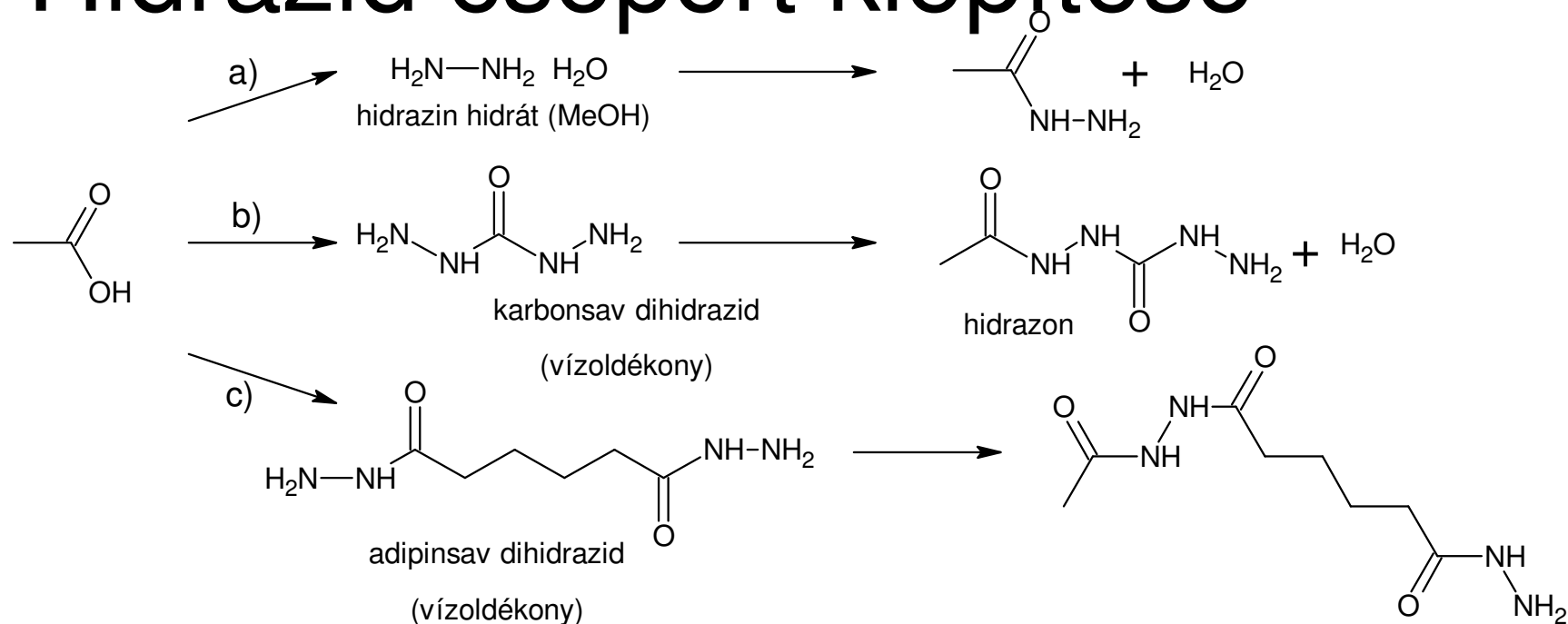
-
1. Spontán, pH 7-10, 10x felesleg
 2. Növeli a + számot, pI-t
 3. Közvetlen: a); közvetett: b) \rightarrow kiterjeszhető
 4. Alkalmazás: szénhidrát, glikoprotein
-

D) Lindley, H. *Nature* 178 647 (1956)

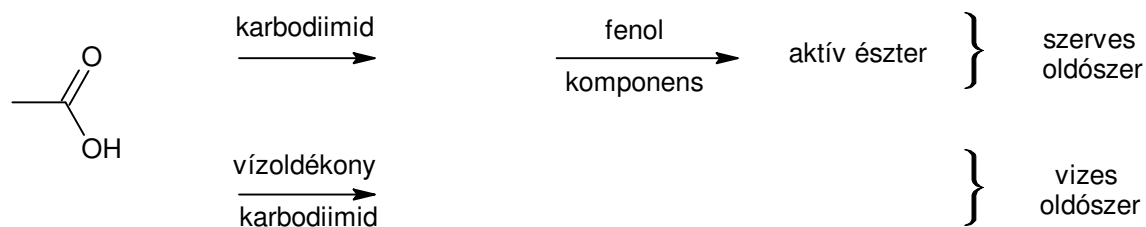


1. Spontán, pH 8-10, 10x felesleg (DTT), reagens metanolban, 6 M guanidium·HCl
2. Növeli a + számot, pI-t
3. Közvetett
4. Alkalmazás: fehérje

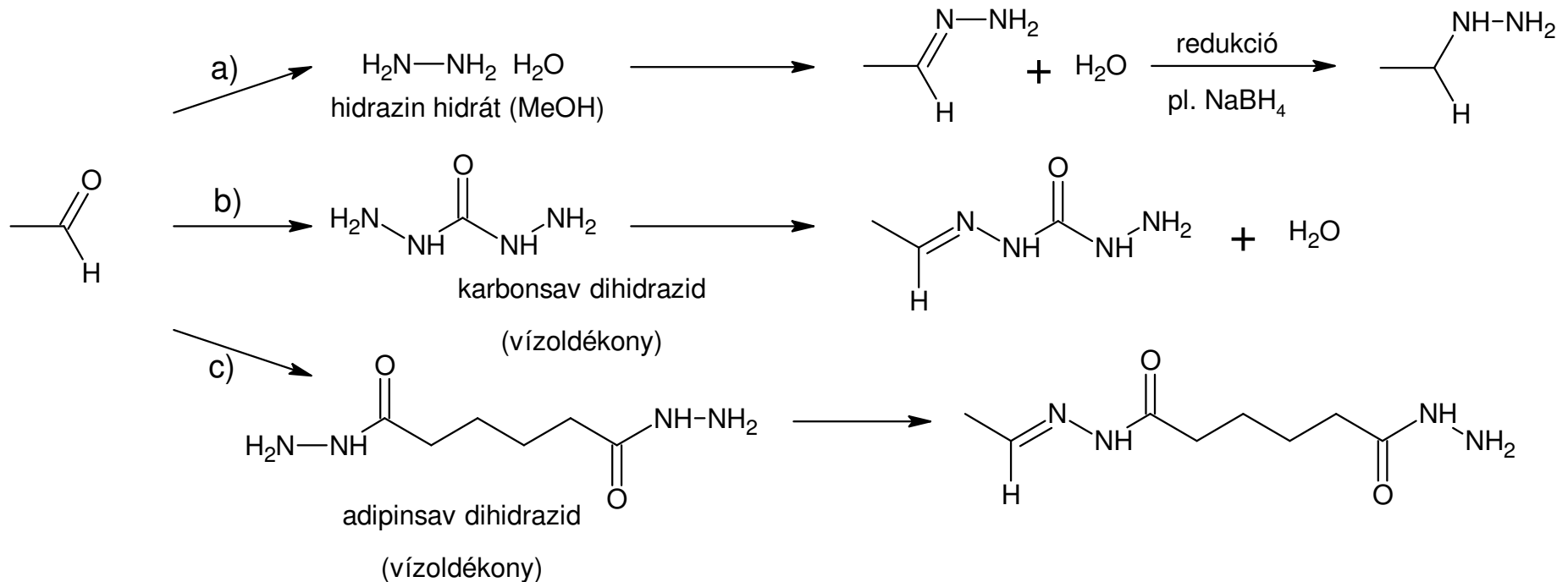
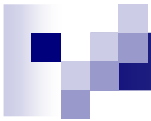
Hidrazid csoport kiépítése



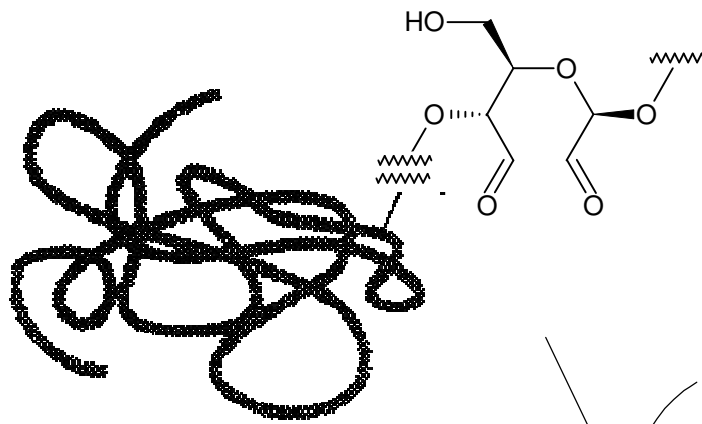
1. Nem spontán reakció, „előaktiválás” (átalakítás reaktív vegyületté)



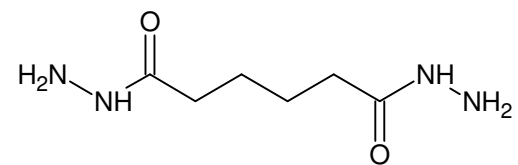
2. Csökkenti a – számot, nő pI
3. a) közvetlen; b) közvetett (spacer)
4. Alkalmazás: fehérjék, mikrotites lemezek (töltés mentesítés is)



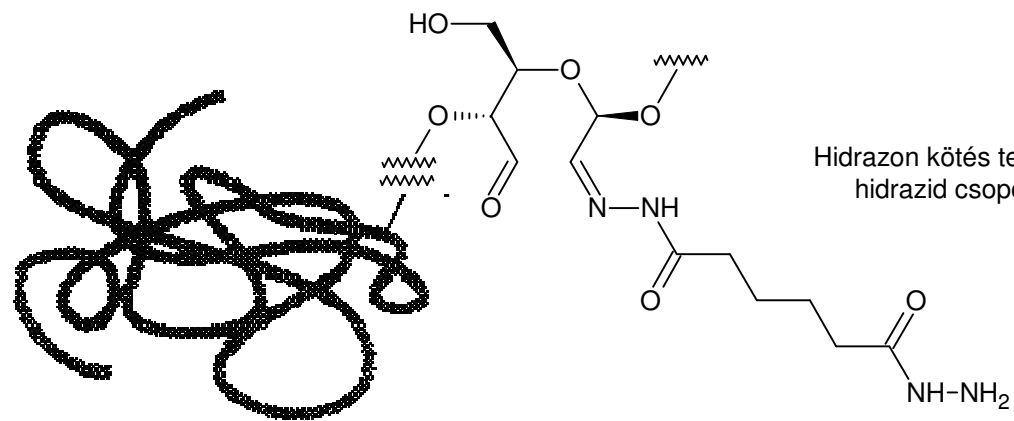
-
1. Spontán reakció
 2. Nem változtatja a töltésviszonyokat
 3. Alkalmazás: szénhidrátok (dextrán, affinitás krom.)
glikoproteinek (ellenanyag, enzim {HPO})
-



Fehérje molekula perjodát-oxidált poliszacchariddal (aldehid csoporttal rendelkezik)

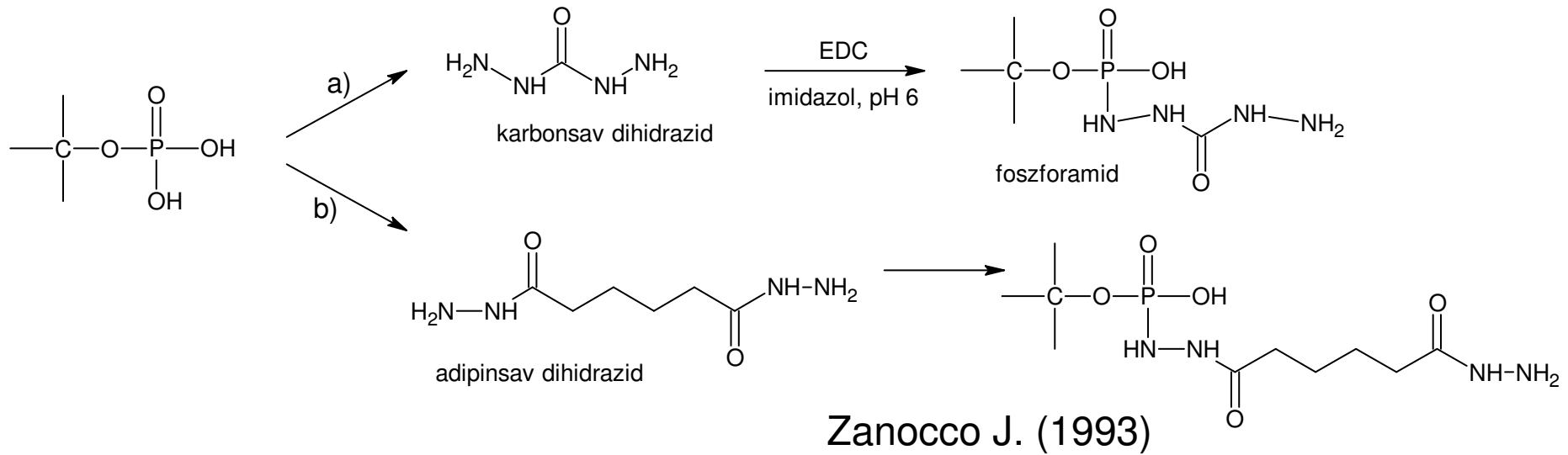


Adipinsav dihidrazid



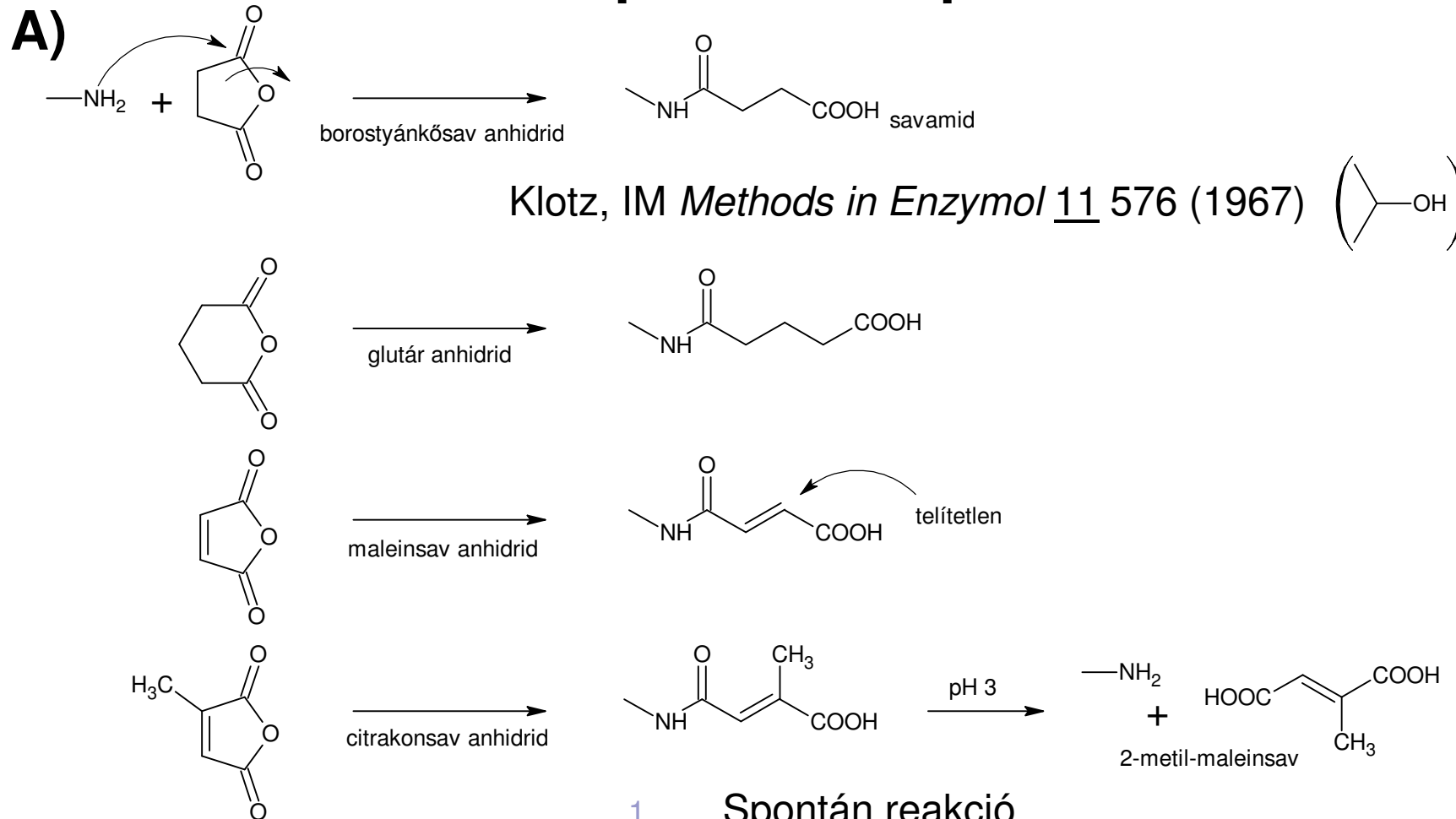
Hidrazon kötés terminális hidrazid csoporttal

Ghosh, SS et al. *Anal Biochem* 178 43-51 (1998)

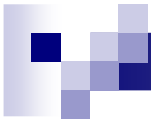


-
1. Előaktiválás
 2. Csökkenti a – számot
 3. Alkalmazás: RNS, DNS (5'-OH)
-

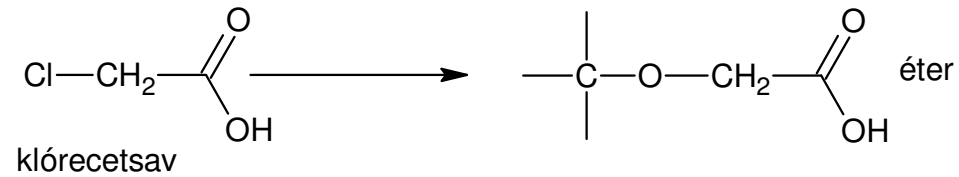
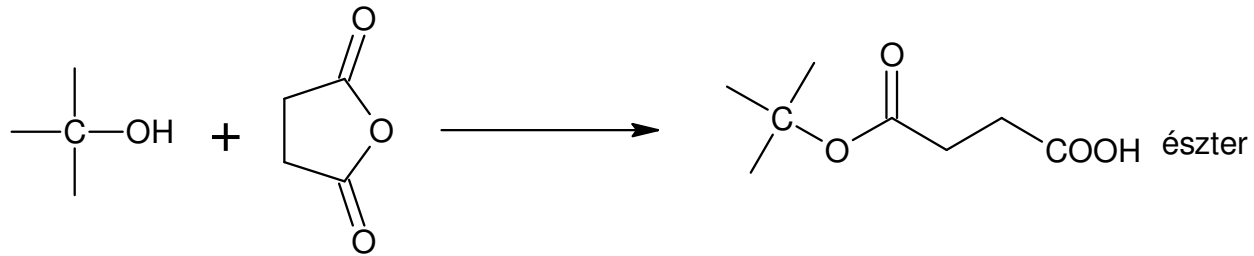
Karboxil csoport kiépítése



1. Spontán reakció
2. Csökkenti + , növeli - , csökkenti pI
3. Közvetett
4. Alkalmazás: fehérjék, szénhidrát (amino)



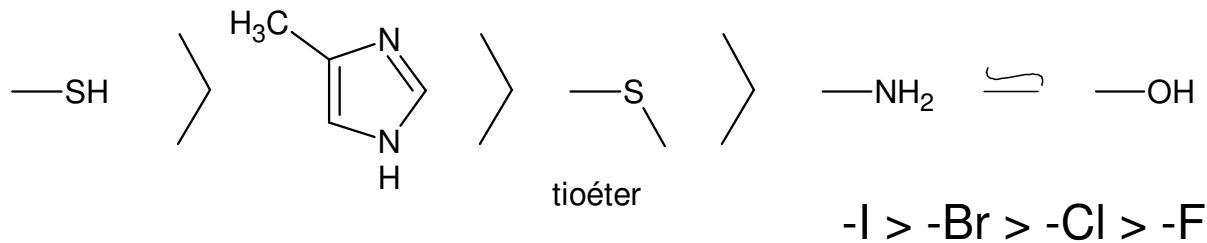
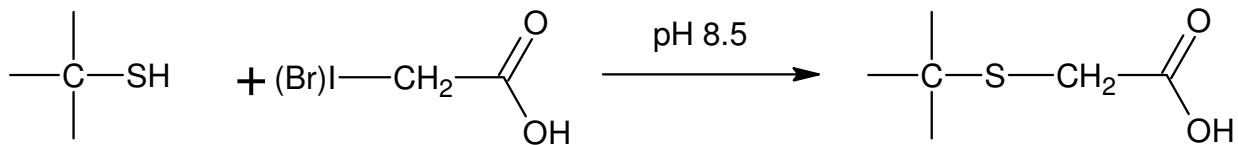
B)



Plotz, PH *Biochemistry* 21 301 (1982)

1. Spontán reakció
2. Közvetett
3. Alkalmazás: szénhidrát, fehérjék

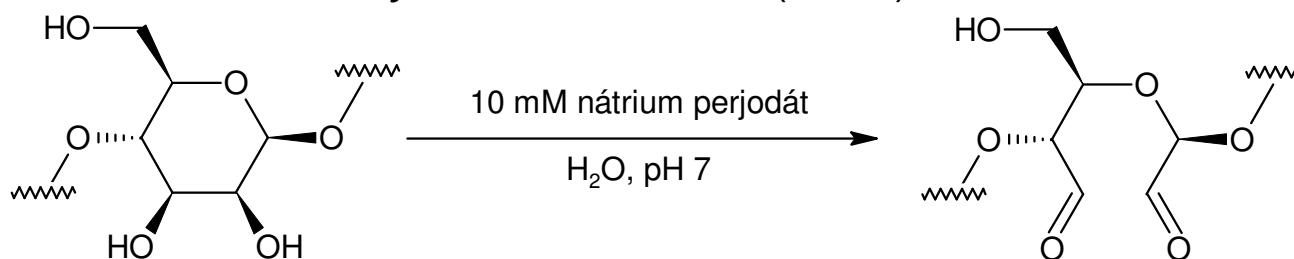
C)



Aldehyd csoport kiépítése

A) Vicinális diolok oxidációja

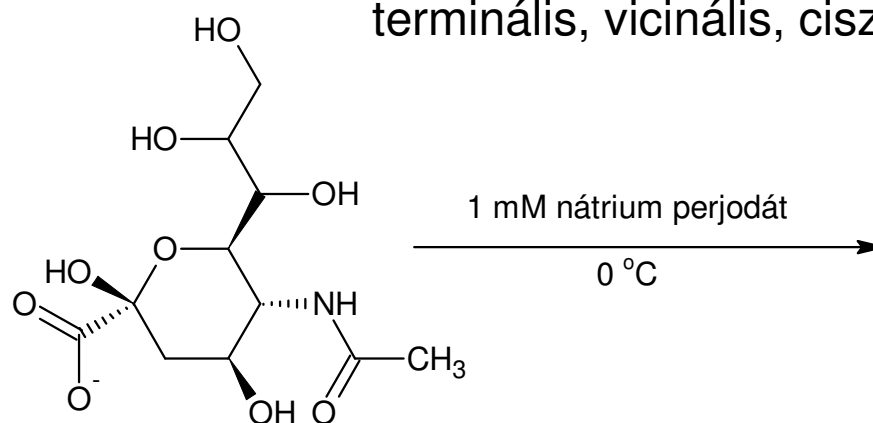
Bobbit, JM *Adv Carbohydr Chem* 11 1-41 (1956)



β-D mannóz részlet
poliszacharid láncban

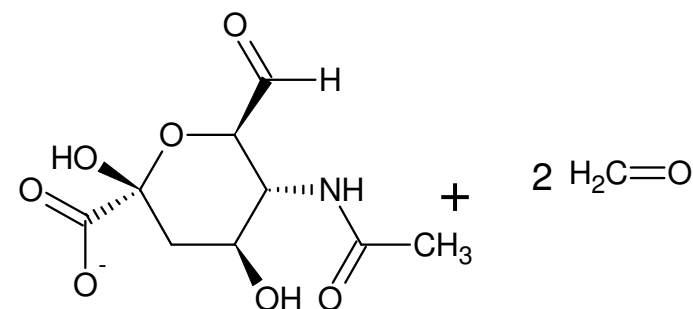
C - C kötés hasadás
oxidáció közben (aldehid képződés)

Van Lenten, L *J Biol Chem* 246 1889 (1971)
terminális, vicinális, cisz



N-acetil-D-neuraminic sav részlet

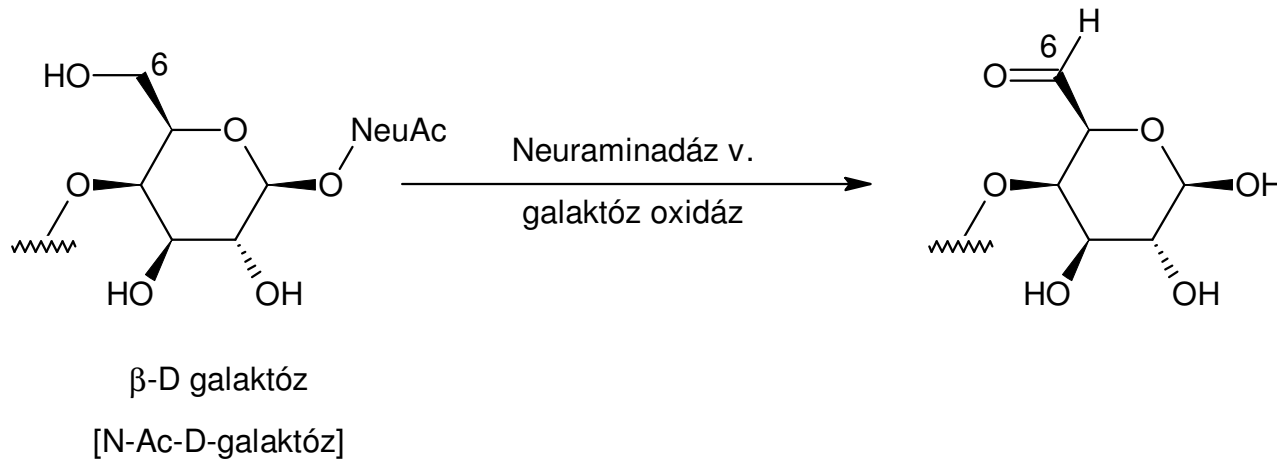
sziálsav-specifititás



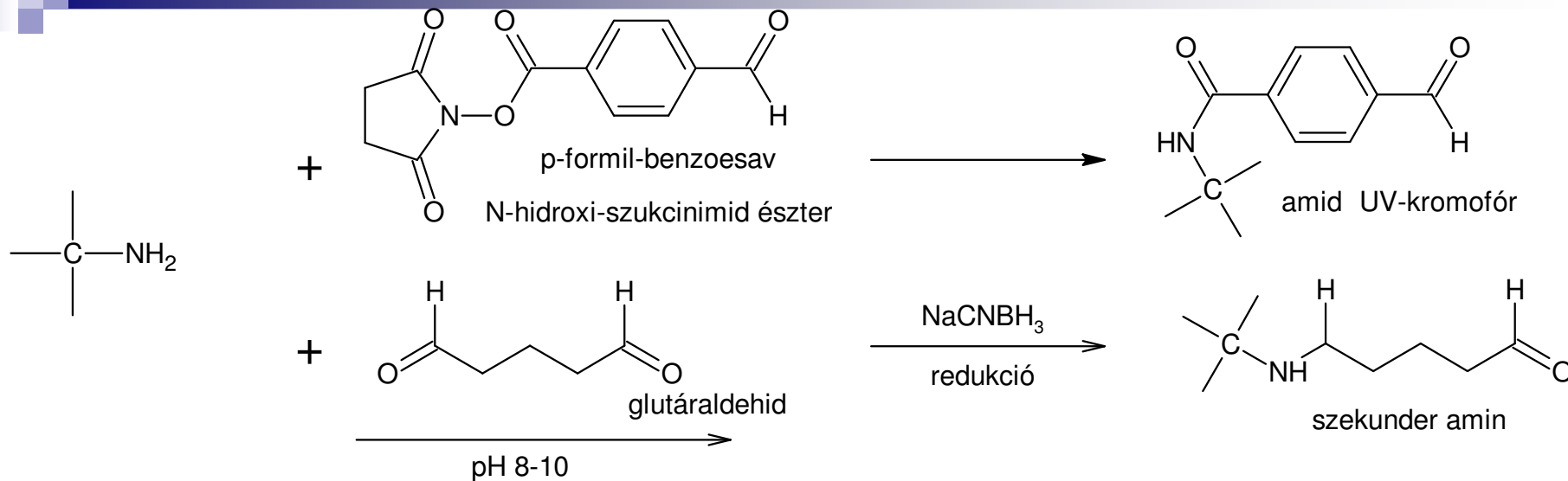
a sziálsav rész szelektív oxidálása

B) Enzimatikus oxidáció

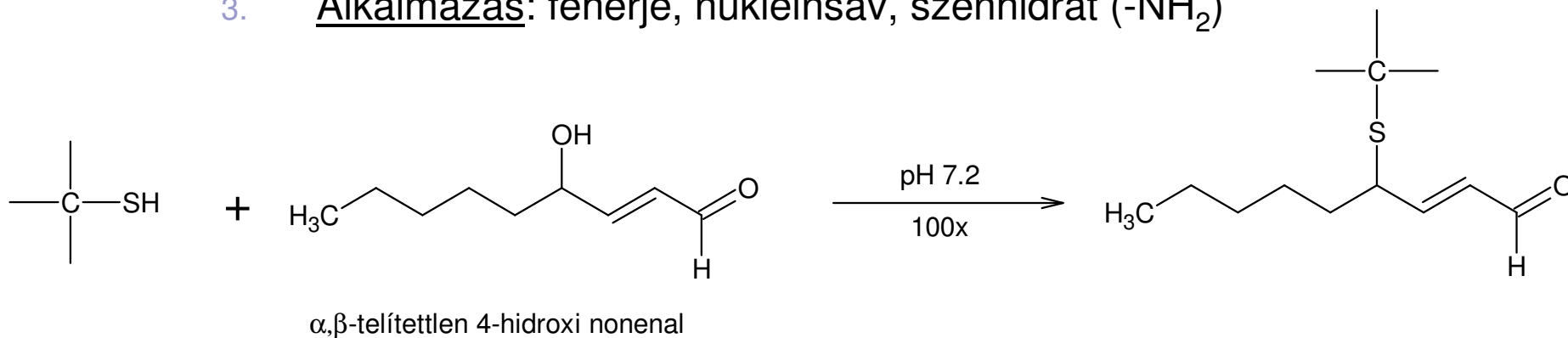
Avigad, E et al. *J Biol Chem* 237 2736 (1962)



1. Spontán reakció
2. Közvetlen
3. Alkalmazás: szénhidrát, glikoprotein



1. Spontán reakció
2. Közvetett
3. Alkalmazás: fehérje, nukleinsav, szénhidrát (-NH₂)





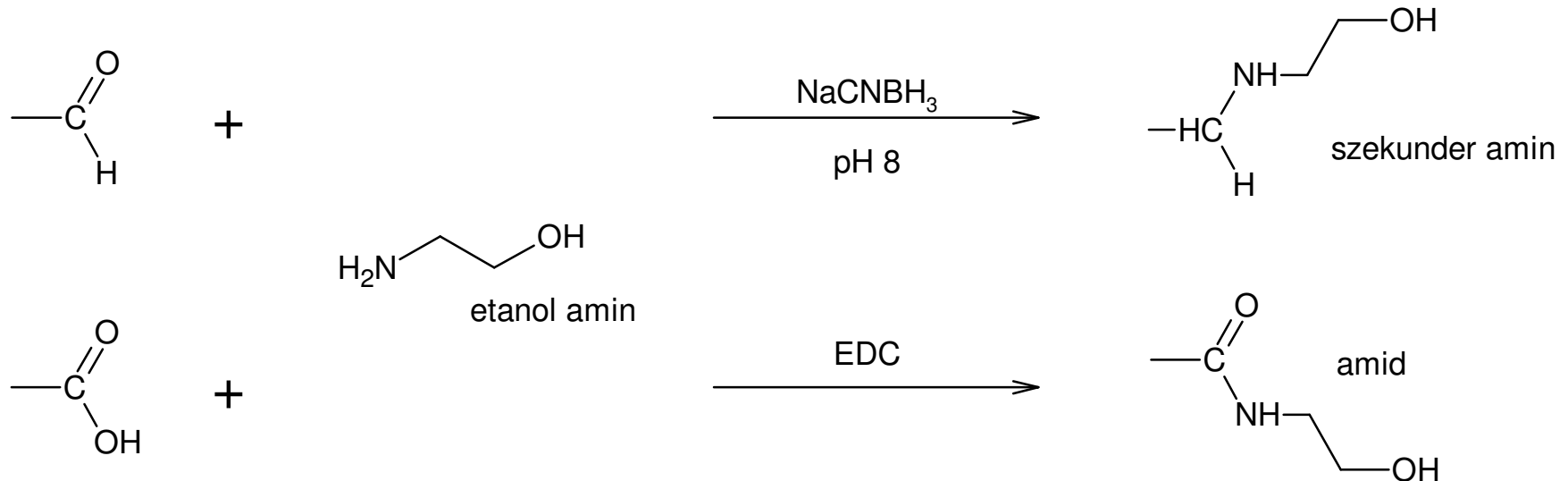
Miért hozunk létre funkciós csoportot?

1. Nincs jelen ami kell pl. $-\text{COOH} \rightarrow -\text{NH}_2$
2. Nagyobb reaktivításra van szükség pl. $-\text{OH} \rightarrow -\text{CHO}$
3. Szelektivitás pl. $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{SH}$
4. Távolságtartás pl. „spacer”

Taktika: „Trial and error”

1. - NH_2 csoport kiépítése
2. - NH-NH_2 csoport kiépítése
3. - COOH csoport kiépítése
4. - CHO csoport kiépítése
5. - OH csoport kiépítése
6. - SH csoport kiépítése

Hidroxil csoport kiépítése



1. Aktiválás/redukció
2. Közvetett
3. Alkalmazás: fehérje, szénhidrát



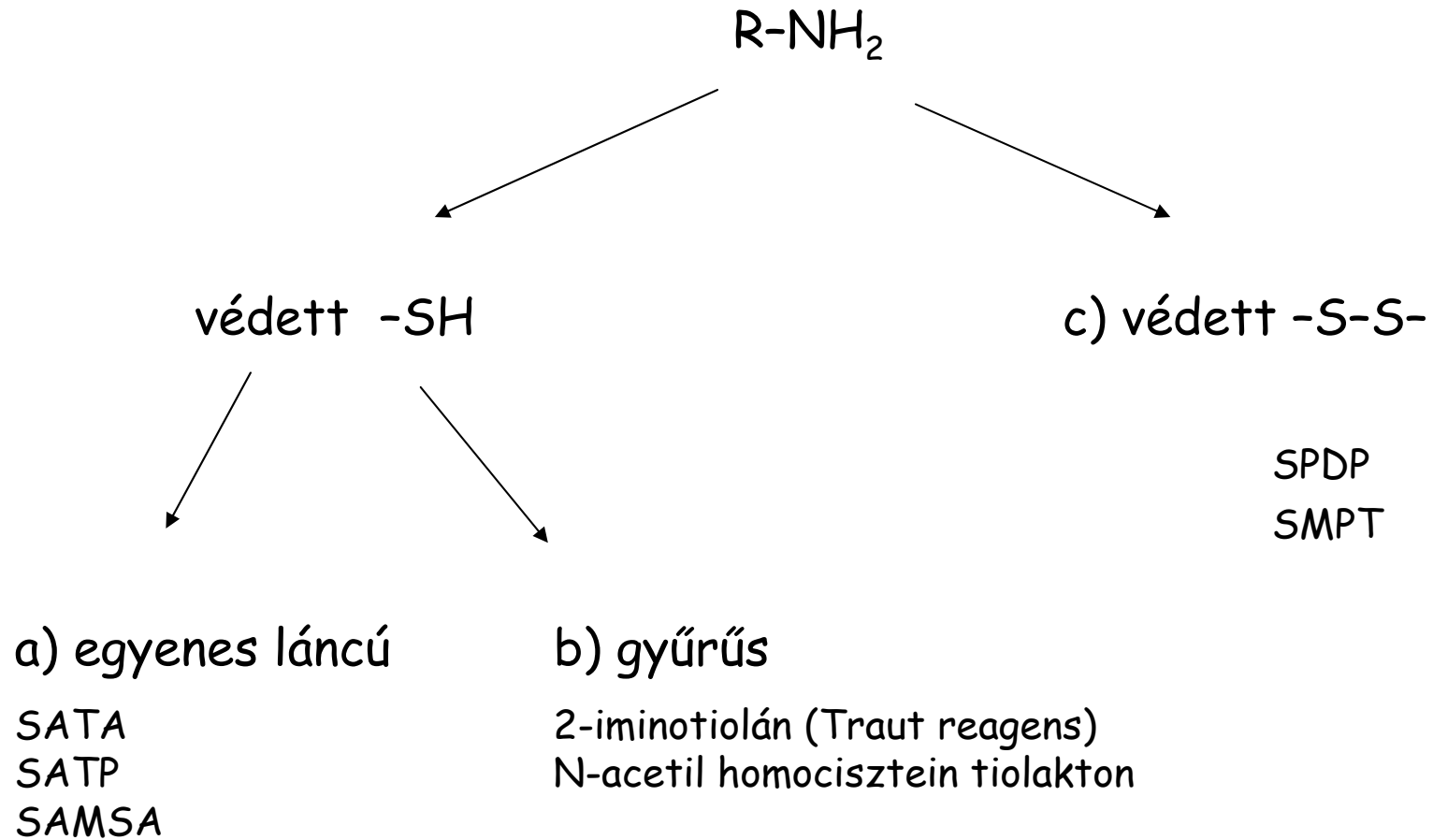
Tiol csoport kiépítése, stratégiák

Előny: vonzó mert viszonylag kevés van a fehérjékben

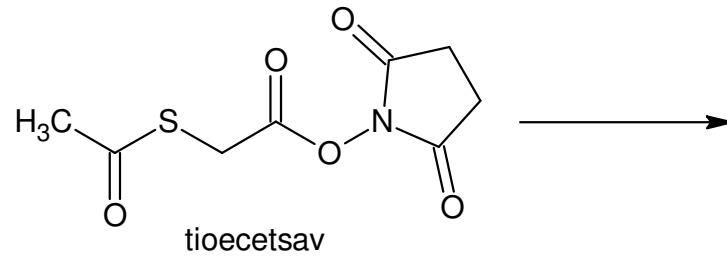
Hátrány: könnyen oxidálódik ($-SH \rightarrow -S-S-$)

1. oxigén/nitrogén atmosféra
 2. EDTA alkalmazása (0.01 - 0.1M) \rightarrow fémkatalízis
(pl. BSA-hoz 0.1M)
-
- A) Amino csoportból
 - B) Hidroxi csoportból
 - C) Oxo csoportból
 - D) Karboxi csoportból
 - E) Diszulfid kötésből

A) Aminocsoportból



a)



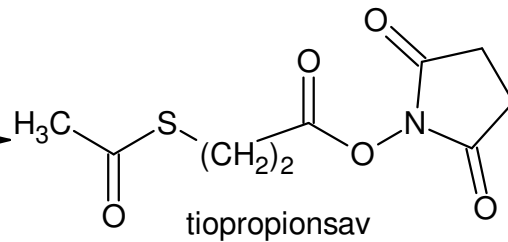
Duncan et al. *Anal Biochem* 132 68 (1983)

SATA

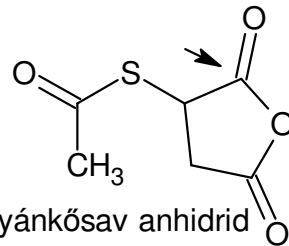
SATP

SAMSA

NH₂

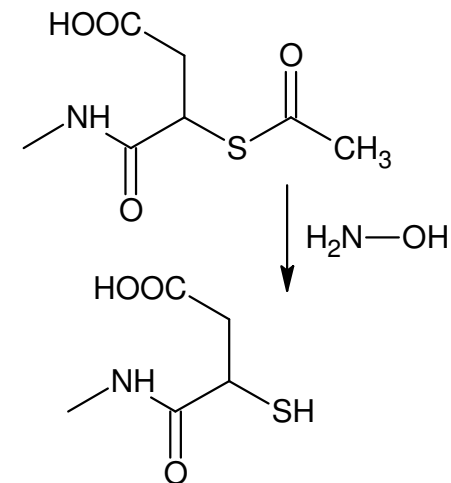
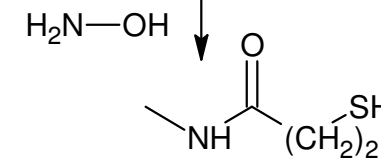
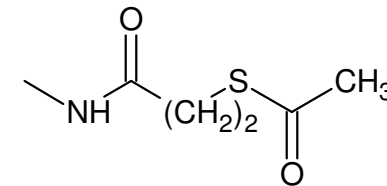
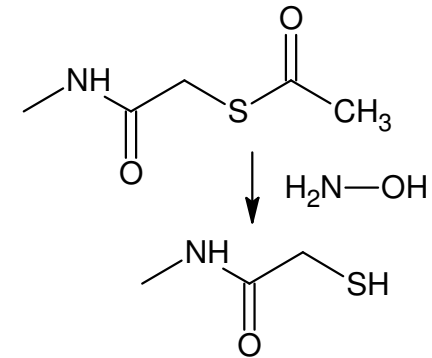


Fuji et al. *Chem Pharm Bull* 33 362 (1985)



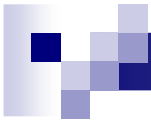
merkapto borostyánkősav anhidrid

Klotz et al. *Arch Biochem Biophys* 96 605 (1962)

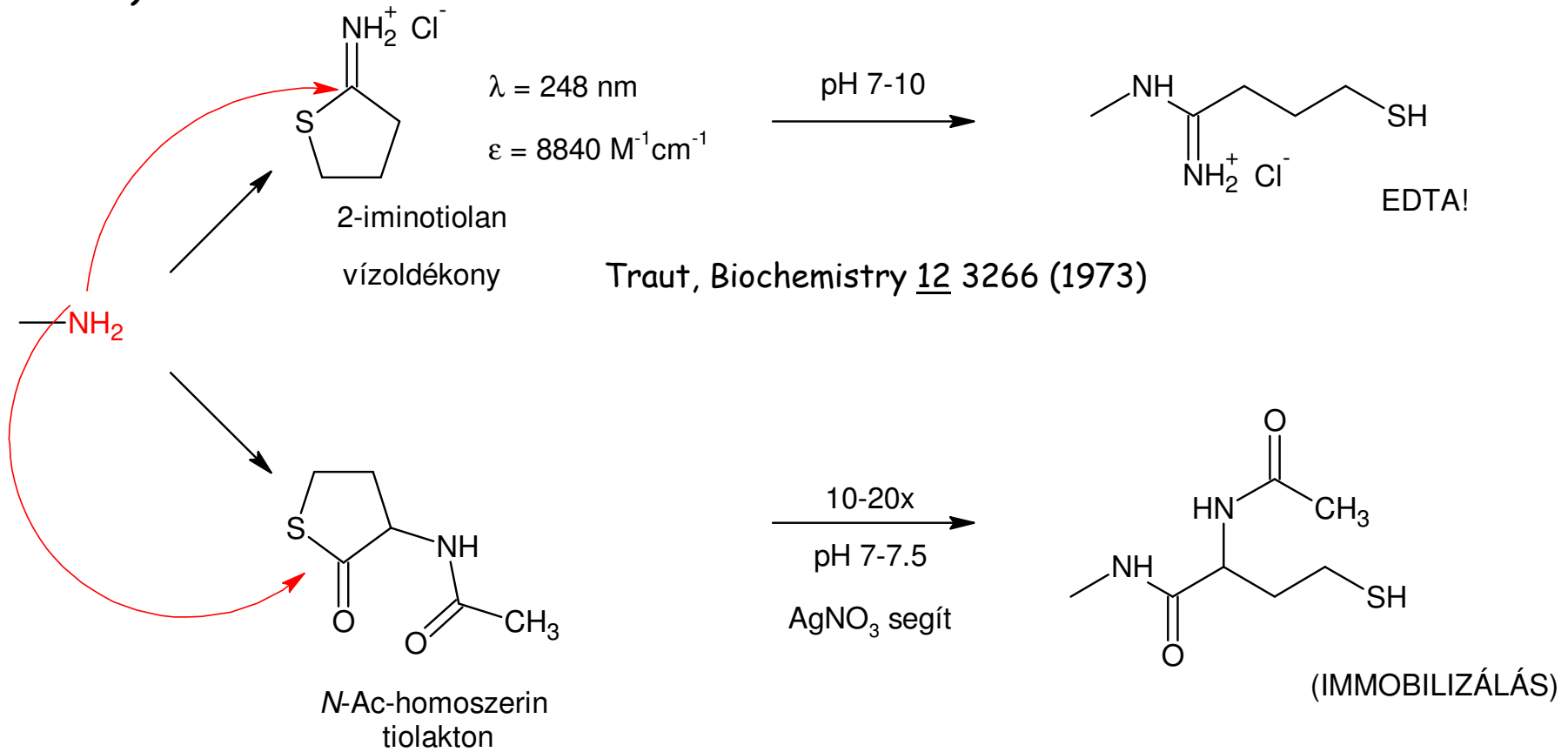


Előny: nincs redukció → specificitás

lásd: AcCoA

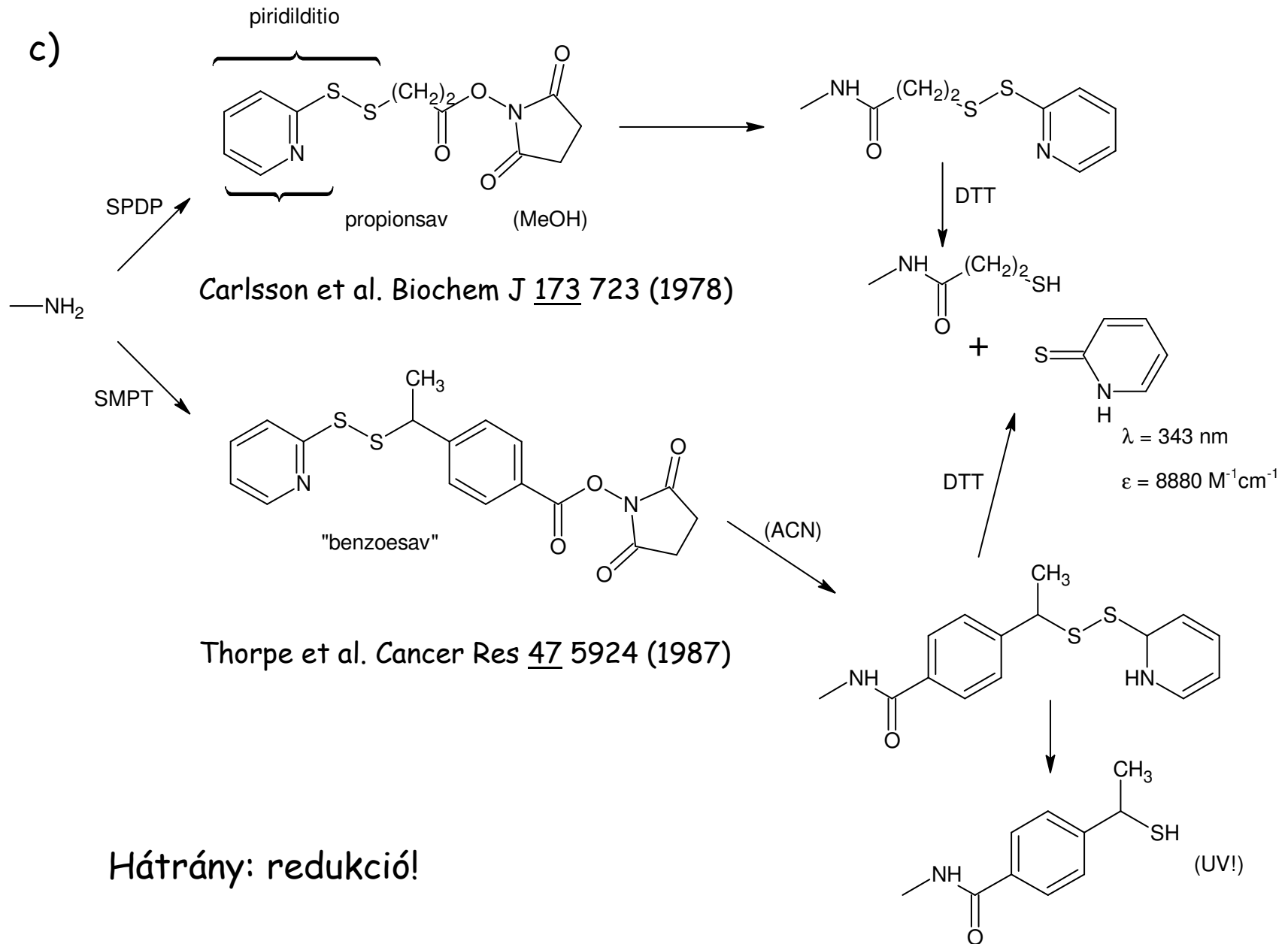


b)



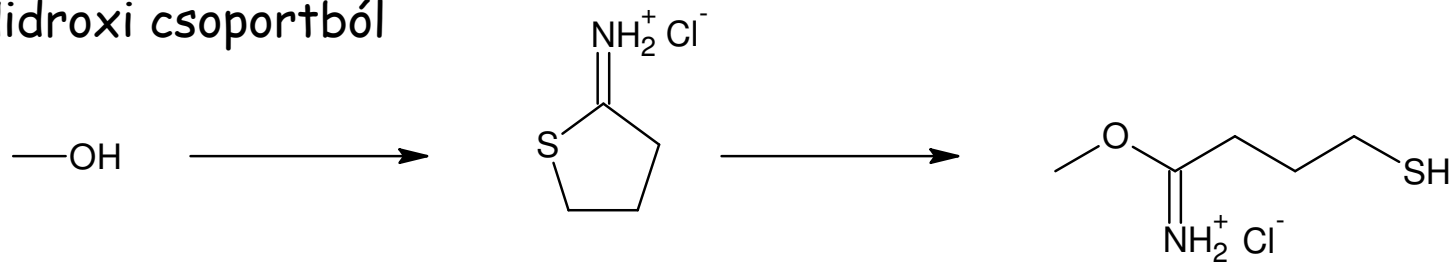
Eldjarn et al. Acta Chem Scand 17 2610 (1963)

c)



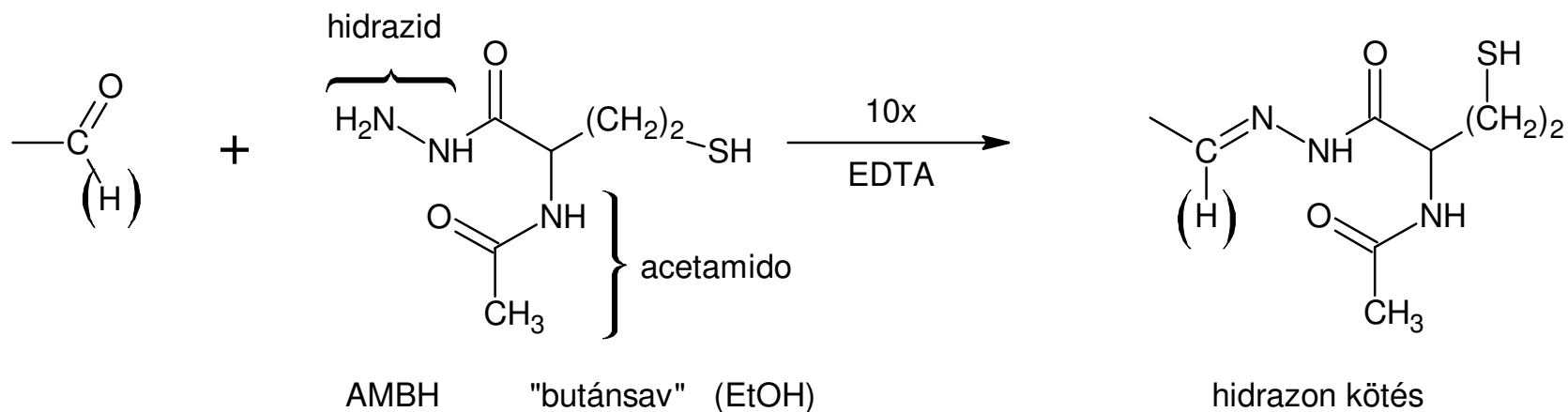
Hátrány: redukció!

B) Hidroxi csoportból



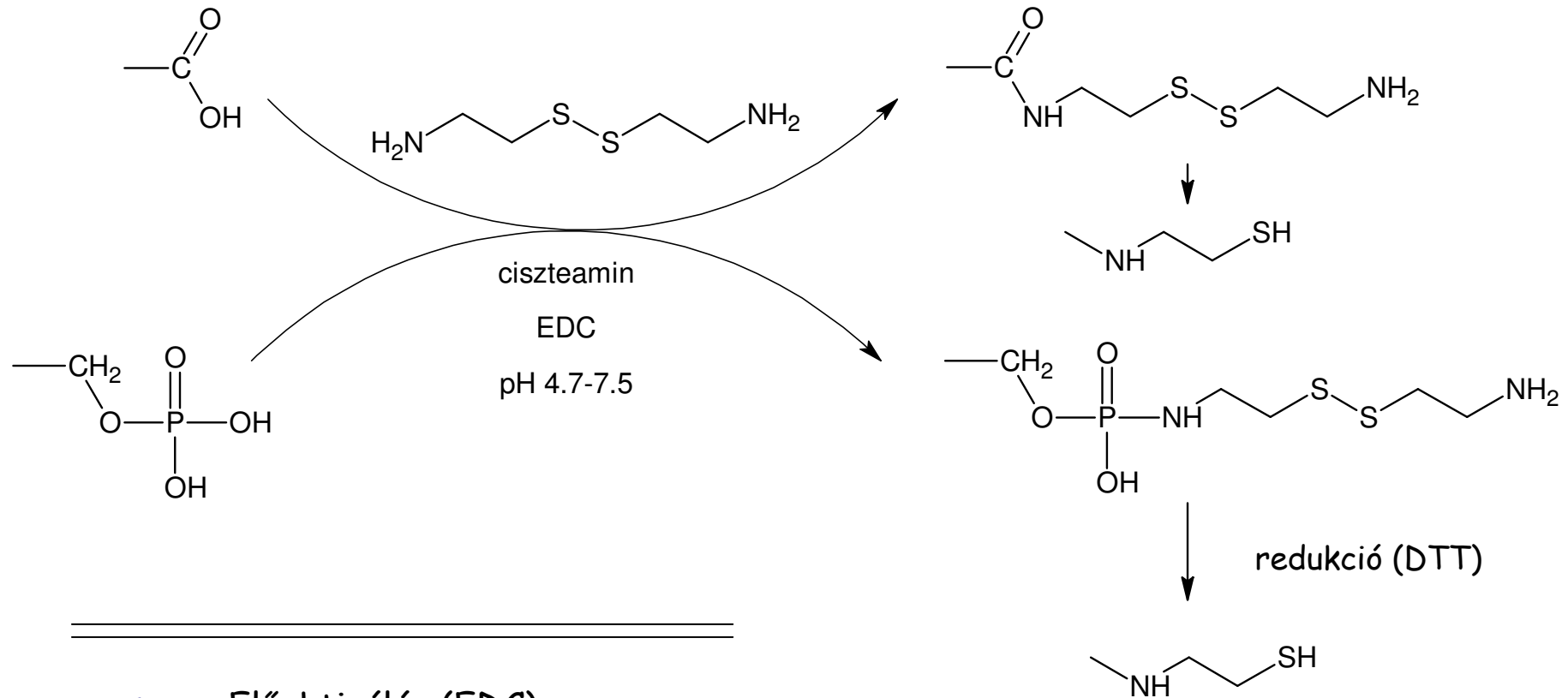
Tarentino et al. *Glycobiology* 3 279-285 (1993)

C) Oxo csoportból



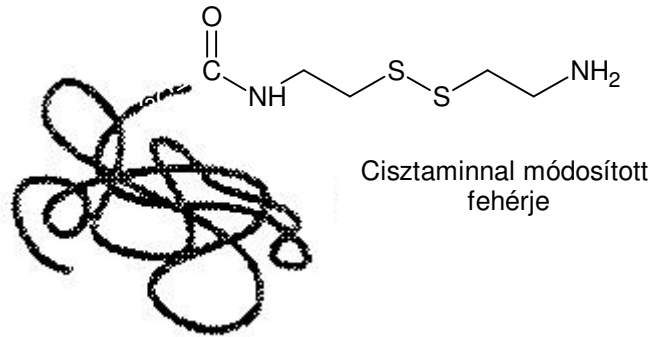
Taylor et al. *Biochem Int* 1 353 (1980)

D) Karboxi csoportból



1. Előaktiválás (EDC)
2. Áttölt
3. Alkalmazás: RNS, DNS (5'-OH), fehérjék

DE:

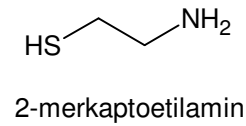


Cisztaminnal módosított
fehérje

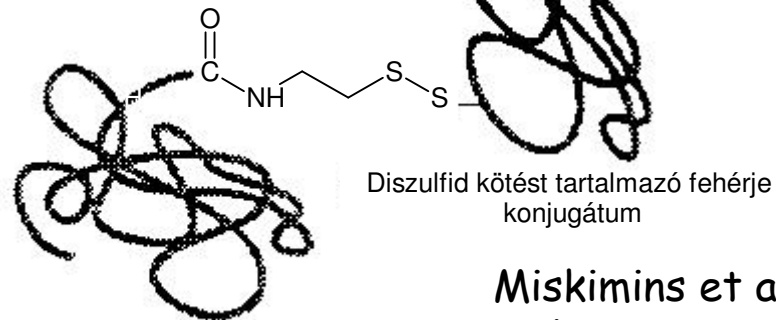
+



Tiol-csoportot tartalmazó fehérje



2-merkaptóetilamin

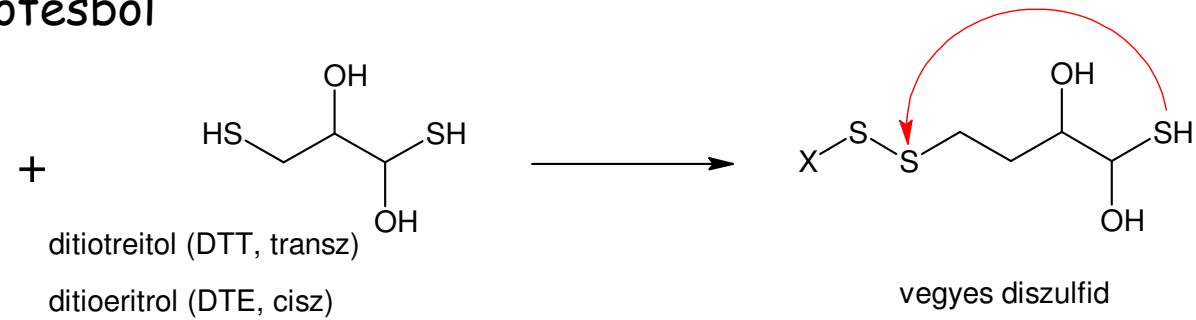


Diszulfid kötést tartalmazó fehérje
konjugátum

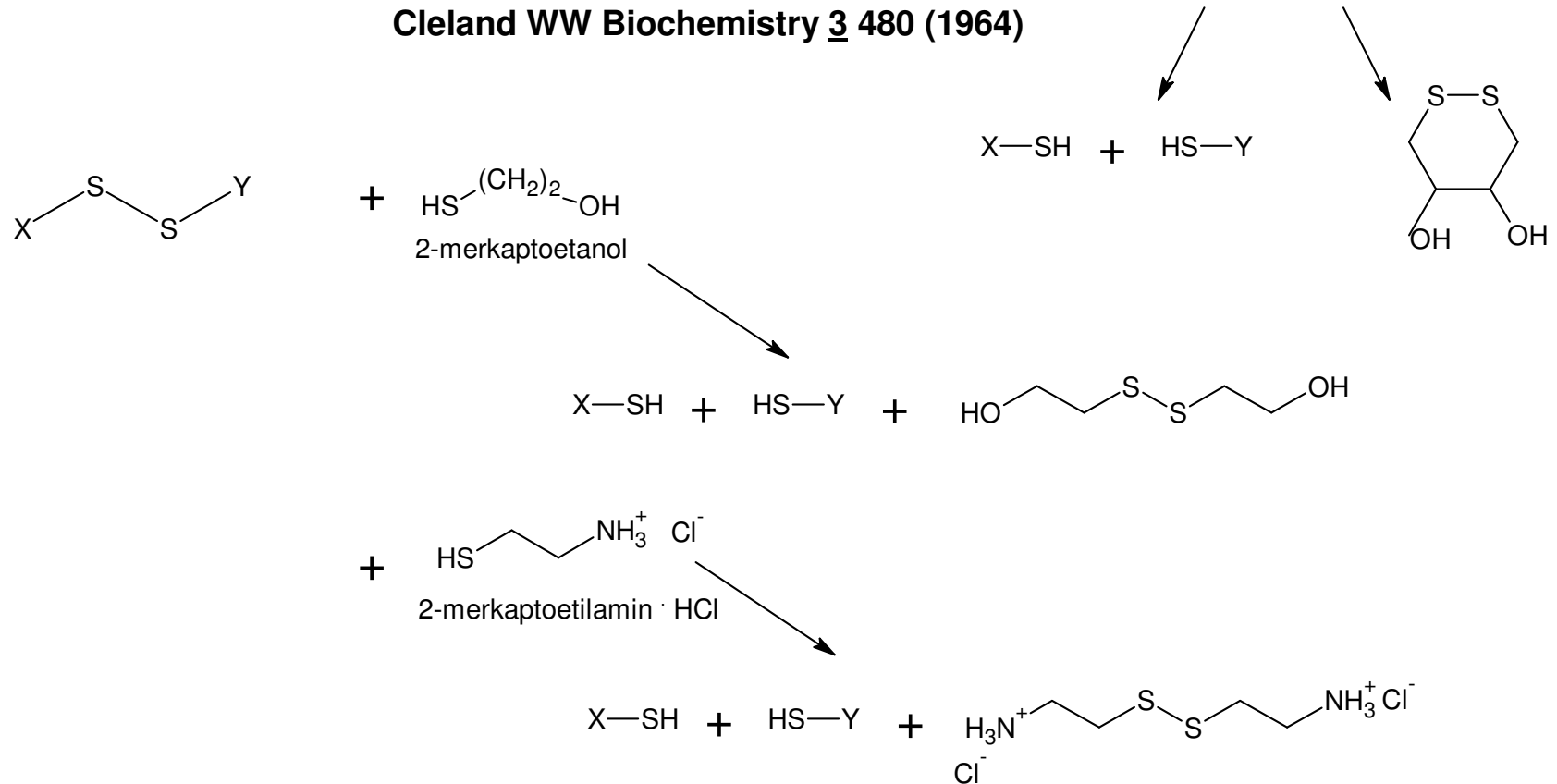
Inzulin - diftéria toxin A lánc
Ellenanyag - toxin

Miskimins et al. 1979
Oeltmann et al. 1981

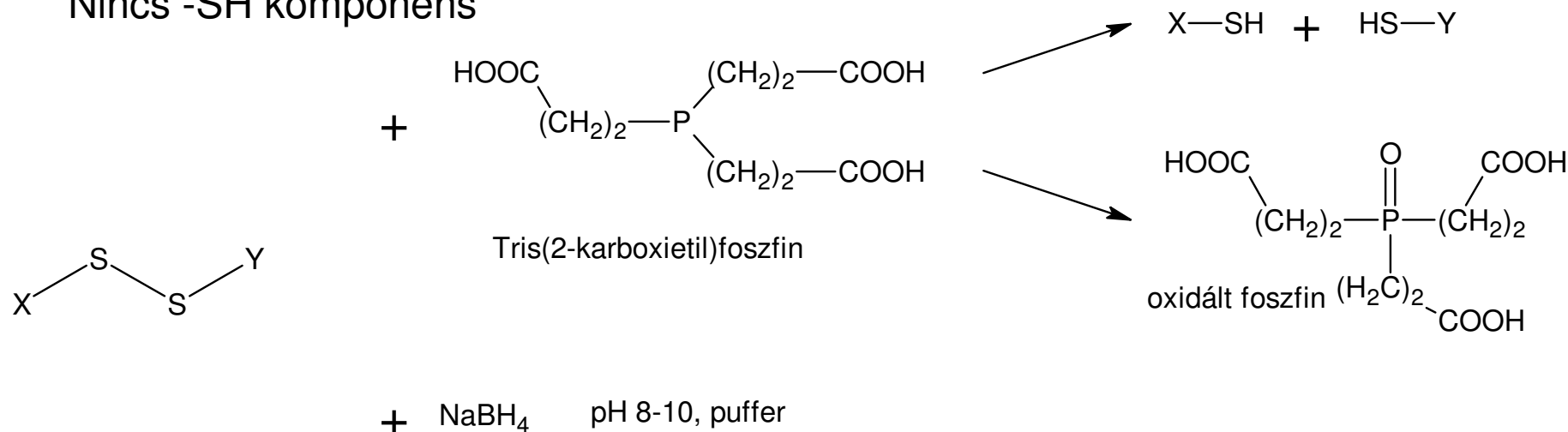
E) Diszulfid kötésből



Cleland WW Biochemistry 3 480 (1964)



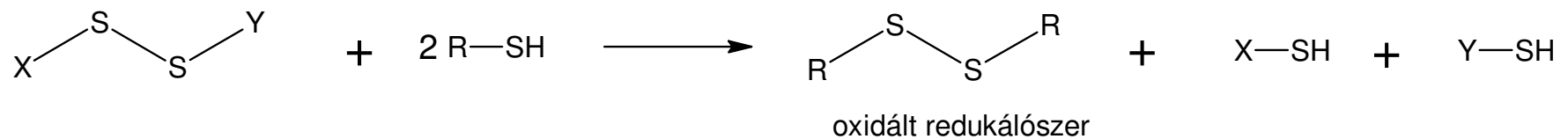
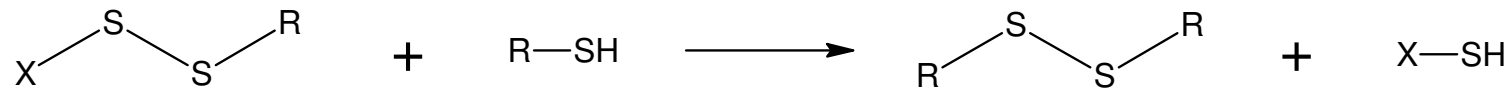
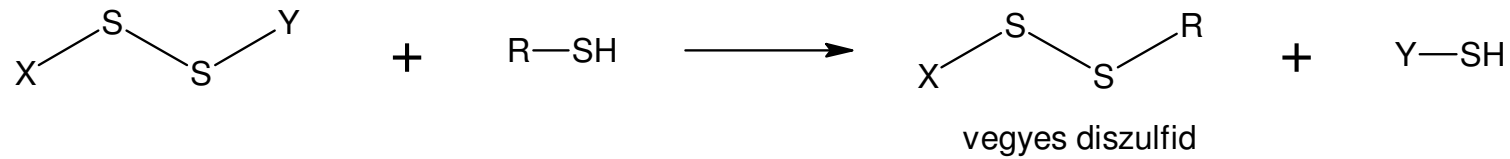
Nincs -SH komponens



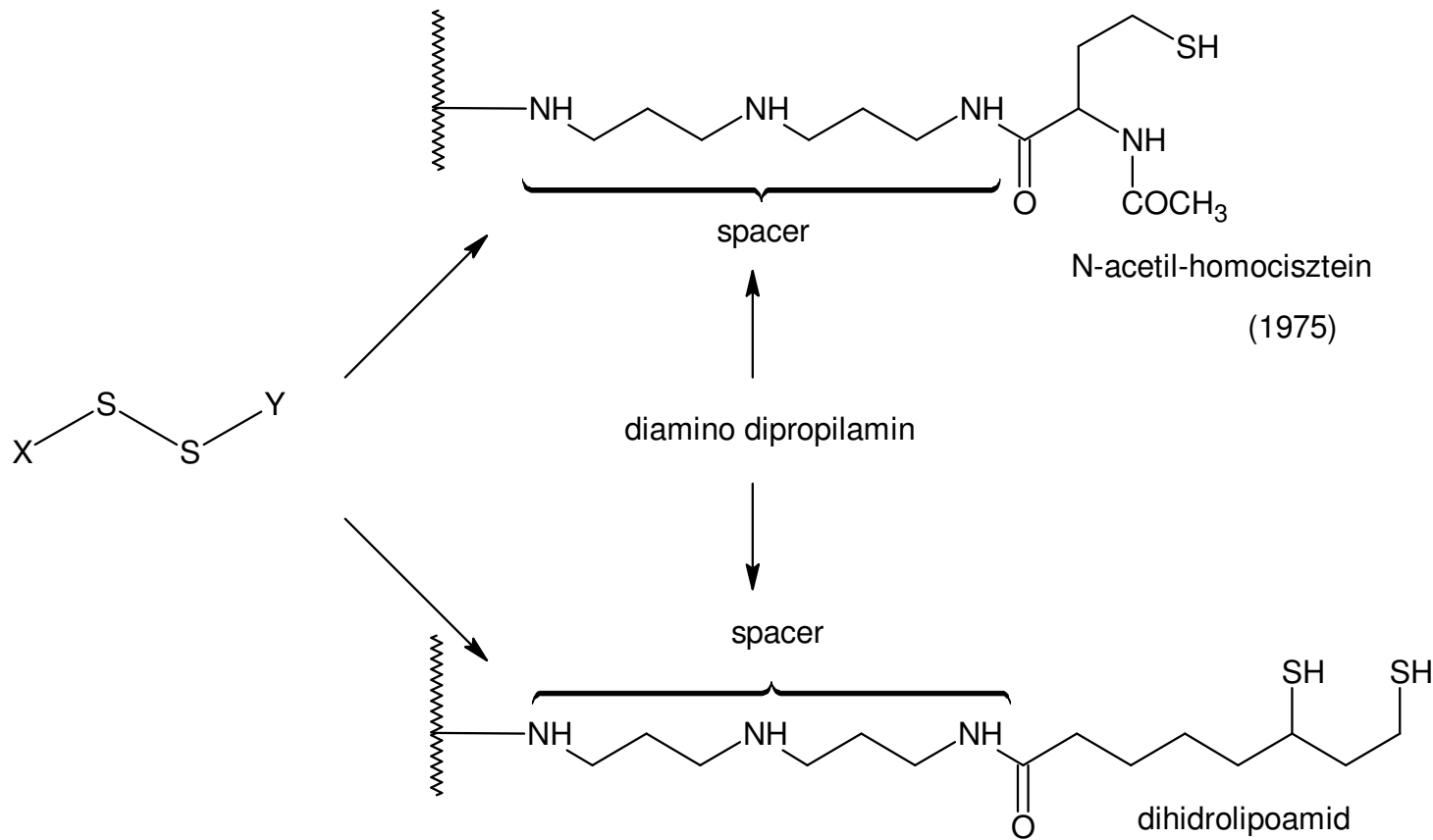
Gailit J Anal Biochem 214 334 (1993)

1. Spontán
2. Felesleg fontos! (min. 20x)
3. Alkalmazás: fehérjék (szerkezet vizsgálat)
kiépített -S-S-X kötések
4. Denaturáló szerek: urea, guanidin, SDS
5. Egyebek: Cys, HS-CH₂-COOH (tioglikolsav)

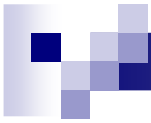
-SH tartalmú redukálószer



Tiol csoport kiépítése immobilizált redukálószerekkel



Előny: „nincs” melléktermék (oxidált redukálószér)
redukálószér immobil
regenerálható



MIBŐL?

		NH ₂	NH-NH ₂	COOH	CHO	OH	SH
M I T ?	NH ₂			+	+		+
	NH-NH ₂			+	+		
	COOH	+				+	+
	CHO	+				+	+
	OH			+	+		
	SH	+		+	+	+	