

Naturens Nano-snedkeri.

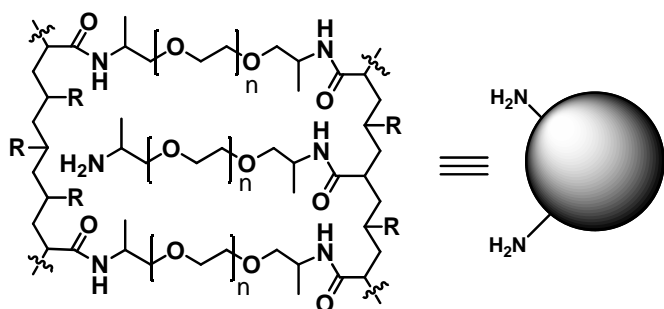
Morten Meldal, Nano Science Center, Københavns Universitet

Øvelsen går ud på at lave et system så man kan studere et enzyms aktivitet.

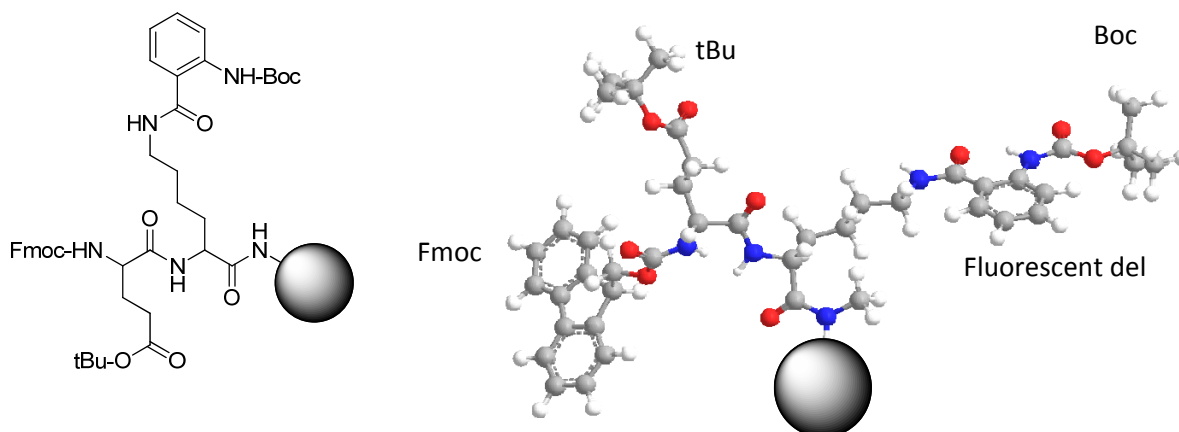
Ved øvelsens start får man udleveret en lille mængde specielle plastickugler lavet af polyethylenglycol, der kan optage store mængder vand ligesom en svamp og fungerer som et netværk af flexible tråde hvori et enzym kan vandre rundt. Opgaven er at fremstille et molekyle inde i fastklistret til netværket. Molekylet skal være et såkaldt substrat for enzymet, det vil sige et molekyle enzymet kan omsætte til et produkt. Molekylet indeholder en fluorescent gruppe (amino-benzamid, kaldet Abz), et peptid bestående af udvalgte aminosyrer og en quencher som slukker fluorescensen.

Molekylet bygges op af byggeklodser ligesom i Lego. Byggeklodserne har en beskyttet amino funktion og en fri carboxylsyre. Den frie carboxylsyre kan aktiveres og reageres med en amin der sidder bundet fast til polyethylenglycol netværket, så der dannes en amidbinding og byggeblokken hænger fast. Byggeblokken indeholder en ny beskyttet amin og beskyttelsesgruppen kan fjernes (med 2% diazabicycloundecen (DBU, der er en base) i *N,N*-dimethyl formamid) så det bliver muligt at reagere med en ny byggeblok. Basen fører til spaltning af Fmoc under dannelse af en dobbeltbinding (i benzfulven). Næste aminosyre kobles på. På den måde kan molekylet bygges op som perler på en snor. Til sidst sættes quencheren (Fmoc-3-nitro-tyrosin) på og hele molekylet behandles med stærk syre for at fjerne såkaldte beskyttelsesgrupper. Det er nu muligt at bruge kuglerne under et mikroskop og se hvordan enzymerne reagerer med molekylet.

Struktur af netværket PEGA resin



Den resin der bliver udleveret indeholder allerede en del af molekylet, nemlig



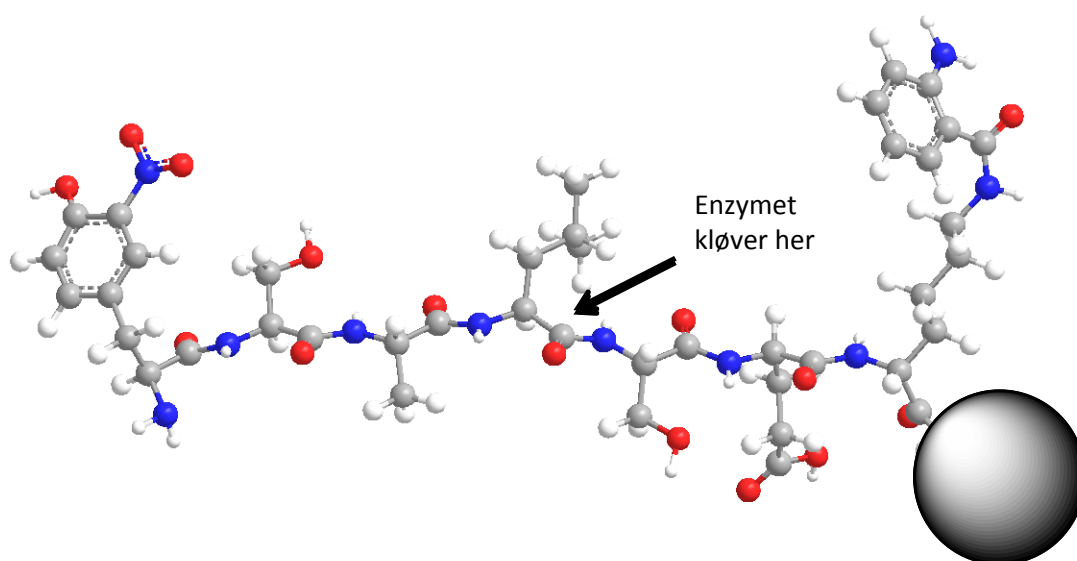
Fmoc, Boc og tBu kaldes beskyttelsesgrupper fordi de forhindrer reaktion der hvor de sidder.

Vi skal lave to substrater med følgende struktur.

Fmoc-3-nitro-Tyr-Ser-Ala-Leu-Ser-Glu-Lys(Abz)-Resin og

Fmoc-3-nitro-Tyr-Ser-Ala-Glu-Ser-Glu-Lys(Abz)-Resin

Molekylet I laver ser sådan ud:



ALLE OPERATIONER UDFØRES I STINKSKAB.

brug briller, kittel og handsker

Der bruges gilson piperret til afmåling af vædskemængder.

Der udleveres ca. 2 mL Fmoc-Glu(tBu-Lys(Abz)-Resin opslemmet i DMF (2 mL resin ~ 0.2 g ~ 0.03 mmol aminogrupe)

Der laves følgende opløsninger i *N,N*-dimethyl formamid (DMF)

DBU (1 mL DBU er en stærk base, pas på fingre og øjne) opløses i tør DMF, (50 mL i en 100 mL kolbe med prop).

Koblingsreagenset TBTU (Mw321, 0.54 mmol, 173 mg afvejes og opløses i nøjagtigt 2.4 mL tør DMF (DMF der ikke indeholder vandmolekyler) i et prøverør med mærkat.

N-ethylmorfolin, (Mw = 101, 0.5 mmol, 55 microliter) opløses i 2.4 mL tør DMF i prøverør med mærkat.

Aminosyrederivaterne afvejes og opløses i Eppendorphrør med mærkat:

Fmoc-Ser(tBu)-OH	(Mw 383, 0.18 mmol, 70 mg)	i 1 mL tør DMF
Fmoc-Leu-OH	(Mw 353, 0.045 mmol, 16 mg)	i 0.25 mL tør DMF
Fmoc-Glu(O-tBu)-OH	(Mw 425, 0.045 mmol, 19 mg)	i 0.25 mL tør DMF
Fmoc-Ala-OH	(Mw 311, 0.09 mmol, 28 mg)	i 0.5 mL tør DMF
Fmoc-3-nitro-Tyr-OH	(Mw 448, 0.09 mmol, 40 mg)	i 0.5 mL tør DMF

I det følgende vil kobling af en aminosyre i en sprøjte omfatte tilsætning af disse opløsninger svarende til 0.045 mmol aminosyrederivat/reaktion efter aktivering af aminosyrederivatet.

Resinen overføres forsigtigt til to sprøjter med fritte i bunden, så hver sprøjte indeholder 1 mL resin ved hjælp af pipette. Begge sprøjter sættes i luer adapter på vacuumsystemet i stinkskabet. Systemet checkes for om det virker ved at se om DMF kan suges fra. Ventilen under sprøjterne lukkes. En ny sprøjte (20 mL) med stempel forsynes med et stykke siliconslange. Der vaskes ved hjælp af denne sprøjte med DMF (5 mL/reaktion, i små portioner som hver suges fra efter 1 min henstand, denne vaskeprocedure benyttes hver gang der står "vask". En vask tager typisk 7 min.)

Afbeskyttelse af Fmoc: DMF suges fra, ventilen lukkes og der tilsættes 1 mL DBU-opløsning til hver sprøjte. Der røres forsigtigt med en ren spatel til fuld blanding er opnået, uden at knuse resinkugler. Blandingerne står i ti minutter hvorpå reagens suges fra (åben ventil) og der vaskes i hver sprøjte som beskrevet ovenfor med 7 mL DMF tilsat i 1 mL portioner, med ventilen lukket. Hele denne procedure kaldes afbeskyttelse og aminogruppen der før var beskyttet er frigjort.

Kobling: DMF suges fra sprøjterne og ventilerne lukkes. Fmoc-Ser(tBu)-OH opløsningen (0.5 mL 0.09 mmol) overføres til et Eppendorphrør og der tilsættes aktiveringsopløsning (400 microliter) og N-ethyl morpholinopløsning (400 microliter) og der blandes med pipetten (husk altid at bruge friske pipettespidser). Efter 3 min henstand tilsættes 650 microliter af opløsningen til hver sprøjte og indhold blandes forsigtigt med en ren spatel uden at knuse resinkugler. Reaktionen henstår i 30 min, hvorpå der vaskes ud med 7 mL DMF som beskrevet ovenfor.

Afbeskyttelse af Fmoc gentages som beskrevet ovenfor.

I næste trin kobles to forskellige aminosyrer i hver af sprøjterne, Fmoc-Leu-OH (250 microliter, aktiveret med 200 microliter aktiverings opløsning + 200 N-ethylmorpholin) som efter aktivering sættes til den ene sprøjte og Fmoc-Glu(O-tBu)-OH (250 microliter, aktiveret med 200 microliter aktiverings opløsning + 200 N-ethylmorpholin) som efter aktivering sættes til den anden sprøjte. Husk at markere hvilken sprøjte der er hvad i.

Der afbeskyttes, vaskes, kobles og vaskes i tre omgange på samme måde i begge sprøjter med aminosyrene Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH (resten af opløsningen) og Fmoc-3-nitro-Tyr-OH. Inden Fmoc-3-nitroTyr-OH koblingen overføres ~50 resinkugler (5-10 microliter resin) til et Eppendorphrør til sammenligning. I hver kobling aktiveres 0.09 mmol aminosyre som fordeles mellem sprøjterne efter aktivering, dvs 650 mL aktiveret opløsning /sprøjte.

Der udføres en sidste Fmoc afbeskyttelse for at kløve Fmoc af 3-nitroTyr-peptiderne på de to resiner.

Resinen vaskes med DMF (5 mL) og med vand 10 mL. Ventilerne lukkes og resinen tilsættes HCl (2M, 2 mL, stærk syre, pas på fingre, øjne og tøj) i 30 min. Der vaskes grundigt med vand, natriumbicarbonat-opløsning og vand (20 mL/sprøjte).

Et fluorescensmikroskop tændes og klargøres til enzymforsøg. Resinerne fordeles og behandles i en microtiter bakke med 10^{-7} M opløsning af enzymet Subtilisin Carlsberg, mens der observeres under fluorescensmikroskop og tages billeder af resinen. Der kan laves en blanding af de to resiner for at se forskellen og der kan sammenlignes med den udtagne reference.

Der kan kvalitativt måles på lysintensiteter og sammenligne hastigheder. Hvilket substrat er bedst så det reagerer hurtigst. Man kan besvare spørgsmålet: Er reaktionshastighederne påvirket af enzymets diffusion i polymernetværket ved de betingelser der er anvendt for hver de to substrater?