



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

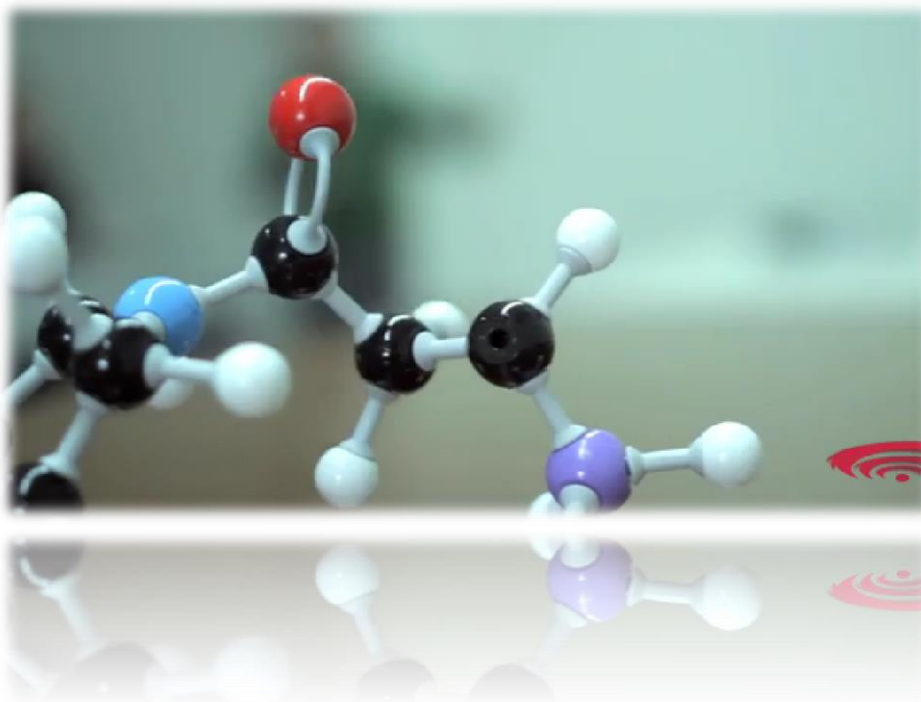
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΙΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΥΣ



ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΝΤΟΠΙΔΗΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΑΡΔΙΤΣΑ
2014



Εικόνα εξωφύλλου:

Στιγμιότυπο από το εργαστήριο στα
πλαίσια της παρουσίασης του προγράμματος:
ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΕΝΤΡΩΝ ΑΡΙΣΤΕΙΑΣ
ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΟΥ ΠΘ.

Το Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων, Πολιτισμού και Αθλητισμού
αναγνώρισε τη δράση Ακαδημαϊκής και Επιστημονικής Αριστείας
στο Τμήμα της Κτηνιατρικής:
Βραβεύοντας τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιο Κοντοπίδη, πάνω στην:

***“Αναγνώριση αριστείας στη
στοχευμένη ανάπτυξη φαρμακευτικών ουσιών”***

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	3
Ασφάλεια και Κανόνες Εργαστηρίου	4
Σχέδιο παρουσίασης των εργασιών των φοιτητών	6
Χημικά αντιδραστήρια και γυάλινα σκεύη	7
Διεθνή σύμβολα κινδύνου	12
Εισαγωγή στην εργαστηριακή διαδικασία	13
Σχέδιο ευθύνης οργάνων εργαστηρίου ανά ομάδα	16
<i>1^η Άσκηση</i>	
Ανίχνευση πεπτιδίων - πρωτεϊνών	19
<i>2^η Άσκηση</i>	
Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Μέθοδος BRADFORD	24
<i>3^η Άσκηση</i>	
Προσδιορισμός ισοηλεκτρικού σημείου πρωτεϊνών	29
<i>4^η Άσκηση</i>	
Φωτομετρικός προσδιορισμός φώσφορου σε ορό αίματος με τη μέθοδο του μολυβδαινικού αμμωνίου	33
<i>5^η Άσκηση</i>	
Προσδιορισμός και διαχωρισμός αμινοξέων με χρωματογραφία TLC	38
<i>6^η Άσκηση</i>	
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	44
<i>7^η Άσκηση</i>	
Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων (ΜΕΡΟΣ I)	55
<i>8^η Άσκηση</i>	
Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων (ΜΕΡΟΣ II)	64
<i>9^η Άσκηση</i>	
Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων (ΜΕΡΟΣ III)	69
<i>10^η Άσκηση</i>	
Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων - Ανάλυση Δεδομένων	72
<i>11^η Άσκηση</i>	
Ημιποσοτικός προσδιορισμός αμυλάσης σε δείγμα ούρων	84
<i>12^η Άσκηση</i>	
Προσδιορισμός τρανσαμινασών στον ορό αίματος	89
<i>13^η Άσκηση</i>	
Εφαρμογή ενζυματικής διαγνωστικής χρωματομετρικής μεθόδου	94
<i>14^η Άσκηση</i>	
Διαδίκτυο και βάσεις δεδομένων νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών	98
Ευχαριστήρια	105

ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Κατά την παραμονή αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια της άσκησης σε ένα χημικό εργαστήριο ακολουθείται η τήρηση των παρακάτω κανόνων ασφάλειας:

- Δεν εργάζεται κανείς μόνος του στο εργαστήριο. Η παρουσία του υπεύθυνου είναι απαραίτητη.
- Χρησιμοποιείται πάντοτε εργαστηριακή ποδιά.
- Απαγορεύεται αυστηρά το κάπνισμα μέσα στον εργαστηριακό χώρο.
- Αποφεύγεται η οποιαδήποτε επαφή χημικών αντιδραστηρίων με το δέρμα (χέρια, πρόσωπο κλπ.)
- Δεν δοκιμάζονται γευστικά τα αντιδραστήρια.
- Απαγορεύεται ο αυτοσχεδιασμός με άγνωστα αντιδραστήρια ξένα προς το αντικείμενο της εκάστοτε πειραματικής άσκησης.
- Τα αναφλέξιμα υγρά (αλκοόλες, αιθέρας, βενζόλιο κλπ.) θερμαίνονται σε ειδικά υδρόλουτρα ή ελαιόλουτρα και ποτέ σε γυμνή φλόγα.
- Τα οξέα αραιώνονται με προσθήκη οξέος σε νερό και ποτέ αντίστροφα.
- Οι φιάλες των αντιδραστηρίων δεν απομακρύνονται από τη θέση τους. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποσότητες αντιδραστηρίων μεγαλύτερες από αυτές που αναφέρει η οδηγία της άσκησης.
- Δεν εισπνέονται άμεσα από τα δοχεία αντιδραστηρίων ατμοί ή αέρια αντιδραστήρια. Όταν αυτό χρειασθεί μετακινείστε το χέρι σας από το στόμιο προς τη μύτη, μεταφέροντας έτσι μικρή ποσότητα ατμών ή αερίου
- Τυχόν προβλήματα ή ατυχήματα γνωστοποιούνται έγκαιρα στον υπεύθυνο.
- Μετά το τέλος της εργασίας και πριν την απομάκρυνση από το εργαστήριο πλένονται καλά τα χέρια και το πρόσωπο.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Έγκαιρη προσέλευση στο εργαστήριο. Το πείραμα ξεκινά 10 λεπτά μετά την καθορισμένη ώρα προσέλευσης στο εργαστήριο.
- Προετοιμασία της εργαστηριακής άσκησης πριν την εκτέλεσή της (προετοιμασία στο σπίτι). Θα γίνεται εξέταση του βαθμού κατανόησης της ασκήσεως από τους διδάσκοντες με ερωτήσεις.
- Παράδοση (γραππώς) της προηγούμενης άσκησης που πραγματοποιήθηκε, πριν από την εκτέλεση της νέας άσκησης (μη παράδοση θα βαθμολογείτε αρνητικά).
- Αποφεύγονται οι άσκοπες μετακινήσεις και η δημιουργία θορύβου.
- Στο χώρο του εργαστηρίου απαγορεύεται αυστηρά η λήψη τροφής.
- Μιλάτε χαμηλόφωνα και απευθύνεστε στους υπεύθυνους του εργαστηρίου για οποιοδήποτε πρόβλημα στην πορεία της άσκησης. Συνεργαστείτε επίσης, με τα μέλη της ομάδας σας για τυχόν διευκρινήσεις.
- Μετά το τέλος της εργασίας καθαρίζονται οι εργαστηριακοί πάγκοι. Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν καθαρίζονται και τοποθετούνται στις θέσεις τους.
- Φοιτητές χωρίς ποδιά, δεν μπορούν να μετέχουν σε πειραματικές εργασίες.
- Η παράδοση των αντιδραστηρίων και των σκευών – οργάνων απαραίτητων για την άσκηση γίνεται στην αρχή του εργαστηρίου. Καταστροφή ή μη δόκιμη χρήση τους, βαραίνει την ομάδα των φοιτητών και δεν αντικαθίσταται.
- Όλα τα σκεύη θα καθαρίζονται στον εργαστηριακό σας πάγκο. Όλα τα απόβλητα θα συλλέγονται σε ένα ποτήρι ζέσεως.

ΓΕΝΙΚΟ ΣΧΕΔΙΟ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ ΤΩΝ ΦΟΙΤΗΤΩΝ

Αριθμός άσκησης :	Τίτλος Άσκησης:
Ημερομηνία άσκησης:	Ημερομηνία παράδοσης:
Ομάδα: (ονόματα μελών ομάδας και υπογραφές)	

ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΓΥΑΛΙΝΑ ΣΚΕΥΗ

Χημικά αντιδραστήρια είναι οι διάφορες χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Οι ουσίες αυτές είναι είτε ανόργανες είτε οργανικές και τα χαρακτηριστικά τους διακρίνονται στην επιγραφή (ετικέτα), που υπάρχει σε κάθε φιάλη ή δοχείο του χημικού αντιδραστηρίου (Σχήμα 1).

Στην επιγραφή αυτή αναφέρονται συνήθως στοιχεία που αφορούν το όνομα του χημικού αντιδραστηρίου, το χημικό του τύπο, το μοριακό του βάρος και το βαθμό καθαρότητας του. Όταν το περιεχόμενο αντιδραστήριο βρίσκεται σε μορφή διαλύματος αναφέρεται ακόμη η περιεκτικότητά του καθώς και το ειδικό του βάρος. Επίσης όταν πρόκειται για υγρές ουσίες αναφέρονται το ειδικό βάρος και το σημείο ζέσεως του αντιδραστηρίου.

Η επιγραφή της φιάλης διαβάζεται προσεκτικά πριν τη χρήση των αντιδραστηρίων.

ΣΗΜΑΝΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Η **σήμανση** των χημικών ουσιών στοχεύει στην ενημέρωση των χρηστών σχετικά με τους κινδύνους από τα χημικά αντιδραστήρια και τον ασφαλή χειρισμό τους. Οι ετικέτες των χημικών ουσιών πρέπει να δείχνουν με ευκρίνεια:

- το όνομα της χημικής ουσίας
- το όνομα, τη διεύθυνση και το τηλέφωνο του παρασκευαστή ή/και του εισαγωγέα
- το σύμβολο επικινδυνότητας της χημικής ουσίας
- τις φράσεις κινδύνου και προστασίας
- την ποσότητα που περιέχεται στο δοχείο
- τα δοχεία με τα διαλύματα πρέπει να αναγράφουν ευκρινώς τη σύστασή τους και το όνομα του χρήστη



Σχήμα 1: Ετικέτα δοχείου αντιδραστηρίου

Οι στερεές ουσίες ζυγίζονται με ακρίβεια στο εργαστηριακό ζυγό και κατόπιν μεταφέρονται στο τελικό σκεύος. Η μεταφορά τους δεν γίνεται απ' ευθείας στο τελικό σκεύος αλλά μέσω καθαρού γυαλιού ή κάψας ή καθαρού χαρτιού κατάλληλα διαμορφωμένου για τη μεταφορά και την απόχυση της ουσίας στο τελικό σκεύος.

Για τις υγρές ουσίες και τα διαλύματα ο προσδιορισμός της μάζας τους γίνεται συνήθως μέσω της μέτρησης του όγκου τους. Για το λόγο αυτό τα όργανα μέτρησης όγκου υγρών έχουν ιδιαίτερη θέση σε κάθε χημικό εργαστήριο. Ανάλογα με τον όγκο και την ακρίβεια που θέλουμε να μετρήσουμε χρησιμοποιούμε τα κατάλληλα γυάλινα σκεύη. Τα συνηθισμένα όργανα μέτρησης όγκου υγρών είναι οι ογκομετρικές φιάλες, τα σιφώνια, οι προχοϊδες και οι ογκομετρικοί κύλινδροι.

Στις επόμενες σελίδες, παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικά από τα σημαντικότερα εργαστηριακά υάλινα σκεύη (Σχήμα 2).

Ειδικότερα στο **Σχήμα 3**, παρουσιάζονται τα σημαντικότερα γυάλινα **σκεύη ογκομέτρησης** καθώς και η ακρίβεια μέτρησης του όγκου για κάθε σκεύος.

Προσοχή!! Κάθε όργανο έχει διαφορετική ακρίβεια.

Επίσης, στο Σχήμα 4, παρουσιάζεται ο ενδεδειγμένος τρόπος ανάγνωσης της τιμής του όγκου που δείχνει η κλίμακα σε κάθε ογκομετρικό σκεύος. Σε πολλά γυάλινα σκεύη, αναγράφεται επάνω στο γυαλί η ολική χωρητικότητά τους αλλά και η βαθμονομημένη χωρητικότητά τους (Σχήμα 5).

Εκτός όμως των παραπάνω υάλινων σκευών, στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται και ορισμένες ηλεκτρονικές συσκευές ενόργανης ανάλυσης και ζύγισης, όπως: **αναλυτικός ζυγός, ηλεκτρονικό πεχάμετρο, φασματοφωτόμετρο και φυγόκεντρος**. Αυτές παρουσιάζονται στα Σχήματα 7, 8, 9 και 10.

Τέλος, παρουσιάζεται πίνακας με τα διεθνή σύμβολα κινδύνου, τα οποία μπορεί να υπάρχουν επάνω στις ετικέτες των δοχείων των αντιδραστηρίων.

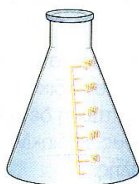
Μερικά όργανα του εργαστηρίου Χημείας



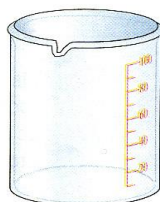
Ογκομετρικοί κύλινδροι



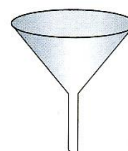
Δοκιμαστικοί σωλήνες



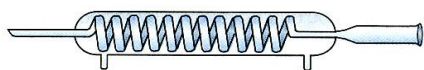
Κωνική φιάλη
βαθμολογημένη



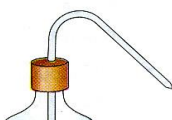
Ποτήρι ζέσεως



Χωνί

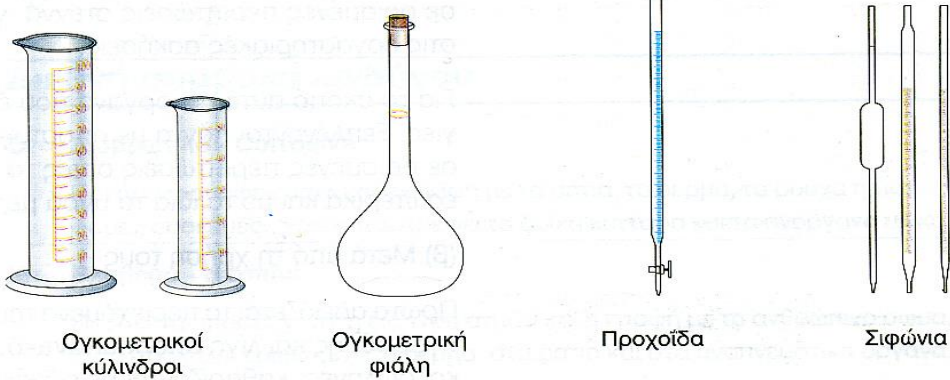


Απλός ψυκτήρας



Μεταλλικό λαβίδιο

Σχήμα 2: Μερικά υάλινα εργαστηριακά σκεύη.



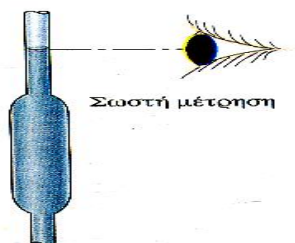
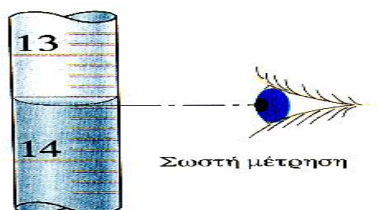
Σχήμα 3: Υάλινα εργαστηριακά σκεύη ογκομέτρησης.

Ογκομετρικός κύλινδρος = 0,7 ακρίβεια

Προχοΐδα = 0,1 ακρίβεια

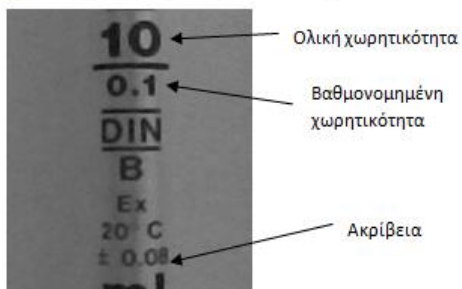
Ογκομετρική φιάλη = 0,1 ακρίβεια

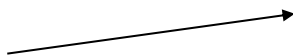
Σιφώνιο = 0,1 ακρίβεια



Σχήμα 4:

Ανάγνωση τιμής όγκου σε ογκομετρικό
Η ανάγνωση στην κλίμακα μέτρησης του όγκου, γίνεται στο σημείο του μηνίσκου που σχηματίζει το υγρό εντός του σωλήνα.





Σχήμα 5: Φωτογραφία ενός σιφωνίου.

Σχήμα 6: Φωτογραφία ενός ογκομετρικού
κυλίνδρου

Μπορείτε να διακρίνετε: την ολική χωρητικότητα, την βαθμονομημένη χωρητικότητα, ακρίβεια μέτρησης καθώς και την μονάδα μέτρησης (ml).



Σχήμα 7: Αναλυτικός Ζυγός



Σχήμα 8: Πεχάμετρο



Σχήμα 9: Φασματοφωτόμετρο



Σχήμα 10: Φυγόκεντρος

Διεθνή σύμβολα κινδύνου



C Διαβρωτικό - Corrosive

Πρέπει να αποφεύγεται κάθε επαφή με τα μάτια, το δέρμα, τα ρούχα ή τις διάφορες συσκευές, διότι καταστρέφει τα ζωικά κύτταρα και τα ανόργανα υλικά.



Xn Βλαβερό - Harmful

Πρέπει να αποφεύγεται η εισπνοή ατμών και η επαφή με το ανθρώπινο σώμα, διότι προκαλεί ερεθισμό στο δέρμα, στα μάτια και στα αναπνευστικά όργανα.



Xi Ερεθιστικό - Irritant

T+ Πολύ τοξικό - Very Toxic

Πρέπει να αποφεύγεται οποιαδήποτε επαφή με το δέρμα και τα μάτια, καθώς και η εισπνοή του.

T Τοξικό - Toxic



F Πολύ Εύφλεκτο - Highly Flammable

Πρέπει να φυλάγεται μακριά από γυμνή φλόγα, εστίες θέρμανσης, ηλεκτρικούς σπινθήρες και να μην έρχεται σε επαφή με θερμές επιφάνειες.

F+ Εξαιρετικά Εύφλεκτο - Extremely Flammable



O Οξειδωτικό - Oxidizing

Πρέπει να διατηρείται μακριά από γυμνή φλόγα, εστίες θέρμανσης και ηλεκτρικούς σπινθήρες.



E Εκρηκτικό - Explosive

Πρέπει να διατηρείται μακριά από γυμνή φλόγα, εστίες θέρμανσης, ηλεκτρικούς σπινθήρες, και ν' αποφεύγεται η τριβή και η κρούση.

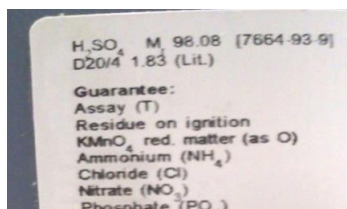
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επιλογή των σωστών αντιδραστηρίων:

Η παρασκευή οποιουδήποτε διαλύματος δεν είναι απλή υπόθεση. Ακόμη και πριν την έναρξη των υπολογισμών πρέπει να γνωρίζουμε τη διαθεσιμότητα και το είδος των αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιηθούν. Πολλά αντιδραστήρια μπορεί να είναι **ένυδρα** (δηλαδή στον χημικό τους τύπο περιέχουν μόρια H₂O) ή να είναι **άνυδρα** (δηλαδή να μην περιέχουν μόρια H₂O παρά μόνο τον χημικό τύπο της ουσίας). Κλασικό παράδειγμα είναι ο **CuSO₄** (θειικός χαλκός), όπου σε μια ένυδρη μορφή του είναι CuSO₄·5H₂O. Κατ' αυτόν τον τρόπο το μοριακό βάρος του αντιδραστηρίου γίνεται ως εξής:

Molecular Formula: CuSO₄
Molecular Weight: 159.6

Molecular Formula: CuSO₄ · 5H₂O
Molecular Weight: 249.7



Σχήμα 11. Εύρεση Mr σε αντιδραστήριο του εμπορίου

Ακρίβεια στη ζύγιση:

Για την παρασκευή διαλυμάτων απαιτείται ακρίβεια στη ζύγιση. Στα εργαστήρια υπάρχουν όργανα ζύγισης που έχουν την δυνατότητα να μετρούν έως και το 4^ο με 5^ο δεκαδικό ψηφίο. Ωστόσο πολλές φορές η ζύγιση μικροποσοτήτων είναι ιδιαίτερα δύσκολη, γι' αυτό προτιμάται η δημιουργία ενός πυκνού διαλύματος το οποίο, μέρος του, αραιώνεται κατά περίπτωση για την δημιουργία των τελικών διαλυμάτων. Ομοίως και για την παρασκευή διαλυμάτων ορού, φαρμάκων κτλ αρκετές φορές χρησιμοποιούνται ουσίες οι οποίες έχουν μεγάλο κόστος. Ο χειρισμός τέτοιων αντιδραστηρίων απαιτεί τη μέγιστη ακρίβεια.

Επίτευξη σωστού τελικού όγκου διαλύματος:

Η διάλυση μιας ή περισσότερων ουσιών, ή η ανάμιξη δύο ή περισσότερων διαλυμάτων, ή ακόμα και συνδυασμός των προηγούμενων πρέπει να γίνεται σε μικρότερο από τον τελικό όγκο του διαλύματος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η διάλυση μεγάλης ποσότητας ουσίας, όπου αν διαλυθεί η ουσία απευθείας στον τελικό όγκο είναι δυνατόν ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι μεγαλύτερος από τον ζητούμενο όγκο, οπότε και αλλάζει η υπολογισμένη αρχική συγκέντρωση. Ομοίως για την ανάμιξη διαλυμάτων γίνεται σε ένα αρχικό μέρος του διαλύτη και έπειτα συμπληρώνεται το διάλυμα με τον διαλύτη μέχρι τον τελικό όγκο.



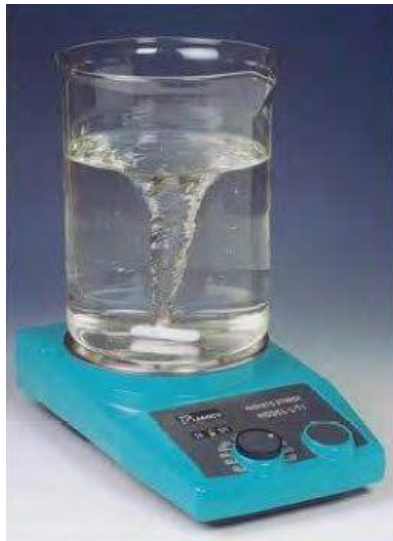
Σχήμα 12. (Α) Σωστή ζύγιση της ουσίας, (Β) Διάλυση της ουσίας σε μέρος του διαλύτη, (Γ) Πλήρωση του διαλύματος με τον διαλύτη μέχρι τελικού όγκου.

Σωστή ανάμιξη διαλυμάτων:

Πρέπει να λαμβάνεται υπόψη πως η διάλυση μιας ουσίας ή η ανάμιξη διαλυμάτων πρέπει να είναι τέτοια ώστε στο τελικό παρασκεύασμα σε όλη την έκτασή του να είναι ομοιόμορφη η συγκέντρωση. Αυτό είναι πολύ ουσιώδες καθώς πολλές φορές, συνήθως σε διαφανή παρασκευάσματα, δεν γίνεται αντιληπτή αυτή η συνθήκη με αποτέλεσμα, το τελικό προϊόν να έχει διαφορετική συγκέντρωση και η χρησιμοποίησή του δίνει εσφαλμένες εντυπώσεις σε αναλύσεις, μετρήσεις ακόμη και έρευνες. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται συσκευές ανάδευσης όπως φαίνεται παρακάτω στο σχήμα.

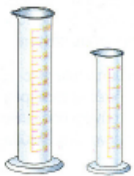


Σχήμα 13. Μη σωστή ανάμειξη όπου η συγκέντρωση της ουσίας μπορεί να κυμαίνεται στο διάλυμα από $\approx 0\%$ στα επιφανειακά στρώματα του διαλύματος, έως 100% στο βυθό του διαλύματος.



Σχήμα 14. Σωστή ανάμειξη με ανάδευση σε συσκευή που χρησιμοποιεί μαγνήτη ώστε η συγκέντρωση να γίνει ομοιόμορφη στο διάλυμα.

ΟΡΓΑΝΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΧΗΜΕΙΑΣ



Ογκομετρικοί κύλινδροι

ΟΜΑΔΑ			
100ml			
50ml			
25ml			
10ml			



Πατήρι ζύσεως

ΟΜΑΔΑ			
1000ml (ή 800ml)			
250ml			
150ml			
100ml			
50ml			
25ml			
10ml			



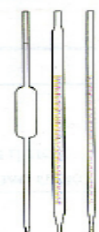
Κωνική φιάλη βαθμοσκοπημένη

ΟΜΑΔΑ			
250ml			
150ml			
100ml			
50ml			
25ml			



Ογκομετρική φιάλη

ΟΜΑΔΑ			
250ml			
100ml			



Σιφώνια

ΟΜΑΔΑ			
10ml			
5ml			
2ml			
1ml			



Υδροβολέας

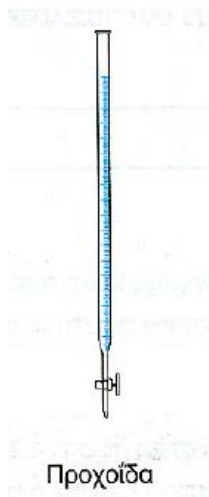
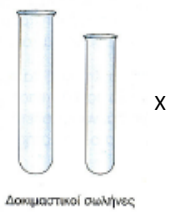


Χωνί

ΟΜΑΔΑ			

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΠΟΥΑΡ			
ΦΟΥΣΚΑ			
ΒΑΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ			
ΑΝΑΔΕΥΤΗΡΑΣ			
2 ΜΙΚΡΟΠΙΠΕΤΕΣ			
5 ΚΙΟΥΒΕΤΕΣ			



ΠΕΧΑΜΕΤΡΟ Χ 1

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ Χ 1

**ΟΜΑΔΑ:
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ:
ΗΜΕΡΟΝΗΜΙΑ:
ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΑ:**

**ΟΜΑΔΑ:
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ:
ΗΜΕΡΟΝΗΜΙΑ:
ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΑ:**

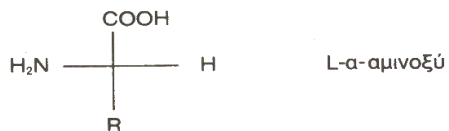
ΟΜΑΔΑ:
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ:
ΗΜΕΡΟΝΗΜΙΑ:
ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΑ:

ΑΣΚΗΣΗ 1

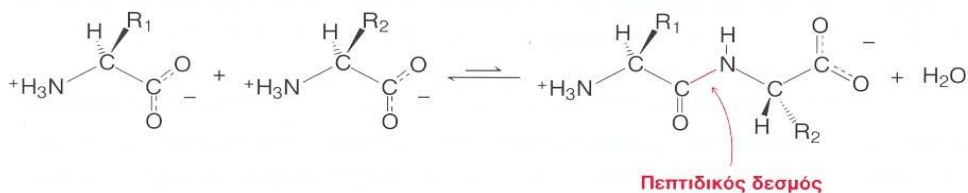
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ-ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι πρωτεΐνες είναι οργανικές ενώσεις όπου η χημική τους δομή περιλαμβάνει οξυγόνο, υδρογόνο, άνθρακα και άζωτο που αποτελεί και το χαρακτηριστικό συστατικό τους. Είναι δυνατόν στο μόριο τους να περιλαμβάνονται επιπλέον θείο, φωσφόρο, σίδηρος κοβάλτιο κ.ά. Η δομική μονάδα των πρωτεϊνών είναι τα αμινοξέα:



Ο δεσμός, που () ενός και την αμινομάδα του άλλου αμινοξέος, ονομάζεται *πεπτιδικός δεσμός*. Το προϊόν της συμπύκνωσης είναι ένα διπεπτίδιο



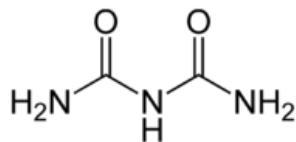
Πολλές τροφές περιέχουν πρωτεΐνες και συνεπώς ο προσδιορισμός τους είναι εξίσου σημαντικός όσο και ο ρόλος τους. Παρακάτω εκτίθενται μερικοί τρόποι για την ανίχνευση πρωτεϊνών των τροφών. Όλες οι μέθοδοι στηρίζονται σε χαρακτηριστικές αντιδράσεις των πρωτεϊνών με ορισμένα χημικά αντιδραστήρια. Πολλές τροφές περιέχουν πρωτεΐνες και συνεπώς ο προσδιορισμός τους είναι εξίσου σημαντικός όσο και ο ρόλος τους. Παρακάτω εκτίθενται μερικοί τρόποι για την ανίχνευση πρωτεϊνών των τροφών. Όλες οι μέθοδοι στηρίζονται σε χαρακτηριστικές αντιδράσεις των πρωτεϊνών με ορισμένα χημικά αντιδραστήρια.

Αναλυτικότερα:

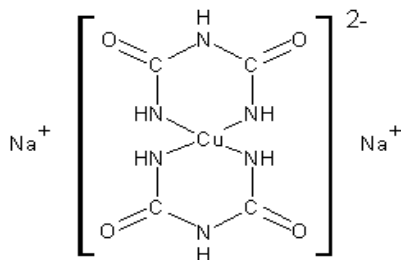
- ♦ Οι πρωτεΐνες σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζουν με ιόντα χαλκού Cu^{2+} συμπλοκές έγχρωμες χημικές ενώσεις (αντίδραση Biuret ή διουρίας) από τις οποίες δύνανται να προσδιορισθούν χρωματομετρικά.
- ♦ Με την προσθήκη πυκνού νιτρικού οξέος σε πρωτεΐνες παράγεται χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα που γίνεται πιο έντονο μετά από θέρμανση (αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης).

Αρχή Προσδιορισμού Πρωτεϊνών με την Μέθοδο της Διουρίας ή Biuret

Ουσίες που περιέχουν τουλάχιστον δυο πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζουν σε αλκαλικό περιβάλλον σύμπλοκα με ιόντα Cu^{2+} που έχουν έντονη **ιώδη χροιά**. Η αντίδραση αυτή ονομάζεται αντίδραση της διουρίας γιατί η απλούστερη ουσία που τη δίνει θετική είναι η διουρία:



Η διουρία δεν βρίσκεται στους ζωντανούς οργανισμούς απλά δίνει αντίδραση ίδια όπως ένα απλό τριπεπτιδίο. Τα φάσματα απορρόφησης των συμπλοκών διαφορετικών πρωτεϊνών είναι παρόμοια και όχι πανομοιότυπα. Συνήθως η καζεΐνη του γάλακτος χρησιμοποιείται σαν πρότυπο για όλες τις συνηθισμένες πρωτεΐνες χωρίς να έχουμε σφάλμα μεγαλύτερο του 10% κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών.



Εικόνα 1-1. Σύμπλοκο Cu-διουρίας.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι ουσίες εκείνες που περιέχουν στο μόριο τους *τουλάχιστον* δύο πεπτιδικούς δεσμούς αντιδρούν σε διάλυμα Cu^{2+} σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζοντας σύμπλοκα που έχουν χαρακτηριστικό **μπλε-μωβ χρώμα**. Πρέπει να τονιστεί ότι τα ελεύθερα αμινοξέα δεν μπορούν να δώσουν την αντίδραση αυτή.

Απαιτούμενα όργανα και υλικά

ΟΡΓΑΝΑ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΥΛΙΚΑ
10 Δοκιμαστικοί Σωλήνες	Διαλ. Αλβουμίνης Βόειου Ορού (Bovine Serum Albumin- BSA) 1% w/v
Στήριγμα Δοκιμαστικών Σωλήνων	Διαλ. Γλυκίνης 1% w/v
Σταγονόμετρα	Διαλ. CuSO_4 (1.5g/l CuSO_4 , 6g/l τρυγικού Na-K, 30g/l NaOH) (Μπλε Διάλυμα Biuret Reagent)
Φωτόμετρο	
1 (επαναλαμβανόμενη χρήση)	
Σιφώνια 1, 2, 10 ml	

1. Αριθμήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες
2. Στο δοκιμαστικό σωλήνα 1, βάλτε 1 ml διαλύματος αλβουμίνης 1% κ.ο.
3. Στο δοκιμαστικό σωλήνα 2, βάλτε 1 ml διαλύματος Γλυκίνης 1% κ.ο
4. Στο δοκιμαστικό σωλήνα 3, βάλτε 1 ml νερό
5. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προσθέστε 2-3 σταγόνες από το διάλυμα του CuSO_4 , τρυγικού Na-K, NaOH. *Αναδεύστε καλά!!!*
6. Σημειώστε τις χρωματικές αλλαγές που παρατηρούνται.
7. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες 4, 5, 6, 7, 8 και 9 φτιάχνουμε πρότυπα διαλύματα Αλβουμίνης 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 % και αγνώστου αντίστοιχα:

Δοκιμαστικός σωλήνας →



No. 1










No. 2

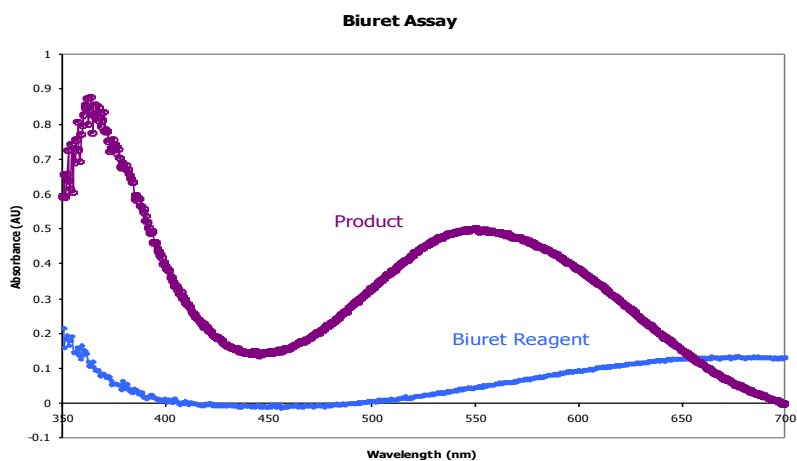


No. 3

1 ml διαλύματος αλβουμίνης 1% κ.ο.	1 ml διαλύματος Γλυκίνης 1% κ.ο	1 ml απιονισμένο νερό
2-3 σταγόνες διαλύματος CuSO_4 , τρυγικού Na-K, NaOH	2-3 σταγόνες διαλύματος CuSO_4 , τρυγικού Na-K, NaOH	2-3 σταγόνες διαλύματος CuSO_4 , τρυγικού Na-K, NaOH

Δοκιμαστικός Σωλήνας	4	5	6	7	8	9	10
							
	0 ml Αλβουμίνης 1%	0.1ml Αλβουμίνης 1%	0.2ml Αλβουμίνης 1%	0.4ml Αλβουμίνης 1%	1 ml Αλβουμίνης 1%	2 ml Αλβουμίνης 1%	2 ml Αγνώστου δειγματος
dH ₂ O	2 ml	1.9 ml	1.8 ml	1.6 ml	1 ml	0 ml	0 ml
Διάλυμα CuSO ₄	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml

8. Μετρήστε την απορρόφηση στα 560nm χρησιμοποιώντας πλαστικές κυψελίδες των 3 ml



Εικόνα 2-1. Καμπύλες απορρόφησης αντιδραστήριου Biuret (μπλε καμπύλη) και του έγχρωμου προϊόντος (μοβ καμπύλη).

Γ. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ-ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Καταγράψτε τις παρατηρήσεις σας στον παρακάτω πίνακα.

ΔΕΙΓΜΑ		ΧΡΩΜΑ
Αλβουμίνη		
Γλυκίνη		
Νερό		
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ		ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ
<i>Διαλύματα Αλβουμίνης</i>		<i>Μέτρηση Απορρόφησης στα 560nm</i>
<i>Πρότυπο διάλυμα % w/v</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>	
0.0		
0.1		
0.2		
0.4		
1		
2		
Άγνωστο Δείγμα		

- Υπολογίστε τις τελικές συγκεντρώσεις της Αλβουμίνης.
- Γιατί η γλυκίνη και η αργινίνη δεν δίνουν θετική αντίδραση;
- Μια πρωτεΐνη υποβάλλεται σε υδρόλυση. Πως θα διαπιστώσετε ότι στο τέλος της αντίδρασης έχει μείνει ποσότητα πρωτεΐνης που δεν έχει υδρολυθεί;
- Σε κάθε έναν από τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες περιέχονται διαλύματα πεπτιδίων. Ένας από τους σωλήνες αυτούς περιέχει ένα διπεπτίδιο, ενώ άλλοι περιέχουν πολυπεπτίδια. Πως θα διαπιστώσετε ποιος σωλήνας περιέχει το διπεπτίδιο;
- Φτιάξτε πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας τα πρότυπα διαλύματα
- Προσδιορίστε τη συγκέντρωση πρωτεϊνών στον ορό αίματος του αγνώστου δ/τος που σας δόθηκε με βάση τη πρότυπη καμπύλη που φτιάξατε.

Αναφορές

- Γεωργάτσος Ι. (1985), **Βιοχημεία, τόμος Α', 5^η Έκδοση**, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων (σ. 19-48)
- Analysis of Proteins** <http://people.umass.edu/~mcclemen/581Proteins.html>
- Γεωργάτσος Ι., Κυριακίδης Δ., Γιουσάνη Τ., Χολής-Παπαδοπούλου Θ., Γιαννακούρου Θ., Νικολακάκη Ε., Πανταζάκη Α., Κοτίνη Κ., Καράγιωργα Α., Ασβεστά Σ. (2004), **Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας**, Εκδόσεις Ζήτη (σ. 33-40)

ΑΣΚΗΣΗ 2

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ – ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

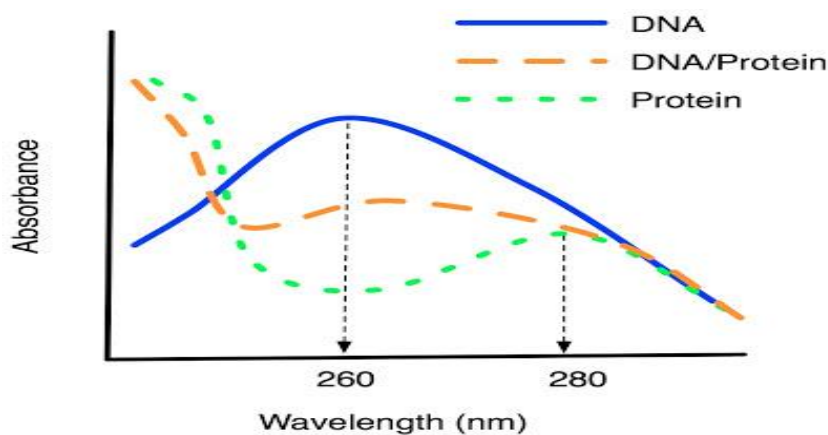
Οι μέθοδοι που στηρίζονται στην απορρόφηση του υπεριώδους φωτός έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα και χωρίς να προστεθεί κανένα αντιδραστήριο στο δείγμα. Δεν απαιτούν επομένως και επώαση του δείγματος. Για την αποφυγή σφαλμάτων, πρέπει όμως να λαμβάνονται υπόψη οι αρχές επάνω στις οποίες στηρίζονται. Το DNA απορροφά περισσότερο στα 260nm, ενώ οι πρωτεΐνες απορροφάνε περισσότερο στα 280nm.

Οι πρωτεΐνες απορροφούν φως στην περιοχή του υπεριώδους σε δύο περιοχές περισσότερο, στα 280 και στα 200 nm. Η απορρόφηση οφείλεται βέβαια στην πρόσληψη ενός φωτονίου από ένα ηλεκτρόνιο. Μόνο φωτόνια με συγκεκριμένο ενεργειακό επίπεδο μπορούν να προσληφθούν (απορροφηθούν) και αυτό καθορίζεται από τη διαφορά στην ενέργεια μεταξύ της τροχιάς του μη-διεγερμένου ηλεκτρονίου (πριν προσλάβει το φυτόνιο) και της τροχιάς υψηλότερης ενέργειας στην οποία μεταπηδά αφού διεγερθεί. Τα φωτόνια με τη μεγαλύτερη ενέργεια έχουν μικρότερο μήκος κύματος. Έτσι, τα ηλεκτρόνια τα οποία διεγείρονται στα 280 nm απορροφούν λιγότερη ενέργεια από τα ηλεκτρόνια τα οποία διεγείρονται στα 200 nm. Το γεγονός οφείλεται στο ότι τα ηλεκτρόνια που απορροφούν (διεγείρονται) στα 280 nm εντοπίζονται σε αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι σταθεροποιούν τα διεγερμένα ηλεκτρόνια λόγω του συντονισμού που παρουσιάζουν. Αμινοξέα τα οποία φέρουν αρωματικό δακτύλιο είναι η *φαινυλαλανίνη*, η *τρυπτοφάνη*, η *ιστιδίνη* και η *τυροσίνη*. Επομένως, πρωτεΐνες που περιέχουν μικρό αριθμό αυτών των αμινοξέων αναμένεται να μην απορροφούν ισχυρά στα 280 nm, πρόβλεψη που επαληθεύεται στην περίπτωση της ζελατίνης.

Τη διέγερση ηλεκτρονίων των αρωματικών δακτυλίων στα 280nm επηρεάζει η αλληλεπίδραση με άλλα αμινοξέα, άρα η στερεοδομή της πρωτεΐνης. Επειδή τη στερεοδομή επηρεάζουν επίσης τα ρυθμιστικά διαλύματα, το pH, η πολικότητα και

η ιονική ισχύς, οι παράγοντες αυτοί επιδρούν στην απορρόφηση μιας πρωτεΐνης στα 280nm. Αν και μεταξύ των πρωτεϊνών εμφανίζεται μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς την απορρόφηση που παρουσιάζουν στα 280nm, αυτό το μήκος κύματος είναι πιο χρήσιμο για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών επειδή σε μικρότερα μήκη κύματος απορροφούν άλλα βιομόρια (π.χ. το DNA) ή διάφορες χημικές ενώσεις.

Ο πεπτιδικός δεσμός απορροφά φωτόνια σε μήκη κύματος μικρότερα από 210nm. Επειδή υπάρχουν πολλοί πεπτιδικοί δεσμοί σε μία πρωτεΐνη, η απορρόφησή της αντίστοιχα είναι υψηλή. Το μειονέκτημα όμως κάθε προσπάθειας υπολογισμού της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος μέσω της απορρόφησης στα 210 nm είναι ότι πολλές χημικές ενώσεις και ιδίως όσες περιέχουν διπλούς δεσμούς μεταξύ ανθράκων ή άνθρακα και οξυγόνου, απορροφούν στο ίδιο μήκος κύματος.



$A_{260}/A_{280} = 1.8$

Αυτό σημαίνει ότι το DNA είναι καθαρό

$A_{260}/A_{280} = 0.5$

Αυτό σημαίνει ότι το δείγμα περιέχει κυρίως πρωτεΐνες

$A_{260}/A_{280} =$ μεταξύ 0,5 - 1,8

Αυτό σημαίνει ότι το DNA είναι αναμεμιγμένο με πρωτεΐνη (το πιο κοντά η τιμή είναι 0,5, η μεγαλύτερη μόλυνση πρωτεΐνη που έχετε)

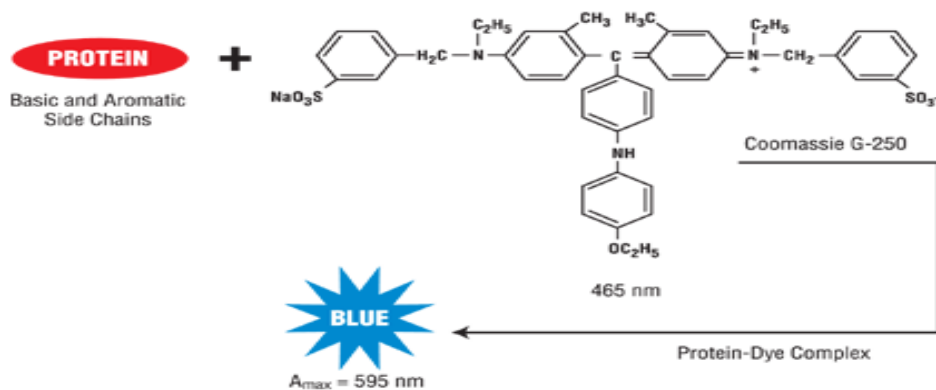
$A_{260}/A_{280} =$ μεγαλύτερη από 1.8

Αυτό σημαίνει ότι το δείγμα σας είναι μολυσμένο με RNA (Επειδή οι βάσεις ουρακίλης U στο RNA απορροφούν περισσότερο φως στα 260 nm από τις βάσεις της θυμίνη T που έχουν αντικαταστήσει)

Σήμερα είναι διαθέσιμες πολλές μέθοδοι για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Η επιλογή της κατάλληλης κάθε φορά μεθόδου εξαρτάται από την

ποσότητα της διαθέσιμης για μετρήσεις πρωτεΐνης, την εξειδίκευση και ευαισθησία της κάθε μεθόδου, την παρουσία χημικών ενώσεων που παρεμβάλλονται στη μέθοδο και τέλος την ευχέρεια και αξιοπιστία κάθε μεθόδου. Βέβαια, η ευαισθησία της κάθε μεθόδου είναι σχετική, επειδή εν μέρει εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της κάθε πρωτεΐνης. Συχνά για να ποσοτικοποιηθεί μία πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση ή για να απαλλαγεί από ανεπιθύμητες χημικές ενώσεις, πρέπει να συμπυκνωθεί (π.χ. μέσω υπερδιήθησης ή διαπίδυσης) ή να κατακρημνισθεί (π.χ. με θειικό αμμώνιο ή τριχλωροξικό οξύ TCA).

Η **μέθοδος Bradford** στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G 250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595nm.

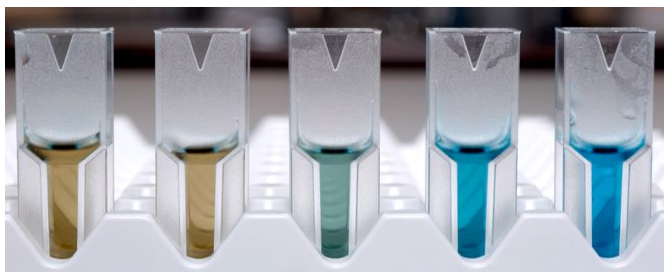


Η μέθοδος αυτή έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

- ✓ Είναι απλή γιατί η μέτρηση γίνεται ύστερα από ανάμειξη του διαλύματος της πρωτεΐνης με ένα μόνο διάλυμα χρωστικής.
- ✓ Είναι πολύ γρήγορη
- ✓ Είναι πολύ ευαίσθητη γιατί επιτρέπει τον προσδιορισμό μέχρι και 5 μg πρωτεΐνης και
- ✓ Οι παράγοντες που την παρεμποδίζουν είναι πολύ λιγότεροι.

Τα δείγματα πρέπει να ανακινούνται και ύστερα από μερικά λεπτά μετρείται η απορρόφηση στα 595 nm. Τα δείγματα δεν πρέπει να μείνουν περισσότερο από 1 ώρα. Από την πρότυπη καμπύλη υπολογίζονται τα mg πρωτεΐνης του κάθε

ενζυμικού παρασκευάσματος. (Στην εικόνα φαίνονται οι χρωματισμοί με αυξανόμενη την ποσότητα της πρωτεΐνης)



Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Παρασκευή του αντιδραστήριου Bradford:









Διαλύονται 0,2 g Coomassie Brilliant Blue G250 σε 200 ml H₃PO₄ 85%. Αναδεύεται καλά για μία νύχτα και στη συνέχεια αραιώνεται με dH₂O μέχρι τελικού όγκου 1 L. Διηθείται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Καθαρίζετε τα σκεύη σας πριν την πειραματική διαδικασία αλλά και μετά το πέρας αυτής με λίγη χλωρίνη, αιθανόλη, νερό βρύσης και απιονισμένο που σας δοθούν.

Απαιτούμενα όργανα και υλικά

ΟΡΓΑΝΑ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΥΛΙΚΑ
6 Δοκιμαστικοί Σωλήνες	Πρότυπο Αλβουμίνης Βόειου Ορού (Bovine Serum Albumin-BSA) C=1mg/ml
Στήριγμα Δοκιμαστικών Σωλήνων	Έτοιμο αντιδραστήριο Bradford ≈ 30ml/ομάδα
Φωτόμετρο	Άγνωστο διάλυμα
1 κυψελίδα (επαναλαμβανόμενη χρήση)	
Σιφώνια 1, 2, 5 ml	

Αραιώνετε το αρχικό διάλυμα των 1ml, **BSA 1mg/ml** (Αλβουμίνης Βόειου Ορού Bovine Serum Albumin- BSA), που πήρατε προσθέτοντας άλλα 24ml dH₂O και εργάζεστε όπως περιγράφει ο πίνακας:

Δοκιμαστικός Σωλήνας ->	Τυφλό (T)	1	2	3	4	5	6
							
BSA	0 ml	0.5 ml	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	Άγνωστο
d H₂O	5 ml	4.5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml	
<p>Αφού δημιουργηθούν τα παραπάνω διαλύματα, τότε και μόνο τότε αρχίζετε να προσθέτετε το αντιδραστήριο Bradford</p> <p>Το αντιδραστήριο Bradford φυλάσσεται σε σκιερό μέρος.</p>							
Avt. Bradford	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

1. Αφού αναδεύσετε ισχυρά τα διαλύματα, οι σωλήνες αφήνονται σε ηρεμία για 5 λεπτά. Μετρήστε την απορρόφηση στα 595nm χρησιμοποιώντας πλαστικές κυπελίδες των 3 ml. **Η κάθε ομάδα θα πρέπει να ολοκληρώσει τις μετρήσεις της απορρόφησης σε όλους τους σωλήνες μέσα σε 1 ώρα.**
2. Να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις από τις αραιώσεις.
3. Να γίνει γραφική παράσταση των τιμών απορρόφησης των γνωστών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης, ώστε να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη καθώς και να υπολογιστεί η συγκέντρωση του αγνώστου διαλύματος/δείγματος.

Αναφορές

- Thermo Scientific, <http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm>
- EMBL, http://www.euroforum.org/media/photo_galleries/embl/index.html
- Γεωργιάτσος Ι., Κυριακίδης Δ., Γιουσάνη Τ., Χολής-Παπαδοπούλου Θ., Γιαννακούρου Θ., Νικολακάκη Ε., Πανταζάκη Α., Κοτίνη Κ., Καραγιωργα Α., Ασβεστά Σ. (2004), **Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας**, Εκδόσεις Ζήτη.
- Τάσος Οικονόμου, Μαρία Μαρκάκη, Έλενα Κουιμτζόγλου, **Τετράδιο εργαστηριακού μαθήματος (BIO116) - Μέθοδοι μικροβιολογίας και βιοχημείας**, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστήμιο Κρήτης.

ΑΣΚΗΣΗ 3

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Καθίζηση στο ισοηλεκτρικό σημείο.

Οι πλευρικές αλυσίδες (R) μερικών αμινοξικών καταλοίπων καθώς και το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό κατάλοιπο των πρωτεϊνών φέρουν ομάδες που μπορούν να ιονισθούν (Πίνακας 1).

Η ιονισμένη μορφή προκύπτει είτε από την απώλεια H⁺ (για τις όξινες ομάδες), οπότε η πρωτεΐνη αποκτά ένα αρνητικό φορτίο, είτε από την πρόσληψη H⁺ (για τις βασικές ομάδες), οπότε η πρωτεΐνη αποκτά ένα θετικό φορτίο. Επειδή οι ομάδες που μπορούν να ιονισθούν έχουν διαφορετική pKa είναι φανερό ότι αν μια ομάδα είναι ιονισμένη ή όχι, και επομένως αν η πρωτεΐνη φέρει ένα φορτίο ή όχι, εξαρτάται από το pH του διαλύματος σύμφωνα με την εξίσωση Henderson – Hasselbalch.

$$pH = pKa + \frac{\log([μη\ πρωτονιωμένη\ μορφή])}{\log([πρωτονιωμένη\ μορφή])}$$

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι η pKa ισούται με την τιμή του pH, στην οποία η πρωτονιωμένη και μη πρωτονιωμένη μορφή μιας ομάδας βρίσκονται σε ίσα ποσά στο διάλυμα. Σε τιμές pH που ισούνται με pKa ± 1 μιας ομάδας, η ομάδα αυτή δρα σαν ρυθμιστής του pH του διαλύματος.

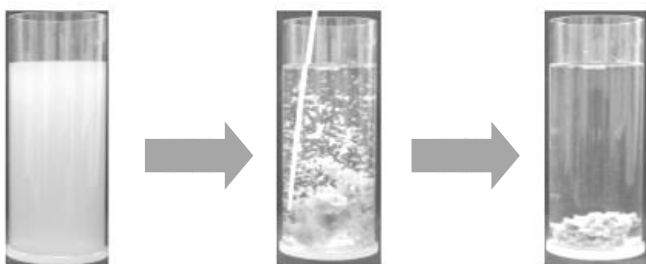
Σημειώστε ότι οι όξινες ομάδες είναι ιονισμένες σε pH > από την pKa τους, ενώ οι βασικές ομάδες είναι ιονισμένες σε pH < από την pKa τους.

Πίνακας 1. Ομάδες αμινοξέων που ιονίζονται σε πρωτεΐνες

Ομάδα	Οξύ	Βάση	Χαρακτηριστική pKa
Τελική	-COOH	-COO ⁻	~ 3,0
	-NH ₂	-NH ₃ ⁺	~ 8,0
Πλευρική	-COOH Asp, Glu	-COO ⁻	~ 4,0
-SH Cys	-SH	-S ⁻	~ 8,5
-OH Tyr	-OH	-O ⁻	~10,0
=N His	=NH ⁺	=N	~ 6,5
-NH ₂ Lys	-NH ₃ ⁺	-NH ₂	~ 10,0
=NH Arg	=NH ₂ ⁺	=NH	~ 12,0

Οι πρωτεΐνες φέρουν πολλά φορτία αλλά, ανάλογα με το pH, το καθαρό φορτίο τους μπορεί να είναι θετικό ή αρνητικό. Το pH στο οποίο ο ολικός αριθμός θετικών φορτίων μιας πρωτεΐνης είναι ίσος με τον ολικό αριθμό αρνητικών φορτίων (καθαρό φορτίο πρωτεΐνης = 0) ονομάζεται **ισοηλεκτρικό σημείο (pI)**. Σε $pH = pI$, μια πρωτεΐνη έχει την μικρότερη διαλυτότητα γιατί τα μόριά της συσσωματώνονται και καθιζάνουν ευκολότερα.

Παράδειγμα: Στο κανονικό pH του γάλατος (6,3 - 6,6) η καζεΐνη, μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο γάλα, είναι διαλυμένη σε κολλοειδή μορφή. Όταν όμως το pH του γάλατος ελαττωθεί, λόγω ανάπτυξης βακτηριδίων που ελευθερώνουν οξέα, και φτάσει γύρω στο 4,7 που είναι το pI της καζεΐνης, τότε η καζεΐνη θρομβώνεται και το γάλα πηάζει.



Από το διάλυμα (δεξιά), στο ισοηλεκτρικό σημείο και τη κροκίδωση της καζεΐνης (κέντρο) και στην τελική κατακρήμνισή της αν παραμείνει το διάλυμα στο pI.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Βήμα 1

Παρέχονται διαλύματα CH_3COOH ¹ και CH_3COONa **1M**, Na_2HPO_4 **0.2M**, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ **0.1M** καθώς και διάλυμα καζεΐνης **0.25% w/v** και αλβουμίνης **1% w/v**.

Να κάνετε τις αραιώσεις των διαλυμάτων CH_3COOH και CH_3COONa για τη ζητούμενη συγκέντρωση **0.5M**

Βήμα 2

Στους δοκιμαστικούς σωλήνες για κάθε πρωτεΐνη (13 συνολικά) θα δημιουργήσετε διαλύματα τα οποία περιέχουν διαφορετικές ποσότητες των πιο πάνω διαλυμάτων, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί. Τα διαλύματα στους πέντε σωλήνες κάθε πρωτεΐνης έχουν διαφορετικά pH λόγω των διαφορετικών συγκεντρώσεων CH_3COOH , CH_3COONa , Na_2HPO_4 και $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$.

Τα διαλύματα CH_3COOH , CH_3COONa , Na_2HPO_4 και $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ προσθέτονται **πρώτα** και οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται για να δημιουργηθεί το σωστό ρυθμιστικό διάλυμα με το ακριβές pH.

Έπειτα προσθέτονται οι αντίστοιχες ποσότητες κάθε πρωτεΐνης.

(με την σειρά που δίνονται στους πίνακες).

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

- ➔ **1.** Παρατηρήστε μετά την προσθήκη της **αλβουμίνης** στους σωλήνες 1-8 σε **πιο σωλήνα εμφανίζεται πρώτα το ίζημα.**
- ➔ **2.** Προσθέστε στην συνέχεια την **καζεΐνη** στους σωλήνες 9-13 και παρατηρήστε σε **πιο σωλήνα εμφανίζεται πρώτα το ίζημα.**

Διάλυμα/Σωλήνας	1	2	3	4	5	6	7	8
-----------------	---	---	---	---	---	---	---	---

¹ ΠΡΟΣΟΧΗ! Το οξικό οξύ που θα χρησιμοποιήσετε είναι παγόμορφο (glacial), υψηλής πυκνότητας. ΕΡΓΑΣΤΕΙΤΕ ΣΕ ΑΠΑΓΩΓΟ.

Na₂HPO₄ 0,2M	2,0	3,8	4,6	5,2	5,7	6,3	8,2	9,7
C₆H₈O₇ 0,1M	8,0	6,2	5,4	4,8	4,3	3,7	1,8	0,3
Αλβουμίνη 1%	3	3	3	3	3	3	3	3

Διάλυμα/Σωλήνας	9	10	11	12	13
CH₃COOH 0.5M	7,8	7,2	5	1,8	0,8
CH₃COONa 0.5M	0,2	0,8	3	6,2	7,2
Καζείνη 0.25%	2	2	2	2	2

Βήμα 3

3. Υπολογίστε τις νέες συγκεντρώσεις και στη συνέχεια το pH του διαλύματος σε κάθε σωλήνα σύμφωνα με την εξ. Henderson-Hasselbach ($pK_a \text{ CH}_3\text{COOH} = 4.75$).

Συμπληρώστε τις τιμές στους πίνακες.

Σωλήνας	1	2	3	4	5	6	7	8
Συγκέντρωση Na ₂ HPO ₄ σε M								
Συγκέντρωση C ₆ H ₈ O ₇ σε M								
Τιμή pH								

Σωλήνας	9	10	11	12	13
Συγκέντρωση CH ₃ COOH σε M					
Συγκέντρωση CH ₃ COONa σε M					
Τιμή pH					

Βήμα 4

4. Παρατηρείστε τα σωληνάκια και δώστε τα σχόλια σας σχετικά με το ισοηλεκτρικό σημείο των δύο πρωτεϊνών.

Αναφορές

- Löffler G. (2007), *Βασικές Αρχές Βιοχημίας με στοιχεία παθοβιοχημίας.*, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης (σ. 23-24)
- Γεωργάτσος Γ.Ι. (2005) *Εισαγωγή στη Βιοχημεία*, Εκδόσεις Γιαχούδη (σ. 52-55)
- Γεωργάτσος Ι., Κυριακίδης Δ., Γιουσάνη Τ., Χολής-Παπαδοπούλου Θ., Γιαννακούρου Θ., Νικολακάκη Ε., Πανταζάκη Α., Κοτίνη Κ., Καράγιωργα Α., Ασβεστά Σ. (2004), *Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημίας*. Εκδόσεις Ζήτη (σ. 42-44)

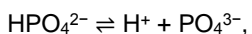
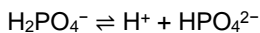
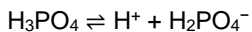
ΑΣΚΗΣΗ 4

ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΡΟΥ ΣΕ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΜΟΛΥΒΔΑΙΝΙΚΟΥ ΑΜΜΩΝΙΟΥ

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα φωσφορικά ιόντα, στην ανόργανη χημεία, είναι τα ανιόντα των αλάτων του φωσφορικού οξέος. Είναι επίσης σημαντικά τόσο στη βιοχημεία όσο και στην βιογεωχημεία. Πρόκειται για ένα πολυατομικό ιόν με εμπειρικό τύπο PO_4^{3-} και μοριακής μάζας 94.97, το οποίο είναι η συζυγής βάση του υδρογονοφωσφορικού (HPO_4^{2-}), το οποίο είναι η συζυγής βάση του διυδρογόνοφωσφορικού ($H_2PO_4^-$), το οποίο και αυτό είναι συζυγής βάση του φωσφορικού οξέος (H_3PO_4).

Σε υδατικά διαλύματα τα φωσφορικά υπάρχουν σε τέσσερις μορφές. Σε ισχυρώς βασικές συνθήκες επικρατούν τα PO_4^{3-} , ενώ σε ασθενής βασικές συνθήκες τα HPO_4^{2-} . Σε ασθενής όξινες συνθήκες τα $H_2PO_4^-$ είναι τα επικρατέστερα ενώ σε ισχυρές όξινες συνθήκες κύρια μορφή είναι η H_3PO_4 . Συγκεκριμένα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας της ακόλουθες αντιδράσεις ισορροπίας:



με αντίστοιχες σταθερές στους 25 °C (σε mol/L):

$$K_{a1} = \frac{[H^+][H_2PO_4^-]}{[H_3PO_4]} \simeq 7.5 \times 10^{-3}, \quad K_{a2} = \frac{[H^+][HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} \simeq 6.2 \times 10^{-8}$$

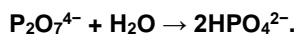
$$K_{a3} = \frac{[H^+][PO_4^{3-}]}{[HPO_4^{2-}]} \simeq 2.14 \times 10^{-13}$$

Σε ουδέτερο pH=7.0 όπως αυτό του κυττοσολίου βρίσκονται οι ακόλουθες αναλογίες:

$$\frac{[H_2PO_4^-]}{[H_3PO_4]} \simeq 7.5 \times 10^4, \quad \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} \simeq 0.62, \quad \frac{[PO_4^{3-}]}{[HPO_4^{2-}]} \simeq 2.14 \times 10^{-6}$$

Που μαρτυρούν ότι μόνο $H_2PO_4^-$ and HPO_4^{2-} ιόντα βρίσκονται σε σημαντικά ποσοστά (62% $H_2PO_4^-$, 38% HPO_4^{2-}). Στο εξωκυττάριο υγρό (pH=7.4) αυτή η αναλογία αλλάζει-αντιστρέφεται (61% HPO_4^{2-} , 39% $H_2PO_4^-$).

Σε βιολογικά συστήματα, ο φώσφορος απαντάται ως *ελεύθερα φωσφορικά ιόντα* σε διάλυμα και καλείται *ανόργανος φώσφορος*, για να διακρίνεται από τα φωσφορικά τα δεσμευμένα στους ποικίλους φωσφορικούς εστέρες. Τα ανόργανα φωσφορικά γενικώς συμβολίζονται με Pi και μπορεί να προέρχονται από την υδρόλυση των πυροφωσφορικών, τα οποία συμβολίζονται ως PPI:



Επιπλέον, τα φωσφορικά πιο συχνά απαντώνται με τη μορφή των φωσφορικών αδενοσίνης (AMP, ADP και ATP), των DNA και RNA από τα οποία παράγονται με υδρόλυση. Πρόκειται για σημαντικότερα από τα ανιόντα αφού σχετίζονται με τα ιόντα Ca^{++} *in vivo*, η δε γνώση των συγκεντρώσεων τους στο πλάσμα είναι απαραίτητη για την ερμηνεία των διαταραχών του ασβεστίου.

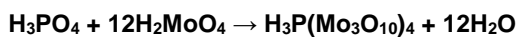
Ο φώσφορος προσλαμβάνεται με την τροφή υπό μορφή φωσφορικών αλάτων, απορροφάται, όπως και το ασβέστιο, από το λεπτό έντερο και εισάγεται στην κυκλοφορία του αίματος. Σχετίζεται, έτσι, έμμεσα με την πυκνότητα των οστών και την σημαντική ασθένεια της *οστεοπόρωσης* κυρίως στην μετά την εμμηνόπαυση περίοδο. Η αποβολή του γίνεται από τους νεφρούς, ενώ παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση των διπτανθρακικών.

Αρχή μεθόδου

Τα φωσφορικά εύκολα αντιδρούν με μολυβδαινικά ιόντα σε ασθενές όξινο περιβάλλον, παρουσία κατάλληλου αναγωγικού παράγοντα, προς σχηματισμό ενός έγχρωμου μπλε συμπλόκου, η ένταση του οποίου ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση των φωσφορικών στο διάλυμα.

Παρόλο που η μπλε ετεροπολική ένωση δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως, εμφανίζει μοριακή σύνθεση παρόμοια με αυτή του μη-ανοιγμένου αντιδρώντος, διαφέροντας μόνο στο ότι κάποια άτομα μολυβδαινίου είναι στην +5 παρά στην +6 οξειδωτική κατάσταση. Η αναγωγή του σχηματιζόμενου φωσφορομολυβδαινικού οξέος προκαλείται από το χλωριούχο κασσίτερο, οπότε σχηματίζεται το μπλε του φωσφομολυβδαινίου (phosphomolybdenum blue (PMB)).

Η απορρόφηση μετρείται στα 660nm.



Απαιτούμενα όργανα και υλικά

ΟΡΓΑΝΑ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΥΛΙΚΑ
8 Δοκιμαστικοί Σωλήνες	Διάλυμα Μολυβδαινικού Αμμωνίου ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (7.0 ml)
Στήριγμα Δοκιμαστικών Σωλήνων	Διάλυμα SnCl_2 (1.5 ml)
1 πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνες φυγοκέντρησης	Πρότυπο διάλυμα φωσφόρου (P) συγκέντρωσης 40 ppm P (170 ml)
Φωτόμετρο	Διάλυμα τριχλώρο-οξικού 50% w/v (1ml)
1 κυψελίδα	Ορό ζώου (0.2ml)
Σιφόνια 1,2,5,10 ml	
1-2 ογκομετρικούς κυλίνδρους 25 και 50ml	
φυγόκεντρος	

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πριν την παρασκευή οποιουδήποτε διαλύματος πλύνετε όλα τα γυάλινα σκεύη που θα χρησιμοποιήσετε με διάλυμα 0.1M HCl και ξεπλύνετε μόνο με άφθονο νερό.
(Τα απορρυπαντικά περιέχουν φωσφορικά τα οποία όταν χρησιμοποιούνται αφήνουν ένα λεπτό στρώμα στην επιφάνεια του γυαλιού και θετικό σφάλμα κατά τον προσδιορισμό.)

Προετοιμασία αγνώστου δείγματος

Σε 0.2 ml ορού προσθέτουμε, 0.8 ml H₂O και 1 ml 50% CCl₃COOH (τριχλωροοξικό οξύ) για να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες και φυγοκεντρούμε για 4 min σε 5000 στροφές ανά λεπτό. Λαμβάνουμε από το υπερκείμενο υγρό, την απαραίτητη ποσότητα για τον προσδιορισμό του αγνώστου προσεχτικά χωρίς να ανακατέψουμε το ίζημα.

Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων

Σας δίνεται Πρότυπο διάλυμα P από το οποίο λαμβάνετε 2ml και συμπληρώνετε με 48ml ddH₂O (40 ppm φωσφόρου σε 50ml ddH₂O) και (με διαδοχικές αραιώσεις) από αυτό παρασκευάζετε επιπλέον τα πρότυπα 30ppm σε 20ml. Από το 30ppm παρασκευάζετε τα 20ppm σε 15ml. Από το 20ppm παρασκευάζετε τα 10ppm σε 10ml. Από το 10ppm παρασκευάζετε τα 5ppm P σε 10ml και σε όλα συμπλήρωση με ddH₂O. Εάν έχετε περισσότερους ογκομετρικούς κυλίνδρους των 25 και 50 ml συμπληρώστε με τους ανάλογους όγκους ή μοιραστείτε τα πρότυπα διαλύματα με την πλησιέστερη ομάδα.

Προσθέστε τα αντιδραστήρια για την ανάπτυξη του χρώματος όπως παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα με τη σειρά που φαίνονται. Όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από το δείγμα (το αντίστοιχο κάθε φορά όπως φαίνεται στον πίνακα) σας δίνονται έτοιμα.

ml	Τυφλό	5 ppm	10 ppm	20 ppm	30 ppm	40 ppm	Άγνωστο
----	-------	-------	--------	--------	--------	--------	---------

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1	1	1	1	1	1	1
Δείγμα (του σωλήνα της αντίστοιχης αραίωσης και το άγνωστο στον τελευταίο σωλήνα)	0	1	1	1	1	1	1
SnCl_2 (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Νερό	5.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
<i>Total volume (ml)</i>	7	7	7	7	7	7	7

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

1. Φωτομετρήστε στα 660nm, μετά την παρέλευση 15-20 min για πλήρη ανάπτυξη του χρώματος, έναντι τυφλού όπως προκύπτει από τα ανωτέρω.
2. Προσδιορίστε την συγκέντρωση του φωσφόρου στον ορό αίματος (άγνωστο δείγμα) σε C_P (ppm) βάση της πρότυπης καμπύλης.

Φυσιολογικά όρια

Φυσιολογικά όρια στα ζώα είναι: 25-80 mg/L (ppm) ή 2,5-8 mg/dl

Αναφορές

- Fiske, CH. and Subbarow, Y. (1925) *The colorimetric determination of phosphorus*. J. Biol. Chem., 66:375-400.
- Γεωργάτσος ΙΓ. (1982) *Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοχημείας*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων.

ΑΣΚΗΣΗ 5

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ TLC

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι πρωτεΐνες παίζουν καθοριστικούς ρόλους σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες και είναι κυρίως υπεύθυνες για τον φαινότυπο των διαφόρων ειδών. Ο ανθρώπινος οργανισμός εκφράζει πάνω από 30.000 διαφορετικές πρωτεΐνες, που είναι πολυμερή των ίδιων 20 L-αμινοξέων σε διαφορετικούς συνδυασμούς.

Στις πρωτεΐνες τα αμινοξέα συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς, που σχηματίζονται ανάμεσα στην α-αμινομάδα και στην α-καρβοξυλομάδα διαδοχικών αμινοξέων. Τα χαρακτηριστικά των διαφόρων πρωτεϊνών εξαρτώνται από την πρωτοταγή δομή (αλληλουχία αμινοξέων) και τη διαμόρφωση (τρισιδιάστατη διάταξη) των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που τις αποτελούν και που καθορίζονται από την γενετική πληροφορία του οργανισμού.

Τα αμινοξέα κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, που σε μεγάλο βαθμό καθορίζονται από τις πλευρικές τους αλυσίδες (υδρόφοβα, υδρόφιλα, φορτισμένα, αφόρτιστα κλπ) και βάσει των οποίων είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους. Οι πρωτεΐνες επίσης κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον βιολογικό ρόλο που επιτελούν (π.χ. ένζυμα, δομικές, μεταφορικές, αποθηκευτικές, αμυντικές, ρυθμιστικές πρωτεΐνες), το σχήμα τους (π.χ. ινώδεις, σφαιρικές), την προσθετική ομάδα που τυχόν περιέχουν (π.χ. λιπο-, γλυκο-, νουκλεο-, φωσφο-, μεταλλο- πρωτεΐνες) και άλλα κριτήρια. Οι πρωτεΐνες επίσης διαφέρουν στο μέγεθος (Μοριακό Βάρος) και στο ισοηλεκτρικό σημείο (pI), ανάλογα με τον αριθμό και το είδος των αμινοξέων που περιέχουν.

Οι μέθοδοι απομόνωσης, διαχωρισμού, ταυτοποίησης και μελέτης των αμινοξέων και των πρωτεϊνών είναι παρόμοιες και έχουν πολύ μεγάλη σημασία στην Βιοχημεία και στην κλινική πράξη. (Βλέπε L. Stryer, κεφάλαια 3 και 4).

Σκοπός της σημερινής άσκησης είναι να δούμε:

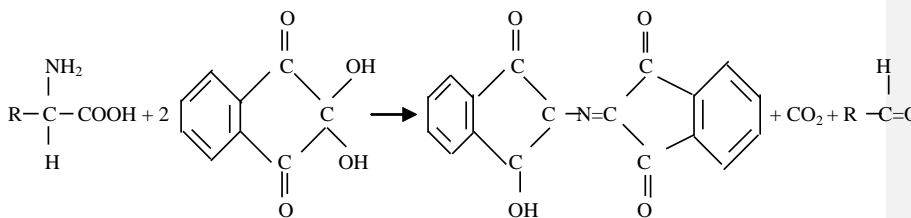
- I) την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό αμινοξέων με την χρωστική δοκιμή της νινυδρίνης
 II) τον διαχωρισμό αμινοξέων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Διάφορες χρωστικές αντιδράσεις χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ελεύθερων αμινοξέων ή αυτών που βρίσκονται συνδεδεμένα στις πρωτεΐνες. Αυτές οι αντιδράσεις είναι γενικές ή ειδικές. Γενική αντίδραση είναι η αντίδραση νινυδρίνης (βλέπε παρακάτω) την οποία είναι δυνατόν να δώσουν σχεδόν όλα τα ελεύθερα αμινοξέα γιατί για την αντίδραση αυτή είναι σημαντική η γενική χημική δομή των αμινοξέων. Οι ειδικές αντιδράσεις αντίθετα γίνονται στην πλάγια αλυσίδα αμινοξέων (R ομάδα) επομένως την δίνουν τόσο τα ελεύθερα όσο και τα συνδεδεμένα στις πρωτεΐνες αντίστοιχα αμινοξέα. Παραδείγματα είναι α. η αντίδραση Sakaguchi στην οποία δίνουν θετική αντίδραση η αργινίνη και όλες οι πρωτεΐνες που περιέχουν αργινίνη β., η αντίδραση με νιτροπρωσσικό νάτριο που δίνουν η κυστεΐνη και οι πρωτεΐνες που περιέχουν ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες γ. η αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης που δίνουν τα αμινοξέα που περιέχουν ένα αρωματικό δακτύλιο όταν θερμαίνονται με πυκνό νιτρικό οξύ.

Αντίδραση Νινυδρίνης. Όλα τα ελεύθερα α-αμινοξέα αντιδρούν με νινυδρίνη και δίνουν CO₂, μία αλδεΐδη που περιέχει ένα άτομο άνθρακα λιγότερο από το αμινοξύ και μια κυανοϊώδη χρωστική.



Νινυδρίνη

Η αντίδραση αυτή είναι γενική και δίνεται σε pH 5-7 από όλα τα α-αμινοξέα που έχουν ελεύθερη αμινομάδα. Η αντίδραση είναι επίσης θετική και για τις πρωτοταγείς

αμίνες και την αμμωνία, αλλά χωρίς την παραγωγή CO₂. Τα αμινοξέα προλίνη και υδροξυπρολίνη αντιδρούν με την νινυδρίνη αλλά δίνουν ένα παράγωγο που έχει κίτρινο χρώμα. Η αντίδραση νινυδρίνης είναι πολύ ευαίσθητη και ιδανική για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αμινοξέων που βρίσκονται ελεύθερα στο αίμα και στα ούρα ή που προέρχονται από υδρόλυση πρωτεϊνών και διαχωρισμό με χρωματογραφικές μεθόδους. Με την αντίδραση νινυδρίνης ανιχνεύεται έως 1μg αμινοξέος, αλλά ο προσδιορισμός ng ποσοτήτων είναι δυνατός με την αντίδραση της φθορεσκαμίνης που δημιουργεί ένα φθορίζον προϊόν.

Προσθήκη μικρής ποσότητας 2,4,6 πυριδίνης στο αντιδραστήριο νινυδρίνης επιτρέπει το σχηματισμό μεγαλύτερης ποικιλίας χρωμάτων με τα αμινοξέα και έτσι επιτυγχάνεται καλύτερος ποιοτικός προσδιορισμός τους.

Στην σημερινή άσκηση θα τρέξετε πέντε πρότυπα διαλύματα αμινοξέων και ενός αγνώστου σε πλάκα TLC και θα κάνετε ποιοτικό προσδιορισμό της σύνθεσης του αγνώστου διαλύματος από τα πρότυπα.

II. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Διαχωρισμός αμινοξέων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography – TLC) και ταυτοποίηση τους μέσω της τιμής R_f

Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας η *στατική φάση* είναι ένα προσροφητικό όπως ξηροπηκτική του διοξειδίου του πυριτίου, το οξείδιο του αργιλίου ή η γη των διατόμων, που εφαρμόζεται σε λεπτή στρώση πάνω σε γυάλινη πλάκα ή ένα φύλλο αλουμινίου (σαν στατική φάση λειτουργεί και το νερό που ενυδατώνει σε μεγάλο βαθμό τα υλικά αυτά). Μετά την εναπόθεση των δειγμάτων (π.χ. μίγμα αμινοξέων), η πλάκα χρωματογραφίας τοποθετείται σε δοχείο (θάλαμος ανάπτυξης), το οποίο περιέχει ποσότητα μίγματος οργανικών διαλυτών (*κινητή φάση*) και το επίπεδο του οποίου βρίσκεται κάτω από το σημείο εφαρμογής του προς διαχωρισμό μίγματος των ουσιών.

Το δοχείο κλείνει ερμητικά ώστε ο θάλαμος να κορεστεί με τους ατμούς της κινητής φάσης. Ο διαλύτης ανέρχεται με τριχοειδή δράση και συμπαρασύρει τις εναποθεθείσες ουσίες. Η ταχύτητα κίνησης της κάθε ουσίας εξαρτάται από την συγγένεια της προς τις δυο φάσεις. Δηλαδή, μια ουσία υδρόφιλη κινείται σχετικά αργά (διότι αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την πολική-υδρόφιλη στατική φάση) ενώ

μια ουσία υδρόφοβη κινείται σχετικά γρήγορα (διότι αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την οργανική-υδρόφοβη κινητή φάση).

Η χρωματογραφία σταματά όταν το μέτωπο του διαλύτη φθάσει κοντά στο πάνω άκρο της πλάκας. Μετά από κατάλληλη επεξεργασία ανιχνεύουμε τη θέση των ουσιών επάνω στην πλάκα και προσδιορίζεται η τιμή του R_f που είναι χαρακτηριστική παράμετρος για κάθε ουσία κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες διαχωρισμού.

$R_f = (\text{απόσταση της ουσίας από την αρχή})/(\text{απόσταση μετώπου διαλύτη από την αρχή})$.

Η ταυτοποίηση των αμινοξέων γίνεται με την βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων αμινοξέων που χρωματογραφούνται ταυτόχρονα με το δείγμα. Η ανίχνευση των αμινοξέων γίνεται με το αντιδραστήριο νινυδρίνης, 2,4,6 πυριδίνης.

Αντιδραστήρια

- Διαλύματα αμινοξέων (1-2ml): Γλυκίνης, Μεθειονίνης, Αργινίνης Τυροσίνης και Γλουταμινικού οξέος (0,15 mg/ml)* και άγνωστο μείγμα αμινοξέων. *Δίνονται έτοιμα*
- Διάλυμα προπανάλης (20ml/ ομάδα): νερού (7:3) (κινητή φάση). *Δίνεται έτοιμο*
- Διάλυμα νινυδρίνης (~10ml συνολικά κοινό για όλες τις ομάδες): 2% w/v νινυδρίνη και 1% w/v 2,4,6 πυριδίνη σε αλκοόλη. *Δίνεται έτοιμο*

Υλικά-Σκεύη

- Πλάκες χρωματογραφίας (Silica gel 60), ποτήρι ζέσεως για ανάπτυξη,
- τριχοειδείς σωλήνες,
- θερμαντικός θάλαμος.

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τοποθετούμε την κινητή φάση μέσα στο γυάλινο δοχείο χρωματογραφίας. Τοποθετούμε διηθητικό χαρτί διαμέτρου ίση με το τοίχωμα του ποτηριού μέσα στο ποτήρι. Το διηθητικό χαρτί πρέπει να καλύπτει όλη την εσωτερική επιφάνεια του ποτηριού από κάτω έως τα χείλη αφήνοντας ένα άνοιγμα κατά μήκος ώστε να μπορούμε να βλέπουμε στο εσωτερικό του ποτηριού. Για την εφαρμογή των

διαλυμάτων συνήθως χρησιμοποιούμε τριχοειδείς σωλήνες. Η εφαρμογή γίνεται με μεγάλη προσοχή και σε δόσεις (προσθέτουμε 5 σταγόνες συνολικά από το κάθε δείγμα στο ίδιο σημείο) ξηραίνοντας ενδιάμεσα, φυσώντας στο μεταξύ των δόσεων το σημείο εφαρμογής (η διάμετρος της κηλίδας του υγρού πρέπει να παραμένει μικρή και το στρώμα του υλικού δεν πρέπει να διαταραχθεί).

Στη συνέχεια, με μεγάλη προσοχή, τοποθετούμε την πλάκα λεπτής στιβάδας μέσα στο ποτήρι κατά τέτοιο τρόπο,

- ***ώστε η σειρά των κηλίδων να είναι παράλληλη προς την επιφάνεια του υγρού, και οπωσδήποτε πάνω από αυτήν***
- ***να μπορούμε να παρακολουθούμε την πορεία της κινητής φάσης (διαλύτης) κοιτώντας από τα πλάγια του ποτηριού***

Όταν το μέτωπο του διαλύτη φθάσει τα 2-3 εκ. περίπου (~20 λεπτά) από το τέλος της πλάκας σταματά η χρωματογράφηση. Σημειώνουμε προσεκτικά με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη και μεταφέρουμε την πλάκα στον θερμαντικό θάλαμο.

Για να αναγνωριστούν τα σημεία στα οποία βρίσκονται τα αμινοξέα, η πλάκα εμβαπτίζεται στιγμιαία σε διάλυμα νινυδρίνης και τοποθετείται ξανά στον θερμαντικό θάλαμο στους 60 °C μέχρι να εμφανιστούν οι σκουρόχρωμες κηλίδες των αμινοξέων (1 έως 5 λεπτά). Μετά την εμφάνιση των κηλίδων σημειώνουμε με το μολύβι το κέντρο των κηλίδων και υπολογίζουμε τις αποστάσεις μετακίνησης από την αρχή.

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΜΕ TLC

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

1. Επισυνάψτε την TLC ή φωτοτυπία της. Σημειώστε με βέλη την θέση κάθε αμινοξέος και υπολογίστε τις τιμές Rf στα πρότυπα διαλύματα και στο μίγμα. Βρείτε την σύσταση του μίγματος.

TLC:

Rf Γλυκίνη (Gly, G):

Rf Μεθειονίνης (Met, M):

Rf Αργινίνη (Arg, R):

Rf Τυροσίνη (Tyr, Y):

Rf Γλουταμινικού οξέος (Glu, E):

Σύσταση μίγματος (Άγνωστο διάλυμα αμινοξέων):

2. Γράψτε τις χημικές δομές τριών εκ των αμινοξέων που χρησιμοποιήσατε και βάσει αυτών δικαιολογήστε τις διαφορές στις τιμές Rf.

Γλυκίνη:

Μεθειονίνη:

Τυροσίνη :

3. Δικαιολόγηση τιμής Rf:

Αναφορές

- Γιαννακούρου Θ., Νικολακάκη Ε., Πανταζάκη Α., Κοτίνη Κ., Καράγιωργα Α., Ασβεστά Σ. (2004), *Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας*. Εκδόσεις Ζήτη (σ. 20-21)
- <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/thinlayer.html>
- http://tera.chem.ut.ee/~koit/arstpr/ah_en.pdf
- http://www.reachdevices.com/TLC_aminoacids.html

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

ΑΣΚΗΣΗ 6

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

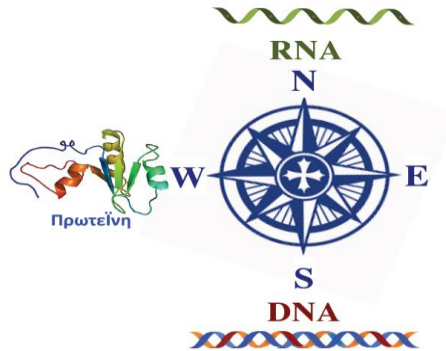
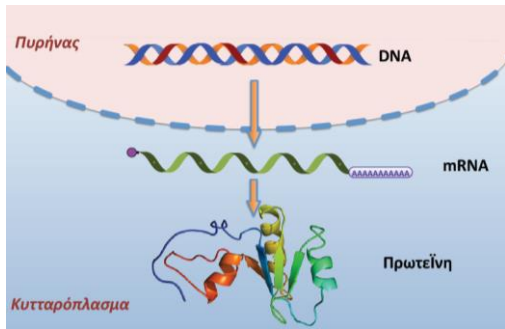
Η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει όλες τις διεργασίες κατά τις οποίες φορτισμένα μόρια κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία. Κάθε πρωτεΐνη έχει ένα χαρακτηριστικό pI ισοηλεκτρικό σημείο. Σε συγκεκριμένο pH λοιπόν θα είναι θετικά (θετικά φορτία > αρνητικά φορτία), αρνητικά φορτισμένη (αρνητικά φορτία > θετικά φορτία), και εάν το $pH=pI$ τότε τα θετικά φορτία =αρνητικά φορτία. Η αρχή της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες λόγω των φορτίων που έχουν μεταναστεύουν προς έναν από τους πόλους όταν τοποθετηθούν σε ηλεκτρικό πεδίο.

Οι καλύτερες εφαρμογές της ηλεκτροφόρησης στην Βιοχημεία χρησιμοποιούν κάποια μορφή της ηλεκτροφορησης σε ζώνη κατά την οποία το υδάτινο διάλυμα φέρεται σε ένα στέρεο ή ένα υπόβαθρο και τα δείγματα εναποτίθενται υπό τη μορφή ζωνών ή κηλίδων.

Όλοι οι τύποι ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούν μια βασική ομάδα αρχών όπως εκφράζεται από την εξίσωση.

$$\text{Κινητικότητα μορίου} = \frac{\left(\text{Εφαρμοζόμενη τάση} \right) \left(\text{καθαρό φορτίο μορίου} \right)}{\text{τριβή μορίου}}$$

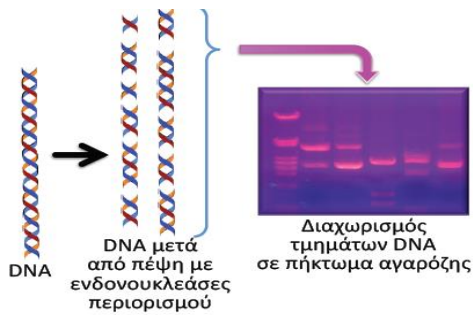
Έτσι η κινητικότητα αυξάνεται με την εφαρμοζόμενη τάση ή το φορτίο και μειώνεται με την τριβή λόγω του σχήματος, του μεγέθους και του μέσου μέσα στο οποίο κινείται το σωματίδιο.



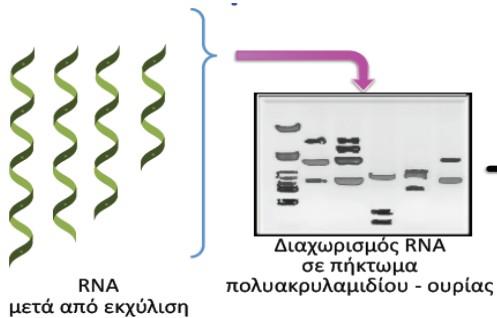
Οι βασικές μέθοδοι ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών, αποτελούν:

- Την Ανάλυση κατά Southern (S), όπου και γίνεται η ανάλυση του DNA
- Την Ανάλυση κατά Northern (N), όπου και γίνεται η ανάλυση του RNA
- Την ανάλυση κατά Western (W), όπου και γίνεται η ανάλυση των πρωτεϊνών

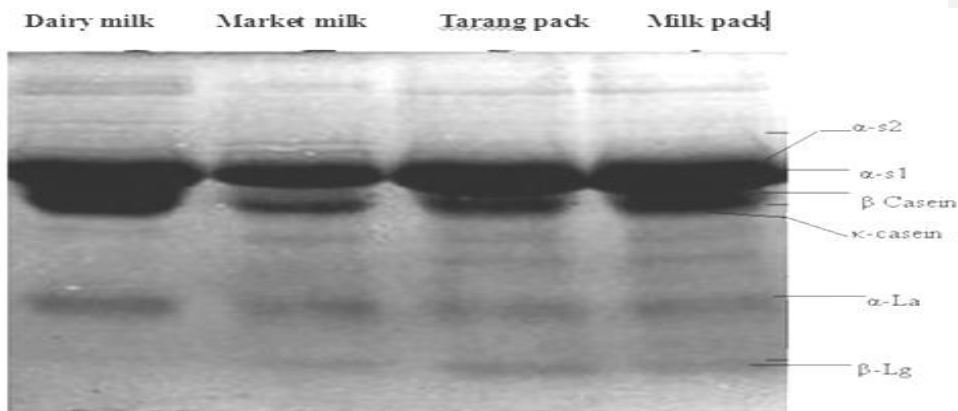
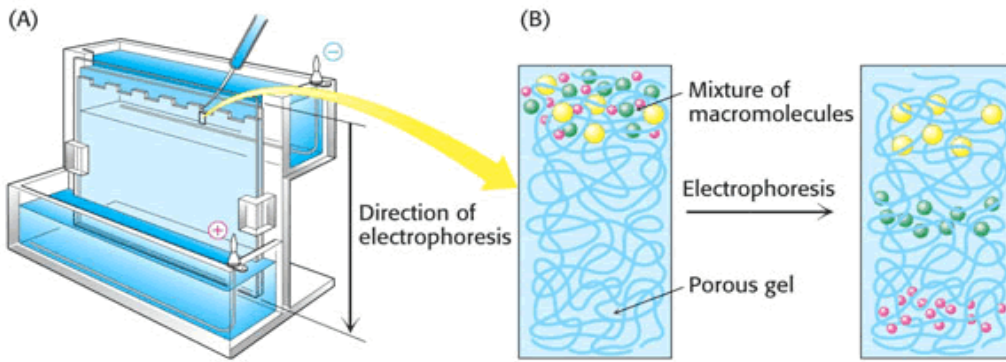
1. Ανάλυση κατά Southern: DNA (πήκτωμα αγαρόζης)



2. Ανάλυση κατά Northern: RNA (πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου)



3. Ανάλυση κατά Western: Πρωτεΐνες



Παράδειγμα διαχωρισμού πρωτεϊνών με SDS PAGE (Different milk samples)
(Milk Protein Behavior at High Temperature, Published on: 05/10/2011 Author/s : Ihsan Ullah et al.)

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΟΡΟΥ

ΠΕΙΡΑΜΑ 1^ο - ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ηλεκτροφόρηση πηκτής. Σε αυτή τη μέθοδο τα μόρια διαχωρίζονται σε υδατικά διαλύματα (ρυθμιστικά) μέσα σε μια μήτρα πηκτής (gel). Ο χαρακτήρας της πηκτής μπορεί να επιλεγεί ανάλογα με τις ανάγκες μας. Αυτό είναι σημαντικό γιατί στις πηκτές αναπτύσσονται τριβές που ορίζουν και την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού. Όταν τα μόρια που θέλουμε να ταυτοποιήσουμε και να διαχωρίσουμε είναι μεγάλου μοριακού βάρους μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε πηκτές χαμηλής συγκέντρωσης (χαμηλός βαθμός διασταυρώσεις) και έτσι τα μόρια να κινηθούν γρηγορότερα και με λιγότερη έκλυση θερμότητας κατά την διάρκεια του διαχωρισμού.

Στο σημερινό πείραμα θα χρησιμοποιηθεί πηκτή αγαρόζης (ένα πολυμερές πολυγαλακτόζης που είναι πιο κατάλληλο για τον διαχωρισμό μεγάλων μακρομορίων όπως νουκλεϊκά οξέα, λιποπρωτεΐνες κ.α. Θα χρησιμοποιήσετε τις συσκευές ηλεκτροφόρησης Beckman-Paragon και τις έτοιμες πηκτές αγαρόζης, με δείγματα ορού που θα σας δοθούν.

Υλικά

- Ορός αίματος ζώου
- Πηκτή αγαρόζης
- Ρυθμιστικό διάλυμα Βαρβιτάλης Β-2
- Μπλε χρωστική
- Στυπόχαρτα προτύπων
- Στυπόχαρτα Πηκτής

Τεχνική ηλεκτροφόρησης Αγαρόζης

- 1) Βγάλτε την πηκτή από το περικάλυμμα της και πατήστε την ελαφρά με διηθητικό χαρτί (gel blotter).
- 2) Ευθυγραμμίστε προσεκτικά την μήτρα (sample template) **με τα σημεία** → της πηκτής και πατήστε ελαφρά.

- 3) Τοποθετούμε προσεκτικά ~5μl από κάθε δείγμα όρου σε κάθε εγκοπή χρησιμοποιώντας κάθε φορά διαφορετική μύτη για την μικροπιπέτα για τα διάφορα δείγματα. **Αφήνουμε ~ 5 min για να απορροφηθούν.**
- 4) Πατήστε ελαφρά με διηθητικό χαρτί και μετά αφαιρέστε και το χαρτί και την μήτρα.
- 5) Βάλτε 45ml ρυθμιστικού διαλύματος pH=8,6 σε κάθε διαμέρισμα του μπάνιου ηλεκτροφόρησης και τοποθετείστε την πηκτική πάνω στην γέφυρα (**προσέχοντας ώστε το + άκρο της πηκτής να βρίσκεται στο + άκρο του μπάνιου**).
- 6) Ηλεκτροφορήστε στα 120 Volt για 40 min.
- 7) Αφαιρέστε την πηκτική από το μπάνιο και βάλτε την στο πλαίσιο πηκτής (gel frame).
- 8) Τοποθετείστε την πηκτική στο μονιμοποιητικό διάλυμα 1 (**1 Fix** 30% μεθανόλη - 20% οξικό) για 3 min (ανακατεύοντας κάθε 1 λεπτό).
- 9) Στεγνώστε την πηκτική εντελώς στον στεγνωτήρα στους 80°C για ~ 20 min.
- 10) Τοποθετείστε την πηκτική στην μπλε χρωστική (**2 Stain**) για 3 min (ανακατεύοντας κάθε 1 λεπτό).
- 11) Βγάζουμε τη πηκτική από το δοχείο της χρωστικής και στραγγίζουμε όλη την περίσσεια χρωστικής στο δοχείο και σε απορροφητικό χαρτί.
- 12) Τοποθετείστε την πηκτική με την σειρά στα εξής διαλύματα:
διάλυμα 3 (5% οξικό) για 2 min, ανακατεύοντας σε τακτά χρονικά διαστήματα,
διάλυμα 4 (μεθανόλη - οξικό) για 2 min, ανακατεύοντας σε τακτά διαστήματα
διάλυμα 5 (5% οξικό) για 2 min, ανακατεύοντας σε τακτά χρονικά διαστήματα
- 13) Στεγνώστε την πηκτική (που τώρα θα πρέπει να έχει εμφανίζει μπλε ζώνες σε ένα διαυγές υπόστρωμα) στους 80°C για ~10 min.

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

1. Ερμηνεύστε τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό του άγνωστου δείγματος που πήρατε σύμφωνα με τα πρότυπα δείγματα ορού ζώων
2. Επισυνάψτε το ηλεκτροφόρημα που πήρατε ή μια φωτοτυπία

ΠΕΙΡΑΜΑ 2° - ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης που βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία, προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια όπως DNA και RNA. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f).

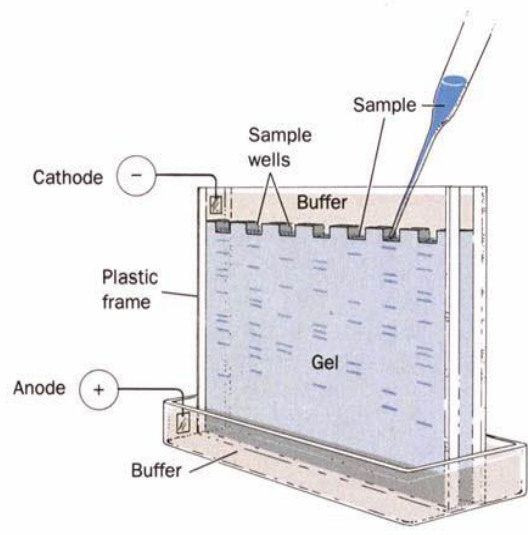
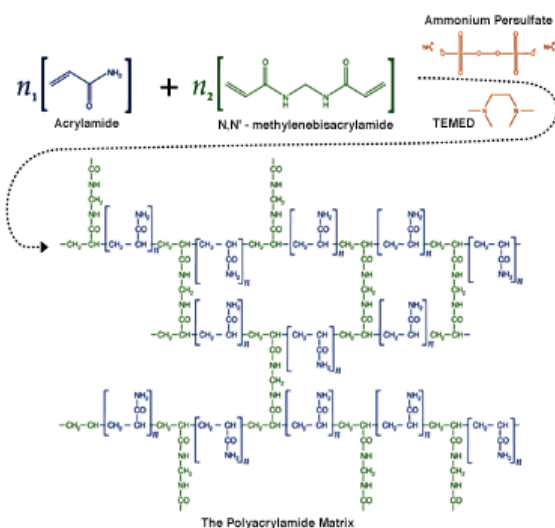
$$u = E \cdot z / f$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη $E \cdot z$ που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου μετακίνησης. Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε **πήκτωμα** και όχι σε διάλυμα, επειδή το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων κι επιπλέον καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για σωστό διαχωρισμό μορίων. Το πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (**MBA**) (**Εικ. 1, αριστερά**). Τα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι τα καταλληλότερα για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες.

Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των **μονομερών ακρυλαμιδίου** και **MBA**, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο **πολυμεριστικών**

παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, **APS**) και του **TEMED** (N,N,N,Ν-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το **APS**. Έτσι σχηματίζεται ένα πλέγμα, με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου (%**T**) και MBA (%**C**, crosslinker) και, αφετέρου, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση του MBA ως προς του ακρυλαμιδίου. Γενικά πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.



Αριστερά: Σχηματισμός πηκτώματος ακρυλαμιδίου.

Δεξιά: πηκτώμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης. Διακρίνεται ο τρόπος «φόρτωσης» των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής καθώς και η συνδεσμολογία της συσκευής.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο (ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης), στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων.

Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε **αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)** οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται

κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (**SDS**), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Προστίθεται επίσης **μερκαπτοαιθανόλη** ή **διθειοθρεϊτόλη**, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με **θέρμανση**.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης (**Εικ. 1, δεξιά**). Η απόσταση μετακίνησης των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες σε ομοιογενή πηκτώματα (**Rf**) είναι αντιστρόφως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους. Αυτή η εμπειρική σχέση δεν ακολουθείται σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. σε πρωτεΐνες πλούσιες σε υδατάνθρακες. Το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται πλέον αμελητέο καθώς το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο σε μία ευρεία κλίμακα pH. Έτσι, τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση **από την κάθοδο προς την άνοδο** (**Εικ. 1, δεξιά**). Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής (που κρίνεται από το μέτωπο του διαλύτη) οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα εμφανίζονται με χρώση **κυανού του Coomassie**, χρώση αργύρου, ή χρώση ειδική για τα σιαλικά οξέα των γλυκοφορινών. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευτούν με ραδιενεργή σήμανση και εμφάνισή τους σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Το «καλούπι» στο οποίο σχηματίζεται το πήκτωμα μπορεί να είναι είτε μικροί κυλινδρικοί σωλήνες είτε ένα sandwich επίπεδων τζαμιών (ηλεκτροφόρηση σε σωληνάκια ή επίπεδη, **Εικ. 1**). Η ηλεκτροφόρηση σε σωληνάκια χρησιμοποιείται κυρίως για ισοηλεκτρική εστίαση που προηγείται του αποδιατακτικού διαχωρισμού στις δυσδιάστατες ηλεκτροφορήσεις. Το φόρτωμα των δειγμάτων γίνεται είτε στην επιφάνεια των σωληνών, είτε σε κατάλληλες θέσεις υποδοχής (slots) που δημιουργούνται σε πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης με την τοποθέτηση ειδικής «χτένας» (**Εικ. 1**), όσο το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό. Η επίπεδη ηλεκτροφόρηση

έχει το πλεονέκτημα ότι όλα τα δείγματα διαχωρίζονται στο ίδιο πήκτωμα, συνεπώς στις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου θερμοκρασίας κλπ κι έτσι είναι περισσότερο αξιόπιστη η ποιοτική και ποσοτική σύγκριση των ζωνών μεταξύ τους. Σε περιπτώσεις ανάλυσης σύνθετων πρωτεϊνικών δειγμάτων που χαρακτηρίζονται από μεγάλες διαφορές στα μοριακά τους βάρη, ή σε περιπτώσεις άγνωστων δειγμάτων, επιλέγεται ο διαχωρισμός σε πήκτωμα **γραμμικής ή εκθετικής κλίσης συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου**. Τέτοια πηκτώματα παρασκευάζονται με τη βοήθεια του κατασκευαστή κλίσης (gradient maker). Για γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου τοποθετούνται ίσοι όγκοι πυκνού και αραιού διαλύματος σε δύο ανεξάρτητους χώρους της συσκευής και με τη σταδιακή τους ανάμειξη προκύπτει το πήκτωμα κλίσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ηλεκτροφόρηση είναι **ασυνεχής** (discontinuous) επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (**stacking gel**) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα **πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel)** το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα πακεταρίσματος. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού του Laemmli, (1970) το πήκτωμα πακεταρίσματος δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά μάλλον τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (**running buffer**) τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης (γιατί χρειάζεται πολικότητα) με τη βοήθεια τροφοδοτικού, αντισταθμίζοντας τις αλλαγές που προκαλούνται από το γεγονός ότι η αντίσταση που προβάλλει το υλικό μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση, μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου, κυρίως λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με SDS είναι γρήγορη, ευαίσθητη και έχει μεγάλη διαχωριστική (αναλυτική) ικανότητα. Οι απαιτούμενες ποσότητες των πρωτεϊνών είναι μικρές: περίπου 0,1 μg για χρώση με Coomassie και ακόμη λιγότερο (0,02 μg) όταν χρησιμοποιείται χρώση αργύρου. Πρωτεΐνες που διαφέρουν στη μάζα τους κατά 2 % (π.χ. 40 και 41 kd, διαφορά 10 αμινοξέων) μπορούν εύκολα να διαχωριστούν σε κατάλληλο ηλεκτροφορητικό σύστημα. Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών

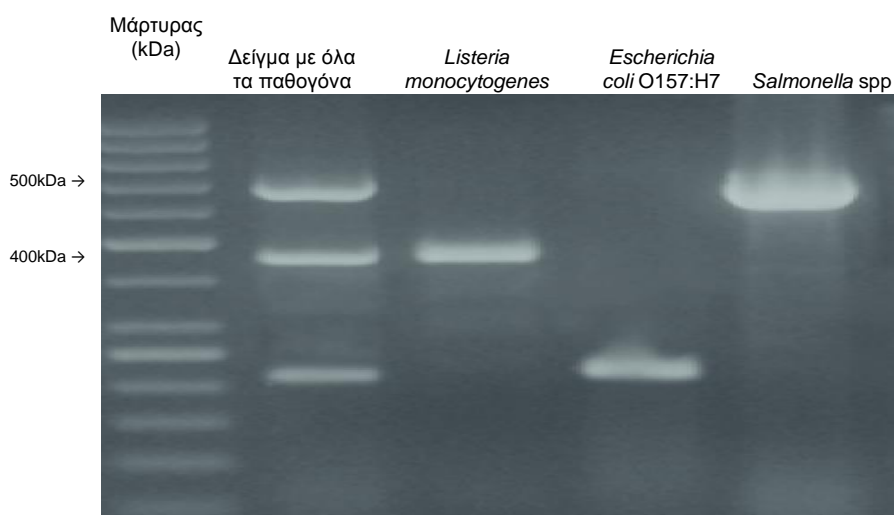
σε σύστημα SDS-PAGE χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του MB και της σχετικής ποσότητας (αφθονία) πρωτεϊνικών μορίων σε ένα δείγμα, αλλά και για τον καθορισμό της κατανομής πρωτεϊνών σε διάφορα βιοχημικά εκχυλίσματα ιστών και κυττάρων. Είναι επίσης απαραίτητο βήμα για άλλες τεχνικές όπως το ανοσοαποτύπωμα Western και η δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση.

Χρώση με χρωστική Coomassie Brilliant Blue (CBB)

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αντίδραση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0,1% w/v χρωστικής σε 45% v/v μεθανόλη και 10% v/v οξικό οξύ. Το διάλυμα αυτό εκτός από διάλυμα χρώσης, είναι και διάλυμα στερέωσης. Η χρώση γίνεται με εμβάπτιση της πηκτής στο παραπάνω διάλυμα για διάστημα από 0,5 έως 16 ώρες και ακολουθεί αποχρωματισμός με διάλυμα 10% v/v μεθανόλης και 10% v/v οξικού οξέος.

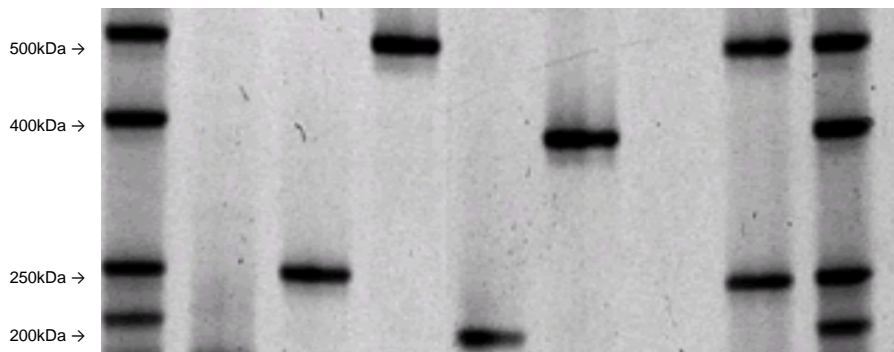
Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

1. Από την ηλεκτροφόρηση που κάνατε βρείτε ποιον από τους ορούς είχατε σαν ομάδα και αιτιολογήστε.
2. Στο εργαστήριο που εργάζεστε, ασχολείστε με τα παθογόνα στελέχη: *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, και *Salmonella* spp. Αφού έχετε κάνει σωστή επεξεργασία γνωστών, για τα παθογόνα, δειγμάτων, τα αποτελέσματά σας είναι στην παρακάτω εικόνα.



Στη συνέχεια, ο ΕΦΕΤ σας έφερε δείγματα από 8 κτηνοτροφικές μονάδες για να τα αναλύσετε και να απαντήσετε αν και ποιες έχουν τα γνωστά σε σας παθογόνα στελέχη και από ποια κτηνοτροφική φάρμα θα λέγατε ότι τα προϊόντα της είναι ασφαλή για κατανάλωση.

(Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις σας φαίνονται στην παρακάτω εικόνα)



Αναφορές

- **Laemmli, UK. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- **Bradford, MM. (1976)** A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

ΑΣΚΗΣΗ 7

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ (ΜΕΡΟΣ Ι)

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

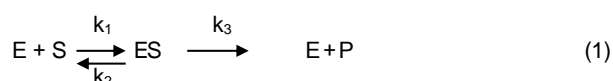
Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που δρουν ως βιολογικοί καταλύτες επειδή έχουν την ικανότητα να προάγουν ειδικές χημικές αντιδράσεις κάτω από τις ήπιες συνθήκες που επικρατούν στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Τα ένζυμα δεν αλλάζουν τη θέση της ισορροπίας σε μια αντιστρεπτή αντίδραση, αλλά επιταχύνουν την επίτευξη της χαμηλώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης, που απαιτείται κατά την μετατροπή υποστρώματος σε προϊόν, με το να διευκολύνουν τη δημιουργία της μεταβατικής κατάστασης. Τα ένζυμα έχουν τρία διακριτικά χαρακτηριστικά: Υψηλή ειδικότητα, υψηλή ταχύτητα αντίδρασης και μεγάλη ικανότητας ρύθμισης.

Όλα τα ένζυμα συνδέουν αντιστρεπτά το υπόστρωμα τους σε μια ειδική περιοχή δέσμευσης, γνωστή ως ενεργό κέντρο, που δημιουργείται από την τρισδιάστατη δομή του πρωτεϊνικού μορίου. Το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος υφίσταται μια καταλυτική αντίδραση, που προάγεται από ειδικά κατάλοιπα αμινοξέων στο ενεργό κέντρο, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του προϊόντος. Οι καταλυτικές ιδιότητες ενός ενζύμου συχνά εξαρτώνται από την ύπαρξη μη-πεπτιδικών μορίων, γνωστών ως συμπράγοντες ή συνένζυμα, τα οποία συνδέονται με το ένζυμο και προάγουν την αντίδραση. Ορισμένα ένζυμα (αλλοστερικά) μπορεί να περιέχουν, εκτός από το ενεργό κέντρο, ξέχωρες ρυθμιστικές ή αλλοστερικές περιοχές για την σύνδεση άλλων μορίων, τα οποία όταν συνδεθούν, τροποποιούν την καταλυτική δράση του ενζύμου επειδή επάγουν αλλαγές στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου. Αυτά τα ρυθμιστικά μόρια ονομάζονται τροποποιητές και μπορεί να ενεργοποιούν ή να καταστέλλουν το ένζυμο.

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, όπως διατυπώθηκε κυρίως από τους Michaelis-Menten, ασχολείται με την μέτρηση των δύο χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου, V_{max} και K_M , και με την μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι από τους παράγοντες αυτούς είναι: η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος

και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεως, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς), το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.

Η ενεργότητα ενός ενζύμου, E, εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υποστρώμα μετατρέπεται μη αντιστρεπτά σε ένα προϊόν, στην αντίδραση



(και όπου k_1 , k_2 και k_3 οι σταθερές της ταχύτητας των επιμέρους αντιδράσεων) η ταχύτητα, V, ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος, S, που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων, P, που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου ($v = -d[S]/dt = d[P]/dt$) και υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

όπου V_0 η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, $[S]$ η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{max} η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε και

$$K_M (\text{σταθερά Michaelis}) = \frac{k_1 + k_2}{k_3} \quad (3)$$

Για να ισχύει η κινητική Michaelis-Menten απαιτείται ο προσδιορισμός της αρχικής ταχύτητας, V_0 , γιατί μόνο τότε ισχύει η υπόθεση ότι η μετατροπή αντιδρώντων σε προϊόντα δεν είναι αντιστρεπτή και $[P]=0$. Η αρχική ταχύτητα, V_0 , προσδιορίζεται από την καμπύλη προόδου της αντίδρασης, δηλαδή το διάγραμμα μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος ή προϊόντος με το χρόνο και δίνεται από την εφαπτομένη των καμπύλων σε χρόνο $t=0$.

Δεδομένου ότι η $V_0 = k_3[ES]$ και $V_{max} = k_3[E_T]$ (όπου E_T το ολικό ποσό του ενζύμου) είναι φανερό ότι η αρχική ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε. Για την εκτίμηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του ενζύμου στην V_0 χρειάζεται η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος να είναι μεγάλη, ώστε να μην αποτελεί

Μορφοποιήθηκε: Δείκτης

περιοριστικό παράγοντα (η αντίδραση να είναι μηδενικής τάξεως ως προς το υπόστρωμα).

Από την εξίσωση Michaelis-Menten προκύπτει ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας, V_0 , με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$, είναι μια ορθογώνια υπερβολή. Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως, $V_0=k[S]$), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική μηδενικής τάξεως ή κινητική κορεσμού, $V_0=k$) και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας, V_{max} . Η σταθερά Michaelis είναι η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία έχουμε το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Από τις εξισώσεις (1) και (3) προκύπτει ότι, όταν η k_3 είναι πολύ μικρή, η K_M πλησιάζει τη σταθερά διαστάσεως του συμπλόκου ES, μας δίνει επομένως μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Επειδή ο προσδιορισμός των K_M και V_{max} είναι δύσκολος από την ορθογώνια υπερβολή, προτιμώνται γραμμικοί μετασχηματισμοί της εξίσωσης Michaelis-Menten. Ο γνωστότερος από αυτούς είναι η εξίσωση *Lineweaver-Burk*, ή διάγραμμα του διπλού αντιστρόφου:

$$1/V_0 = K_M/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max} \quad (4)$$

Έτσι το διάγραμμα $1/V_0$ προς $1/[S]$ είναι ευθεία γραμμή, η οποία τέμνει τον κάθετο άξονα στο σημείο $1/V_{max}$, τον οριζόντιο άξονα στο σημείο $-1/K_M$ και έχει κλίση K_M/V_{max} .

Οι καταλυτικές σταθερές K_M και V_{max} είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή K_M είναι σταθερή για ένα ένζυμο με ένα ορισμένο υπόστρωμα κάτω από καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, εκφράζεται ως συγκέντρωση και συνήθως κυμαίνεται σε 10^{-1} με 10^{-7} M. Αντιθέτως

η V_{max} εξαρτάται από το ποσό του ενζύμου που χρησιμοποιείται και γι' αυτό εκφράζεται ως ταχύτητα σχηματισμού P ανά μονάδα ενζύμου (πχ $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ πρωτεΐνης)

Μια άλλη πολύ χρήσιμη σταθερά είναι ο αριθμός ανακύκλωσης ή k_{cat} , ο οποίος ορίζεται ως $k_{cat} = V_{max}/[E_T]$. Η k_{cat} αντιστοιχεί στο μέγιστο αριθμό moles υποστρώματος που μπορούν να μετατραπούν σε προϊόν ανά mole ενζύμου ανά μονάδα χρόνου σε συνθήκες ενζυμικού κορεσμού, αντιπροσωπεύει δηλαδή τη μοριακή ενεργότητα του ενζύμου και εκφράζεται σε sec^{-1} . Η k_{cat} ισούται με την k_3 όταν $[S] \gg K_M$ και έχει τιμές που κυμαίνονται ανάμεσα στο $1-10^7$. Τέλος η σταθερά εξειδίκευσης, k_{cat}/K_M , ο λόγος δυο σταθερών, εκφράζεται σε $M^{-1}\text{sec}^{-1}$ και είναι ενδεικτική της κινητικής αποδοτικότητας του ενζύμου. Αντιστοιχεί στην σταθερά της ταχύτητας k_1 , ανάμεσα στο υπόστρωμα και στο ελεύθερο ένζυμο, όταν $[S] \ll K_M$ και $[E_T] = [E_{ελεύθερο}]$.

Η ενζυμική ενεργότητα επηρεάζεται από την ύπαρξη αναστολέων. Οι αναστολείς ενζύμων (I) είναι συνδέτες που ενώνονται ειδικά με ένα ένζυμο με ένα τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνουν την ικανότητα του να συνδέει το υπόστρωμα και να το μετατρέψει σε προϊόν. Διακρίνονται σε αντιστρεπτούς και μη-αντιστρεπτούς.

Οι μη-αντιστρεπτοί αναστολέες, όπως είναι οι οργανικές ενώσεις φωσφόρου και υδράργυρου, τα κυανιούχα, το μονοξειδίο του άνθρακα και το υδρόθειο, συνδέονται στενά, συχνά με ομοιοπολικούς δεσμούς, με δραστικές ομάδες όπως -OH, -SH ή άτομο μετάλλου, στο ενεργό ή αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Έτσι το DIPF (διίσοπροπυλο-φωσφοφθοριδίο) ή το παραθείο αντιδρά με ομάδες σερίνης στο κέντρο εστερασών όπως η ακετυλοχολινεστεράση, το ιωδοακεταμίδιο με ομάδες κυστεΐνης, ενώ το CN^- με το Fe κυτοχρωμάτων. Τέτοιοι αναστολείς είναι πολύ χρήσιμοι στην μελέτη των ενεργών κέντρων ενζύμων και η έκταση της μη-αντιστρεπτής αναστολής που προκαλούν εξαρτάται από το χρόνο και την ποσότητα του αναστολέα.

Οι αντιστρεπτοί αναστολείς συνδέονται μη ομοιοπολικά με το ένζυμο και γι' αυτό μπορεί να απομακρυνθούν εύκολα με διαπίδυση. Οι συναγωνιστικοί αντιστρεπτοί αναστολείς συνδέονται στην ίδια περιοχή όπως το υπόστρωμα, με το οποίο

μοιάζουν δομικά, μειώνοντας ουσιαστικά τα ενεργά κέντρα του ενζύμου που είναι διαθέσιμα για σύνδεση υποστρώματος. Αντιθέτως, ένας μη-συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται με μια περιοχή διαφορετική από αυτή του υποστρώματος και οδηγεί στη δημιουργία ενός συμπλόκου αδιεξόδου, το οποίο δεν μπορεί να μετατρέψει υπόστρωμα σε προϊόν. Όλα τα είδη αντιστρεπτών αναστολέων χαρακτηρίζονται από την σταθερά διαστάσεως του αναστολέα K_i , η οποία αφορά τη διάσταση του συμπλόκου EI ή ESI και μειώνουν την K_M ή την V_{max} του ενζύμου με τον όρο $1 + [I]/K_i$.

Στη συναγωνιστική αναστολή, όπου και το υπόστρωμα και ο αναστολέας συνδέονται στην ίδια περιοχή, μειώνεται η K_M (φαινομενική $K^{appM} = K_M (1 + [I]/K_i)$) αλλά δεν επηρεάζεται η V_{max} του ενζύμου και η δράση του αναστολέα μπορεί να εξουδετερωθεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Παρουσία συναγωνιστικού αναστολέα η εξίσωση *Lineweaver-Burk* γίνεται:

$$1/V_0 = K_M/V_{max} \cdot 1/[S](1+[I]/K_i) + 1/V_{max} \quad (5)$$

Στη μη-συναγωνιστική αναστολή, δεδομένου ότι ο αναστολέας συνδέεται σε διαφορετική περιοχή από αυτήν του υποστρώματος, η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος δεν ωφελεί. Η K_M δεν επηρεάζεται, αλλά μειώνεται η V_{max} .

Η κινητική Michaelis-Menten, όπως έχει τροποποιηθεί και επεκταθεί για να περιλαμβάνει και αντιστρεπτές αντιδράσεις και αντιδράσεις δύο ή περισσότερων υποστρωμάτων, ισχύει για πάρα πολλές ενζυμικές αντιδράσεις. Δεν ισχύει όμως για τα αλλοστερικά ένζυμα.

Πολλά αλλοστερικά ένζυμα είναι ολιγομερή, αποτελούνται δηλαδή από αρκετές ίδιες ή διαφορετικές πρωτεϊνικές υπομονάδες και, αντί για ορθογώνια υπερβολή, δίνουν μια σιγμοειδή σχέση ανάμεσα στην αρχική ταχύτητα και στη συγκέντρωση του υποστρώματος. Σε ένα αλλοστερικό ένζυμο η σύνδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο μιας υπομονάδας αλλάζει τη μοριακή του διαμόρφωση. Η αλλαγή αυτή μεταδίδεται στις άλλες υπομονάδες συνεργειακά και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ή μειωμένη δραστηριότητα των άλλων υπομονάδων για τη σύνδεση άλλων μορίων υποστρώματος. Η σύνδεση

μορίων, διαφορετικών από το υπόστρωμα (θετικοί ή αρνητικοί τροποποιητές), σε διαφορετικές από το ενεργό κέντρο αλλοστερικές περιοχές επίσης μπορεί να επηρεάσει την ενζυμική ενεργότητα. Συνήθως οι αλλοστερικοί τροποποιητές επηρεάζουν την τάση σύνδεσης της ενεργής περιοχής με το υπόστρωμα, υπάρχουν ωστόσο και αλλοστερικά συστήματα στα οποία αλλάζει η ταχύτητα μετατροπής του συμπλόκου ES σε προϊόντα. Η σταθερά Michaelis Km δεν χρησιμοποιείται με αλλοστερικά ένζυμα. Αντί αυτής χρησιμοποιείται ο όρος $[S]_{0,5}$, δηλαδή η συγκέντρωση του υποστρώματος που απαιτείται για να παρατηρηθεί 50% ενζυμικός κορεσμός. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ύπαρξη σιγμοειδούς κινητικής δεν αποδεικνύει την ύπαρξη αλλοστερικών φαινομένων και ότι κάποια αλλοστερικά ένζυμα δεν έχουν σιγμοειδή κινητική. Γενικά, οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις είναι πολύπλοκες και διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί για την εξήγηση τους.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στόχος του πειράματος είναι να προσδιορισθεί η αρχική ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης και να μελετηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε αυτήν καθώς και η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική αντίδραση.

Η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης (V_0) θα υπολογιστεί από την κλίση της καμπύλης της μεταβολής της απορροφητικότητας (A) που εμφανίζει το προϊόν της αντίδρασης συναρτήσει του χρόνου (μετρήσεις απορροφητικότητας **συνεχώς** σε μικρά χρονικά διαστήματα).

Αντιδραστήρια

Απαιτούνται τα ακόλουθα διαλύματα:

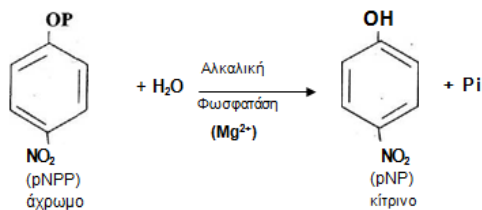
ΜΕΡΟΣ 1

1. Ρυθμιστικό διάλυμα, pH 9,5: 0,1M Tris-HCl Buffer, pH 9,5 / 10mM MgCl₂.
2. π-νιτροφαινόλη (pNP): 0,05mM και 0,5mM

ΜΕΡΟΣ 2

3. π-νιτροφαινυλ-φωσφορικό (pNPP) (δινατριο άλας διαλυμένο σε Buffer): 10mM, 2,0mM, 1,0mM, 0,5mM.
4. Αλκαλική φωσφατάση: 0,25mg/ml H₂O (εμπορικό παρασκεύασμα ενζύμου από την εντερική βλεννογόνο βόσ). Το διάλυμα αυτό, καθώς και δύο αραιώσεις του (0,10mg/ml και 0,025mg/ml), διατηρούνται στους 4°C. Το τέταρτο δείγμα περιέχει το αρχικό διάλυμα ενζύμου (0,25mg/ml) το οποίο έχει θερμομανθεί στους 90°C για 5 λεπτά.

Αντίδραση:



Σε αλκαλικό pH η αλκαλική φωσφατάση καταλύει την παραπάνω αντίδραση. Παρόλο που το pNPP δεν είναι το φυσικό υπόστρωμα γι' αυτό το ένζυμο, αυτή η αντίδραση είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας διότι το προϊόν π-νιτροφαινόλη (pNP) είναι κίτρινο και απορροφά έντονα φως μήκους κύματος 405nm. Έτσι η ταχύτητα του σχηματισμού του προϊόντος (δηλαδή η ταχύτητα της αντίδρασης) μπορεί να υπολογιστεί φασματοφωτομετρικά με την μέτρηση της απορροφητικότητας του διαλύματος στα 405nm σαν συνάρτηση του χρόνου.

ΜΕΡΟΣ 1^ο

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης απορροφητικότητας της π-νιτροφαινόλης στα 405nm

Αντιδραστήρια	-	Υλικά-Όργανα
Buffer περίπου 40 ml		Δοκιμαστικοί σωλήνες (7)
π-νιτροφαινόλη 1mM περίπου 4ml		Σιφώνια πλήρωσης 1ml, 2ml και 5ml
		Φωτόμετρο (ρύθμιση στα 405nm)
		Κυψελίδα

Υπολογίζετε τις τελικές αραιώσεις για συγκεντρώσεις π-νιτροφαινόλης από την αρχική 1mM σε 0,5mM και 0,05mM αντίστοιχα για τις ανάγκες της άσκησης. **Η αραιώση θα γίνει με το διάλυμα Buffer που θα σας δοθεί.**

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση της π-νιτροφαινόλης που παράγεται στην ενζυμική αντίδραση από τις τιμές απορροφητικότητας που λαμβάνετε, **είναι ανάγκη να κατασκευαστεί προηγουμένως μια πρότυπη καμπύλη από τις μετρήσεις της απορροφητικότητας στα 405nm (A_{405})** διαφόρων πρότυπων συγκεντρώσεων π-νιτροφαινόλης. Να παρασκευαστούν τα ακόλουθα διαλύματα σε 7 σωλήνες του φασματοφωτομέτρου:

	T	1	2	3	4	5	6
Απιονισμένο νερό (ml)	0,5	0,0	0,2	0,4	0,0	0,2	0,4
Buffer pH 9,5(ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
π-νιτροφαινόλη 0,5mM (ml)	-	0,5	0,3	0,1	-	-	-
π-νιτροφαινόλη 0,05 mM (ml)	-	-	-	-	0,5	0,3	0,1

Ο σωλήνας T είναι το **τυφλό δείγμα**. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων (σωλήνες 1-6) γίνεται στα 405nm. **Μηδενίζουμε στο κενό!**

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

1. Περιγράψτε τη διαδικασία δημιουργίας 1L του Ρυθμιστικού διαλύματος : 0,1M Tris, 10mM MgCl₂ με pH 9,5 (Δίνονται Mr Tris:121,1 & Mr MgCl₂ : 95,21)

2. Υπολογίστε την τελική συγκέντρωση (μM) της π-νιτροφαινόλης σε κάθε διάλυμα και καταγράψτε τα αποτελέσματά σας (A_{405}). Κατασκευάστε την πρότυπη καμπύλη απορροφητικότητας της pNP (Διάγραμμα 1) τοποθετώντας τις τιμές απορροφητικότητας που βρήκατε (ψ άξονα) έναντι των γνωστών συγκεντρώσεων π-νιτροφαινόλης που υπολογίσατε (χ άξονα) και βρείτε το R^2 .

ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

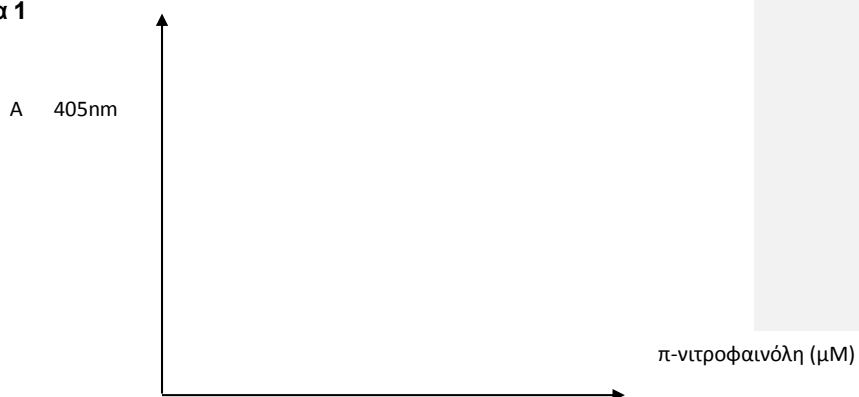
Ημερομηνία διεξαγωγής άσκησης: .../.../201..

Ομάδα: A__ Μέλη ομάδας: 1)
2)
3)
4)

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Π-ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΟΛΗΣ.

Αριθμός σωλήνα	Απορροφητικότητα 405nm	π-Νιτροφαινόλη (μM)
1		
2		
3		
4		
5		
6		

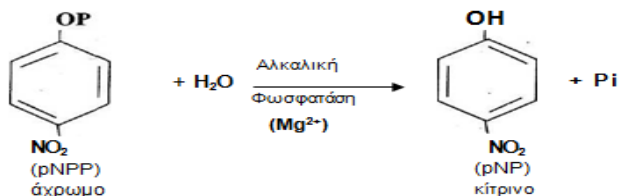
Διάγραμμα 1



ΑΣΚΗΣΗ 8

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ (ΜΕΡΟΣ ΙΙ)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ:



ΜΕΡΟΣ 2^ο

Κατασκευή διαγράμματος Lineweaver-Burk ή του διπλού αντιστρόφου

- π-νιτροφαινυλ-φωσφορικό (pNPP) (δινатριο άλας διαλυμένο σε Buffer): 10mM, 2,0mM, 1,0mM, 0,5mM.
- Ένζυμο Αλκαλική φωσφατάση: 0,25mg/ml H₂O (εμπορικό παρασκεύασμα ενζύμου από την εντερική βλεννογόνο βοός). Ένα δείγμα θα περιέχει το αρχικό διάλυμα ενζύμου (0,25mg/ml) το οποίο έχει θερμανθεί στους 90°C για 5 λεπτά.

Αντιδραστήρια

Υλικά-Όργανα

Αντιδραστήρια	-	Υλικά-Όργανα
Buffer pH 9,5 περίπου 20 ml		Δοκιμαστικοί σωλήνες (18-20)
pNPP 8mM περίπου 2 ml		Σιφώνια πλήρωσης 1ml και 5ml (2)
pNPP 4mM περίπου 2 ml		Αυτόματος αναδευτήρας (Vortex)
pNPP 2mM περίπου 2 ml		Φωτόμετρο (ρύθμιση στα 405nm)
pNPP 1mM περίπου 2 ml		κυψελίδες (1)
pNPP 0,5mM περίπου 2 ml		Παραφίλμ (8)
Ένζυμο 5μg/ml περίπου 1ml		κομματάκια για την ανάδευση των κυψελίδων
		Υδατόλουτρο

Το υπόστρωμα δινатριο π-νιτροφαινυλ-φωσφορικό (pNPP) σας δίνεται σε 5 συγκεντρώσεις, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

ΟΛΑ ΤΑ ΔΙΑΛΥΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΙ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΣΑΣ ΔΙΝΟΝΤΑΙ ΕΤΟΙΜΑ, ΕΣΕΙΣ ΦΤΙΑΧΝΕΤΕ ΤΟΥΣ ΣΩΛΗΝΕΣ ΜΕ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (ΟΠΩΣ ΦΑΙΝΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΠΙΝΑΚΑ) ΚΑΙ ΚΑΝΕΤΕ ΤΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΘΑ ΣΑΣ ΔΩΘΕΙ ΜΟΛΙΣ ΕΤΟΙΜΑΣΕΤΕ ΟΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ)

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται σαν τυφλό ένα διάλυμα που περιέχει την ίδια συγκέντρωση υποστρώματος. Έτσι, σε σωλήνες προστίθενται τα κάτωθι αντιδραστήρια:

Σωλήνες	1	2	2'	3	4	4'	5	6	6'	7	8	8'	9	10	
	(T)	(Δ)	(Δ)	(T)	(Δ)	(Δ)	(T)	(Δ)	(Δ)	(T)	(Δ)	(Δ)	(T)	(Δ)	
Buffer pH 9,5 (ml)	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	
pNPP 8mM (ml)	0,5	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
pNPP 4mM (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	
pNPP 2mM (ml)	-	-	-	0,5	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	
pNPP 1mM (ml)	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5	-	-	-	-	-	
pNPP 0,5mM (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5	-	-	
Απιονισμένο νερό (ml)	0,2	-	-	0,2	-	-	0,2	-	-	0,2	-	-	0,2	-	
<p>ΟΙ ΜΟΝ'ΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΘΑ ΕΤΟΙΜΑΣΟΥΝ ΤΑ 2' ΚΑΙ 4' ΑΠΟ ΒΡΑΣΜΕΝΟ ΕΝΖΥΜΟ, ΕΝΩ ΟΙ ΖΥΓΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΤΑ 6' ΚΑΙ 8' ΑΦΟΥ ΕΤΟΙΜΑΣΕΤΕ ΤΑ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΡΩΤΑ ΦΩΤΟΜΕΤΡΕΙΤΕ ΤΟ ΤΥΦΛΟ ΤΟΥ ΚΑΘΕΝΟΣ, ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΙΤΕ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΣΑΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΈΧΟΝΤΑΣ ΕΤΟΙΜΟ ΚΑΠΟΙΟ ΧΡΟΝΟΜΕΤΡΟ, ΤΟΤΕ ΚΑΙ ΜΟΝΟ ΤΟΤΕ ΘΑ ΒΑΛΑΤΕ ΣΤΟΝ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΣΩΛΗΝΑ ΤΟ ΈΝΖΥΜΟ (ΜΕΤΡΑΤΕ ΕΝΑ ΣΩΛΗΝΑ ΤΗΝ ΦΟΡΑ) ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΝΑΔΕΥΕΤΕ ΛΙΓΟ ΤΟΝ ΣΩΛΗΝΑ ΚΑΙ ΞΕΚΙΝΑΤΕ ΑΜΕΣΩΣ ΤΗΝ ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΧΡΟΝΟΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟΝ ΠΙΝΑΚΑ Α ΣΤΟ ΜΕΡΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</p>															
Ένζυμο 5μg/ml (ml)	-	0,2	0,2	-	0,2	0,2	-	0,2	0,2	-	0,2	0,2	-	0,2	

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

- Μηδενίζετε στο κενό.
- Καταγράφεται την τιμή απορρόφησης για τα διαλύματα των σωλήνων **1,3,5,7,9 (Τυφλό, T)**.
- Μηδενίζετε το χρονόμετρο για να ξεκινήσετε τις μετρήσεις, μόλις μπει το ένζυμο.
- Προσθέστε 0,2 ml ενζύμου (**5μg/ml**) στο διάλυμα του σωλήνα **2 (Δείγμα, Δ)** και προσδιορίστε την πρόοδο της αντίδρασης παρακολουθώντας την απορρόφηση στα χρονικά σημεία του πίνακα Α, για περίπου 5 λεπτά και ομοίως για τους σωλήνες **4,6,8,10 (Δείγματα, Δ)**..
- Το χρονόμετρο μηδενίζεται **ΜΟΝΟ** μια φορά, στην **ΑΡΧΗ** της κάθε χρονομέτρησης.
- **Επιπλέον ΟΙ ΜΟΝ'ΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΘΑ ΕΤΟΙΜΑΣΟΥΝ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΟΥΝ ΤΑ 2' ΚΑΙ 4' ΑΠΟ ΒΡΑΣΜΕΝΟ ΕΝΖΥΜΟ, ΕΝΩ ΟΙ ΖΥΓΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΤΑ 6' ΚΑΙ 8'**

Το ένζυμο προσθέεται πάντα στο τέλος και μετά αρχίζει η καταγραφή της απορρόφησης στα διάφορα χρονικά σημεία.

Τα χρονικά σημεία των μετρήσεων δεν είναι απαραίτητα να είναι ακριβώς 30 sec. Ένας χρόνος στον οποίο μπορούμε να καταγράψουμε μια σημαντική διαφορά στην απορρόφηση της τάξης 0,05 (πχ από 0,23 σε 0,28) είναι ιδανικός. Ιδανικά θα μπορούσατε να αφήσετε το δείγμα μέσα στο φωτόμετρο και να καταγράφεται τιμές όλη την διάρκεια του πειράματος.

Γ. ΑΝΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

1. Παρουσιάστε τα κινητικά δεδομένα της αντίδρασης (t σε sec έναντι A_{405}) που πήρατε για τους σωλήνες 2, 4, 6 και 8, που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, στον **Πίνακα Α**.

2. Σχεδιάστε την πρόοδο της αντίδρασης (**Διάγραμμα Α**) για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος και μετρήστε την εκάστοτε αρχική ταχύτητα, όπως στο προηγούμενο πείραμα. Καταγράψτε τα αποτελέσματα σας στον Πίνακα Β, δείχνοντας την τελική συγκέντρωση του υποστρώματος (μM) σε κάθε αντίδραση για την οποία υπολογίσατε την αρχική ταχύτητα V_0 (σε A_{405}/min και $\mu\text{M}/\text{min}$).

3. Κατασκευάστε ένα διάγραμμα (**Διάγραμμα Β**) που να δείχνει την μεταβολή της ταχύτητας V_0 σε $\mu\text{M}/\text{min}$ (ψ άξονας) σε σχέση με την μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος S (χ άξονας). Σχεδιάστε ένα άλλο διάγραμμα (**Διάγραμμα Γ**) χρησιμοποιώντας τις τιμές $1/V_0$ και $1/[S]$ (Διάγραμμα Lineweaver-Burk ή του διπλού αντιστρόφου) και από αυτό υπολογίστε την V_{\max} και K_M της αλκαλικής φωσφατάσης.

Για τα αποτελέσματα με το βρασμένο ένζυμο, θα συνεργαστείτε ανά ομάδες (ανά πάγκο η μονή με την ζυγή ομάδα, πχ η 1^η με την 2^η, η 7^η με την 8^η, η 13^η με την 14^η κ.ο.κ.)

ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ημερομηνία:/...../201..

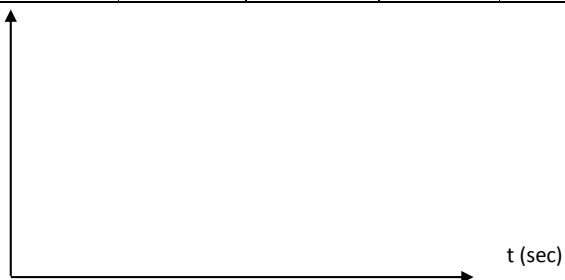
Ομάδα: _____ Μέλη της ομάδας: 1)
2)
3)
4)

ΠΙΝΑΚΑΣ Α

Χρόνος t (sec)	Απορρόφηση στα 405nm				
	Σωλήνας 2	Σωλήνας 4	Σωλήνας 6	Σωλήνας 8	Σωλήνας 10
15					
30					
60					
90					
120					
150					
180					
210					
240					
270					

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Α

A 405nm

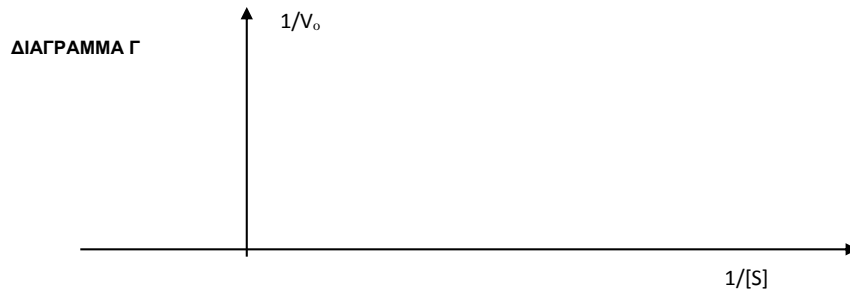


ΠΙΝΑΚΑΣ Β

N° σωλήνα	Τελική συγκέντρωση S (μM)	Αρχική ταχύτητα V ₀		1/V ₀	1/[S]
		A ₄₀₅ /min	μM/min		
2					
4					
6					
8					
10					

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Β





Οι συγκεντρώσεις υπολογίζονται από την πρότυπη καμπύλη που κατασκευάσατε στο ΜΕΡΟΣ Ι.

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ (με ένζυμο που έχει θερμανθεί στους 90°C για 5 λεπτά)

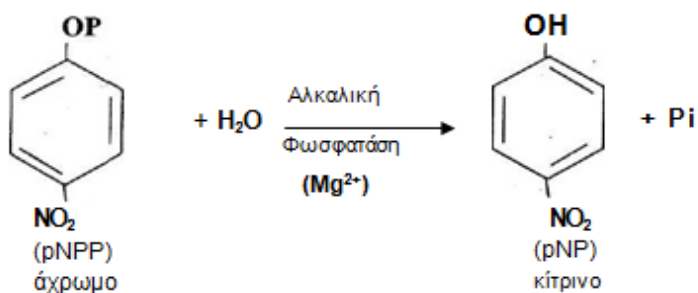
Χρόνος t (sec)	Απορρόφηση στα 405nm			
	Σωλήνας 2'	Σωλήνας 4'	Σωλήνας 6'	Σωλήνας 8'
15				
30				
60				
90				
120				
150				
180				
210				
240				
270				



ΑΣΚΗΣΗ 9

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ (ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ:















ΜΕΡΟΣ 3^ο

Προσδιορισμός ενζυμικής συγκέντρωσης διαλύματος

1. π-νιτροφαινυλ-φωσφορικό (pNPP) (δινάτριο άλας διαλυμένο σε Buffer): **70mM**.
2. Ένζυμο **Αλκαλική φωσφατάση**, εμπορικό παρασκεύασμα ενζύμου από την εντερική βλεννογόνο βοός (Phosphatase, Alkaline from bovine intestinal mucosa, lyophilized 10-30 DEA units/mg solid). Το ένζυμο μέχρι να χρησιμοποιηθεί κρατείται στον πάγο!

Αντιδραστήρια	-	Υλικά-Όργανα
Buffer pH 9,5		Δοκιμαστικοί σωλήνες
pNPP 70mM		Σιφώνια πλήρωσης 1ml, 2ml και 5ml
Ένζυμο Αλκαλική φωσφατάση:		Πάγος
Δίνονται έτοιμα τα 30μg/ml, 20μg/ml		Φωτόμετρο (ρύθμιση στα 405nm)
Παρασκευάζετε τα 15μg/ml, 10μg/ml, 8μg/ml, 5μg/ml, 3μg/ml, 1μg/ml, 0.5μg/ml, 0.1μg/ml		κυψελίδες (1)
Άγνωστης συγκέντρωσης ένζυμο		Παραφύλμ, κομματάκια για την ανάδευση των κυψελίδων

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται σαν τυφλό ένα διάλυμα που περιέχει την ίδια συγκέντρωση υποστρώματος. Έτσι, σε σωλήνες προστίθενται τα κάτωθι αντιδραστήρια:

Πίνακας 2												
Σωλήνες	(T)	1ος	2ος	3ος	4ος	5ος	6ος	7ος	8ος	9ος	10ος	Άγνωστο
												
Buffer pH 9,5 (ml)	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
pNPP 70mM (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<p>ΑΦΟΥ ΕΤΟΙΜΑΣΕΤΕ ΤΑ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΜΗΔΕΝΙΖΕΤΕ ΣΤΟ ΚΕΝΟ ΚΑΙ ΠΡΩΤΑ ΦΩΤΟΜΕΤΡΕΙΤΕ ΤΟ ΤΥΦΛΟ (T) ΣΤΑ 405nm (ΤΟΝ ΣΩΛΗΝΑ ΔΗΛΑΔΗ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΕΝΖΥΜΟ), ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΙΤΕ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΣΑΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΈΧΟΝΤΑΣ ΕΤΟΙΜΟ ΚΑΠΟΙΟ ΧΡΟΝΟΜΕΤΡΟ, ΚΟΙΤΩΝΤΑΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΝΟΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΠΟΜΕΝΟ ΠΙΝΑΚΑ 3, ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΧΡΟΝΟΥΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΙΣ, ΤΟΤΕ ΚΑΙ ΜΟΝΟ ΤΟΤΕ ΘΑ ΒΑΛΑΤΕ ΣΤΟΝ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΣΩΛΗΝΑ ΤΟ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΈΝΖΥΜΟ (ΜΕΤΡΑΤΕ ΕΝΑ ΣΩΛΗΝΑ ΤΗΝ ΦΟΡΑ) ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΝΑΔΕΥΕΤΕ ΓΙΑ ΛΙΓΟ ΙΣΧΥΡΑ ΤΟΝ ΣΩΛΗΝΑ ΚΑΙ ΞΕΚΙΝΑΤΕ ΑΜΕΣΩΣ ΤΗΝ ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΧΡΟΝΟΜΕΤΡΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΠΙΝΑΚΑ ΣΥΜΠΛΗΡΩΝΕΤΕ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</p>												
Διαφορετικές Συγκεντρώσεις ενζύμου	0μg/ml	30μg/ml	20μg/ml	15μg/ml	10μg/ml	8μg/ml	5μg/ml	3μg/ml	1μg/ml	0.5μg/ml	0.1μg/ml	Άγνωστο
Ποσότητα σε ml	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ (ml)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	1

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

- Μηδενίζετε στο κενό.
- Καταγράφεται την τιμή απορρόφησης για το **Τυφλό, T**.
- Μηδενίζετε το χρονόμετρο για να ξεκινήσετε τις μετρήσεις, μόλις μπει το ένζυμο.
- Προσθέστε 1 ml ενζύμου κάθε φορά στο διάλυμα του σωλήνα και κάντε λήψη των τιμών απορρόφησης τα(κατά την πρόοδο της αντίδρασης) για τα χρονικά σημεία του πίνακα 3.
- Το χρονόμετρο μηδενίζεται **ΚΑΘΕ** φορά στην **ΑΡΧΗ** της κάθε χρονομέτρησης

Το ένζυμο προσθέτεται πάντα στο τέλος και μετά αρχίζει η καταγραφή της απορρόφησης στα διάφορα χρονικά σημεία.

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

1. Εργαστείτε, υπολογίζοντας τους χρόνους και κατασκευάζοντας τις κατάλληλες καμπύλες, για να βρείτε την άγνωστη συγκέντρωση διαλύματος ενζύμου.

ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΜΣΑΤΩΝ

Ημερομηνία:/...../201...

Ομάδα: _ _ _ _ _ Μέλη της ομάδας: 1)
2)
3)
4)

ΠΙΝΑΚΑΣ 3, Απορρόφηση στα 405nm

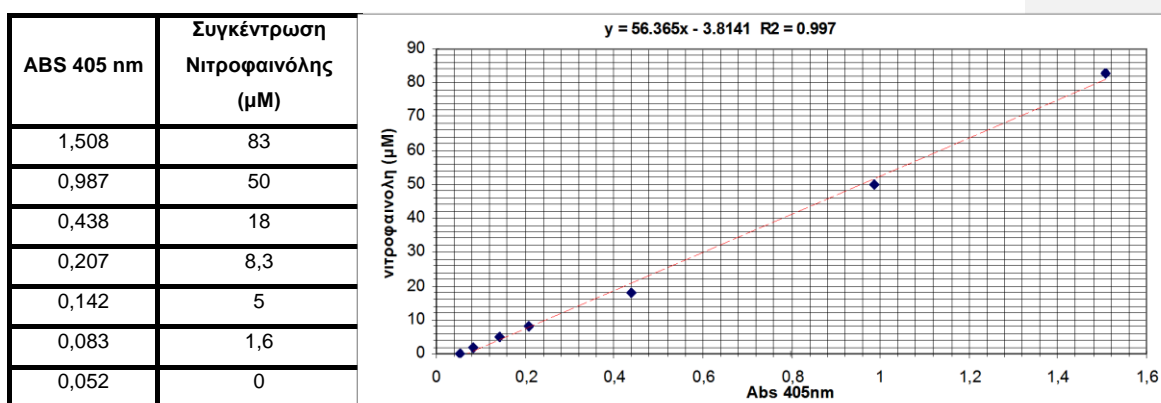
Χρόνος t (sec)	15	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
ABS Σωλήνας 1ος												
Χρόνος t (sec)	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180
ABS Σωλήνας 2ος												
Χρόνος t (sec)	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
ABS Σωλήνας 3ος												
Χρόνος t (sec)	60	120	160	180	210	240	270	300	330	360	390	420
ABS Σωλήνας 4ος												
Χρόνος t (sec)	60	90	120	180	240	300	330	360	390	420	450	480
ABS Σωλήνας 5ος												
Χρόνος t (sec)	60	90	120	180	240	300	330	360	390	420	450	480
ABS Σωλήνας 6ος												
Χρόνος t (sec)	60	90	120	180	240	300	330	360	390	420	450	480
ABS Σωλήνας 7ος												
Χρόνος t (sec)	60	90	120	180	240	300	330	360	390	420	450	480
ABS Σωλήνας 8ος												
Χρόνος t (sec)	60	90	120	180	240	300	330	360	390	420	450	480
ABS Σωλήνας 9ος												
Χρόνος t (sec)	60	90	120	180	240	300	330	360	390	420	450	480
ABS Σωλήνας 10ος												
Χρόνος t (sec)												
ABS Άγνωστο												

ΑΣΚΗΣΗ 10

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ – ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

Αρχικά χρειάζεστε να έχετε μια καλή πρότυπη καμπύλη. Τυπικό παράδειγμα πρότυπης καμπύλης:



Το R είναι πολύ καλό (>0.95%) και υποδηλώνει ότι η μετρήσεις ανήκουν σε μια ευθεία καμπύλη (συνάρτηση μορφής $Y=aX+b$)

Εάν κάποιες τιμές σας που αποκλίνουν πολύ (έχουν αρκετή απόσταση) από την ευθεία γραμμή (κόκκινες διακεκομμένες γραμμές) μπορούν να μη συμπεριληφθούν (ώστε να βελτιωθεί η τιμή R). Βεβαία εάν αποκλείσετε ακραίες τιμές (πρώτη και τελευταία τιμή) αυτό θα επηρεάσει τα όρια της καμπύλης σας. Αντίθετα αποκλεισμός τιμών από την μέση δεν επηρεάζουν τα όρια της μεθόδου.

Δεν είναι απαραίτητο οι τιμές σας να ξεκινάνε από το 0 στον άξονα των Y. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα συμβαίνει αυτό γιατί έχουμε αφαιρέσει την τιμή του τυφλού. Το σημαντικό είναι τα σημεία να **σχηματίζουν ευθεία γραμμή**.

Σημείωση η καμπύλη αναφέρεται σε συγκέντρωση νιτροφαινόλης το οποίο είναι **το προϊόν της αντίδρασης και όχι το αντιδρών.**

Για τους υπολογισμούς της ταχύτητας των ενζυμικών αντιδράσεων χρησιμοποιούμε την συγκέντρωση του αντιδρώντος ή υποστρώματος ([S]).

Για τον υπολογισμό της [S] μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή είναι απαραίτητο να κάνετε του ακόλουθους υπολογισμούς:

[S]_t = αρχική συγκέντρωση υποστρώματος που είχατε στο δοκιμαστικό σωλήνα (υπολογίζεται μετά από την αραίωση που έχετε κάνει)

[S] = συγκέντρωση υποστρώματος που δεν έχει μετατραπεί σε προϊόν

[P] = συγκέντρωση υποστρώματος που έχει μετατραπεί σε προϊόν δηλαδή σε **νιτροφαινόλη** η οποία υπολογίζεται φωτομετρικά

Άρα ανά πάσα στιγμή μπορείτε να υπολογίσετε το εναπομείναντα προϊόν

$$[S] = [S]_t - [P]$$

Αφού έχετε σε διαφορές χρονικές στιγμές την τιμή της. **[S]** χρειάζεται στην συνέχεια να υπολογίσετε τις ενζυματικές ταχύτητες

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΠΙΝΑΚΑΣ Α

Χρόνος t (sec)	Απορρόφηση στα 405nm			
	Σωλήνας 2	Σωλήνας 4	Σωλήνας 6	Σωλήνας 8
15	0,346	0,311	0,212	0,19
30	0,405	0,354	0,23	0,23
60	0,526	0,444	0,267	0,236
90	0,642	0,527	0,304	0,249
120	0,756	0,607	0,338	0,271
150	0,872	0,686	0,342	0,292
180	0,985	0,765	0,407	0,313
210	1,098	0,84	0,438	0,332
240	1,21	0,913	0,47	0,356
270	1,32	0,984	0,501	0,369

Προσοχή όλες η παραπάνω τιμές αφορούν απορροφήσεις

ΟΧΙ συγκεντρώσεις

Επίσης ο χρόνος πρέπει να μετατραπεί σε min αντί για sec
που είναι τώρα

Όλα τα παραπάνω αφορούν προϊόντα όχι αντιδρώντα

Σε αυτό το μέρος του πειράματος έχουμε αρχικά να υπολογίσουμε την **αρχική ταχύτητα** U μιας χημικής (ενζυμικής) αντίδρασης υπολογίζεται από την σχέση **Γιατί την αρχική ταχύτητα U_0 ;**

γιατί δεν έχει σχηματιστεί πολύ προϊόν αρά δεν έχουμε την επιρροή στην ταχύτητα από την αντίθετη αντίδραση (προϊόντα → αντιδρώντα)

$U_0 = (C_2 - C_1) / (t_2 - t_1)$ άρα με της παρακάτω τιμές

C_2 = συγκέντρωση **υποστρώματος** στον χρόνο t_2

t_2 = τελικός χρόνος

C_1 = συγκέντρωση **υποστρώματος** στον χρόνο t_1

t_1 = αρχικός χρόνος

Το υπόστρωμα είναι τα αντιδρώντα στον παραπάνω τύπο. Χρειαζόμαστε λοιπόν την συγκέντρωση των αντιδρώντων άλλα όλες οι απορροφήσεις και οι συγκεντρώσεις που υπολογίσαμε μέχρι τώρα αφορούσαν τα προϊόντα.

Δεν γνωρίζουμε τις συγκεντρώσεις C_2 και C_1 των αντιδρώντων ξέρουμε παρόλα αυτά την διάφορα τους αφού θα είναι ακριβώς ίδια (άλλα με αντίθετο πρόσημο) με αυτή των προϊόντων,

επειδή ένα αντιδρών μετατρέπεται σε ένα προϊόν ισχύει λοιπόν:

$$(C_2 - C_1)_{AvT} = -(C_2 - C_1)_{\Pi p}$$

Άρα στην ίδια διάφορα χρόνου

$$(C_2 - C_1) / (t_2 - t_1)_{AvT} = -(C_2 - C_1) / (t_2 - t_1)_{\Pi p}$$

μπορούμε να τις υπολογίσουμε την ταχύτητα των αντιδρώντων από την ταχύτητα των προϊόντων.

Η ταχύτητα U για την χρονική στιγμή 30 sec (t_1) θα είναι $U = (C_2 - C_1) / (t_2 - t_1)$

$C_1 =$ η συγκέντρωση του προϊόντων την χρονική στιγμή ας υποθέσουμε 30 sec

$t_1 =$ χρονική στιγμή στα 30 sec

$C_2 =$ η συγκέντρωση του υποστρώματος μια χρονική στιγμή μετά τα 30 sec. Ας υποθέσουμε 60 sec αλλά μπορεί (και είναι καλύτερα) μια χρονική στιγμή που η απορρόφηση στα 405nm θα είναι 0,02 μεγαλύτερη από την απορρόφηση στην χρονική στιγμή 30 sec.

$t_2 =$ καποια χρονική στιγμή μετά τα 30 sec. Ας υποθέσουμε 60 sec αλλά μπορεί (και είναι καλύτερα) μια χρονική στιγμή που η απορρόφηση στα 405nm θα είναι 0,02 μεγαλύτερη από την τιμη της απορρόφησης στα 30 sec.

Μετατροπή του Πίνακα A του χρόνου από sec σε min και μετατροπή του **A** (απορρόφηση) σε C_p (συγκέντρωση προϊόντος) $\mu\text{mol/L}$, υπολογισμός C_r (συγκέντρωση αντιδρώντος) και αρχικής ταχύτητας V_0 .

C_r (συγκέντρωση αντιδρώντος) υπολογίζεται από

C Αρχική συγκέντρωση αντιδρώντος στον σωλήνα - C συγκέντρωση προϊόντος στον σωλήνα

Για τον Σωλήνα 2 ισχύει:

1.61 mM- C προϊόντος =1610 μM- C προϊόντος

(προσοχή μπορεί να έχετε διαφορετική αρχική Συγκέντρωση αντιδρώντος)

Σωλήνας 2	Συγκέντρωση Προϊόντος	Συγκέντρωση Αντιδρώντως	ΔC Αντιδρώντως	t(min)	Δt	Vo
0,346	15,7	1594,3		0,25	0,25	0,0
0,405	19,0	1591,0	-3,3	0,5	0,25	-13,3
0,526	25,9	1584,1	-6,8	1	0,50	-13,6
0,642	32,4	1577,6	-6,5	1,5	0,50	-13,1
0,756	38,8	1571,2	-6,4	2	0,50	-12,9
0,872	45,4	1564,6	-6,5	2,5	0,50	-13,1
0,985	51,8	1558,2	-6,4	3	0,50	-12,7
1,098	58,1	1551,9	-6,4	3,5	0,50	-12,7
1,21	64,4	1545,6	-6,3	4	0,50	-12,6
1,32	70,6	1539,4	-6,2	4,5	0,50	-12,4

Για τον Σωλήνα 4 ισχύει:

0,32 mM- C προϊόντος =320 μM- C προϊόντος

(προσοχή μπορεί να έχετε διαφορετική αρχική Συγκέντρωση αντιδρώντος)

Σωλήνας 4	Συγκέντρωση Προϊόντος	Συγκέντρωση Αντιδρώντως	ΔC Αντιδρώντως	Vo
0,31	13,74	306,26		
0,35	16,17	303,83	-2,43	-9,7008
0,44	21,24	298,76	-5,08	-10,152
0,53	25,92	294,08	-4,68	-9,3624
0,61	30,43	289,57	-4,51	-9,024
0,69	34,89	285,11	-4,46	-8,9112
0,77	39,35	280,65	-4,46	-8,9112
0,84	43,58	276,42	-4,23	-8,46
0,91	47,69	272,31	-4,12	-8,2344
0,98	51,70	268,30	-4,00	-8,0088

Για τον Σωλήνα 6 ισχύει:

0,161 mM- C προϊόντος =161 μM- C προϊόντος

(προσοχή μπορεί να έχετε διαφορετική αρχική Συγκέντρωση αντιδρώντος)

Σωλήνας 6	Συγκέντρωση Προϊόντος	Συγκέντρωση Αντιδρώντως	ΔC Αντιδρώντως	Vo
0,212	8,16	152,84		0,00
0,230	9,17	151,83	-1,02	-4,06
0,267	11,26	149,74	-2,09	-4,17
0,304	13,35	147,65	-2,09	-4,17
0,338	15,26	145,74	-1,92	-3,84
0,342	15,49	145,51	-0,23	-0,45
0,407	19,15	141,85	-3,67	-7,33
0,438	20,90	140,10	-1,75	-3,50
0,470	22,71	138,29	-1,80	-3,61
0,501	24,46	136,54	-1,75	-3,50

Για τον Σωλήνα 8 ισχύει:

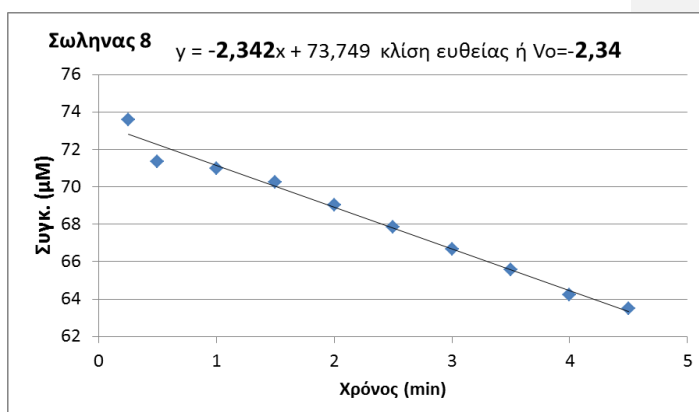
0,0805 mM- C προϊόντος =80,5 μM- C προϊόντος

(προσοχή μπορεί να έχετε διαφορετική αρχική Συγκέντρωση αντιδρώντος)

Σωλήνας 8	Συγκ. Προϊόντος	Συγκ. Αντιδρώντως	ΔC Αντιδρώντως	Vo
0,190	6,92	73,58		294,3
0,230	9,17	71,33	-2,26	-9,0
0,236	9,51	70,99	-0,34	-0,7
0,249	10,24	70,26	-0,73	-1,5
0,271	11,48	69,02	-1,24	-2,5
0,292	12,67	67,83	-1,18	-2,4
0,313	13,85	66,65	-1,18	-2,4
0,332	14,92	65,58	-1,07	-2,1
0,356	16,28	64,22	-1,35	-2,7
0,369	17,01	63,49	-0,73	-1,5

Οι ταχύτητες της ενζυμικής (και χημικής) αντίδρασης μπορούν να υπολογιστούν από την κλίση της καμπύλης $Y=a \cdot X+b$ όπου $Y =$ Συγκέντρωση και $X =$ Χρόνος, άρα για τον σωλήνα 8 ισχύει:

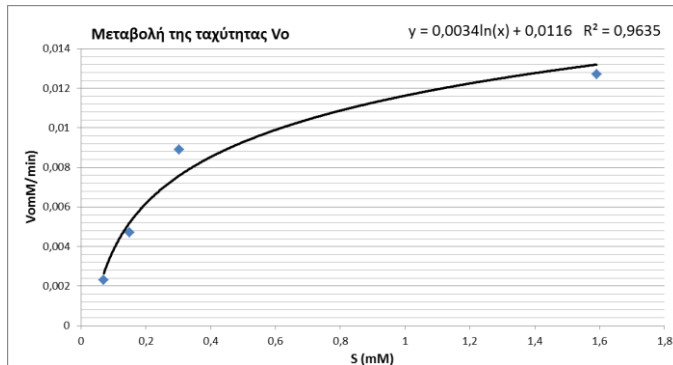
Σωλήνας	8
t(min)	Συγκ. Αντιδρόντως
0,25	73,584
0,5	71,328
1	70,9896
1,5	70,2564
2	69,0156
2,5	67,8312
3	66,6468
3,5	65,5752
4	64,2216
4,5	63,4884



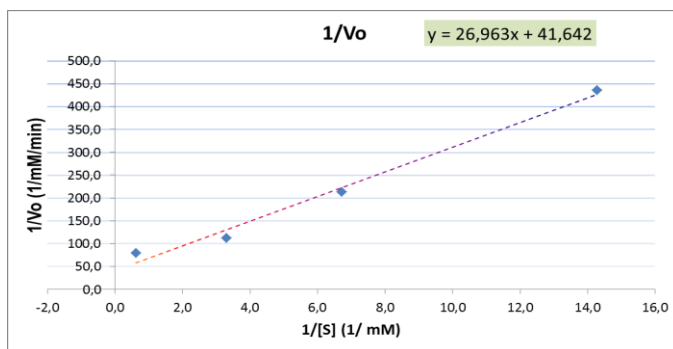
Όταν όλα τα (παραπάνω) δεδομένα είναι διαθέσιμα, μπορούμε να κατασκευάσουμε τον τελικό πίνακα με τα δεδομένα:

Σωλήνας	[S] mM	V_o [mM/min]	1/S	1/ V_o
2	1,591	0,0127	0,6	78,7
4	0,303	0,0089	3,3	112,4
6	0,149	0,0047	6,7	212,8
8	0,07	0,0023	14,3	434,8

Κατασκευάζετε έτσι ένα διάγραμμα όπου να δείχνει την μεταβολή της ταχύτητας V_o σε **mM/min (ψ άξονας)** σε σχέση με την μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος **S (χ άξονας)**.



Σχεδιάστε ένα άλλο διάγραμμα χρησιμοποιώντας τις τιμές $1/V_o$ και $1/[S]$ (Διάγραμμα Lineweaver-Burk ή του διπλού αντιστρόφου)



από αυτό υπολογίστε την V_{max} και K_M της αλκαλικής φωσφατάσης, σύμφωνα με την σχέση:

$$1/V_o = (K_m / V_{max}) \cdot 1/[S] + 1/V_{max}$$

$$Y = \alpha \cdot X + \beta$$

$$1/V_{max} = 41,6 \rightarrow V_{max} = 20,33 \text{ mM/min}$$

$$K_M / V_{max} = 26,9$$

$$K_M = 1,32 \text{ mM}$$

Προσοχή μην χρησιμοποιήσετε τις παραπάνω τιμές (είναι ενδεικτικές), χρησιμοποιήστε τις τιμές από τα δεδομένα σας!

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

Μετά από τις μετρήσεις ABS της πρότυπης καμπύλης της Νιτροφαινόλης που βρήκατε στην προηγούμενη άσκηση, έχετε τις συγκεντρώσεις με την γραμμική τάση σας από πρότυπα διαλύματα.

Λύνοντας την $y=ax+\beta$ που βρήκατε ως προς x (δηλαδή συγκέντρωση, C) έχετε $C=(Abs-\beta)/\alpha$ και παίρνουμε ένα σχήμα C προς T (χρόνος). Το α από την γραμμική τάση της καμπύλης C προς T (χρόνος) είναι ουσιαστικά το $\Delta C/\Delta t=a=U(\text{reaction})=\text{ταχύτητα αντίδρασης}$

Γνωρίζοντας ότι στις ενζυμικές αντιδράσεις $\Delta C/\Delta t=U=[S]*[E]$

$[E]=\text{Συγκέντρωση ενζύμου}$

$[S]=\text{Συγκέντρωση υποστρώματος}$

Οπότε φτιάχνετε μια νέα πρότυπη καμπύλη $Y=a*X+b$, όπου Y θα είναι οι ταχύτητες αντίδρασης $\{U=[S]*[E]$ το $[S]$ είναι παντού ίδιο εδώ (70 μ M)} από τα πρότυπα που κάνατε και θα είναι το a και το $[E]$ θα είναι το X , ο άγνωστος.

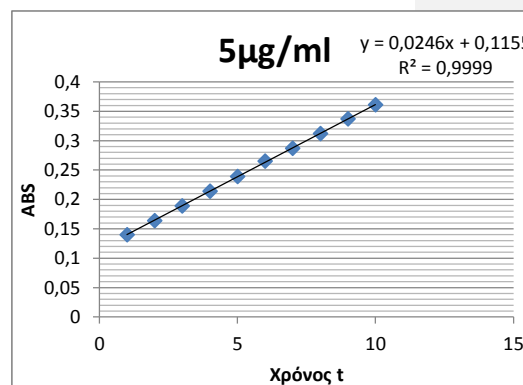
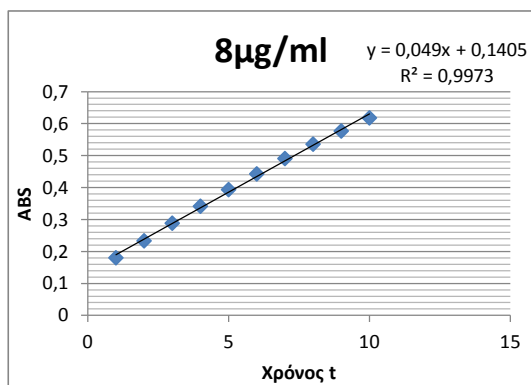
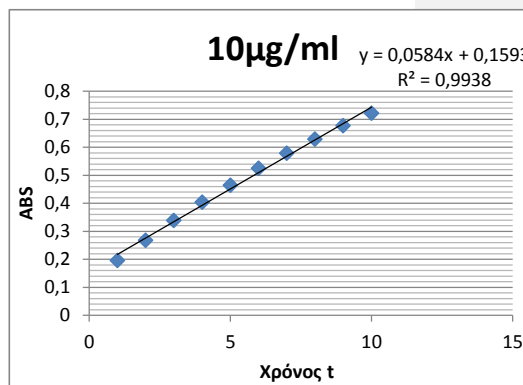
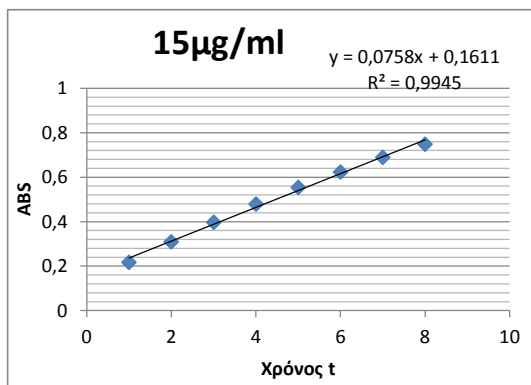
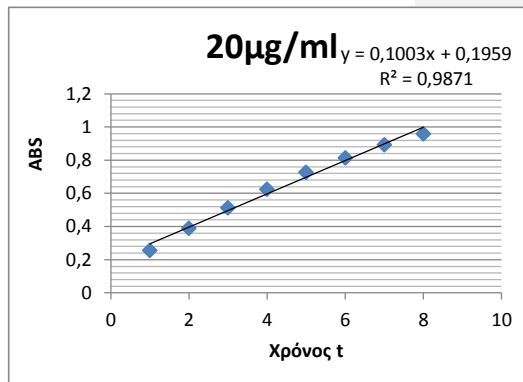
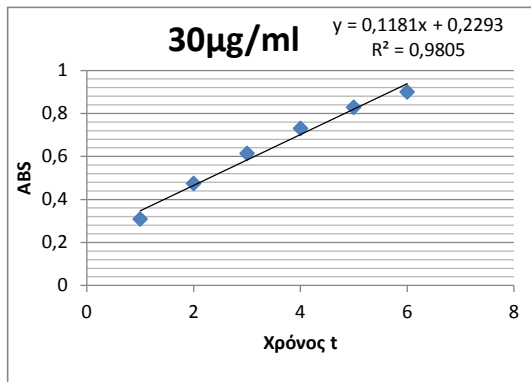
(Πολύ πιθανών να μην ξεκινάει από το 0 γιατί έχουμε και μια μικρή χημική ταχύτητα αντίδρασης επιπλέον της ενζυμικής)

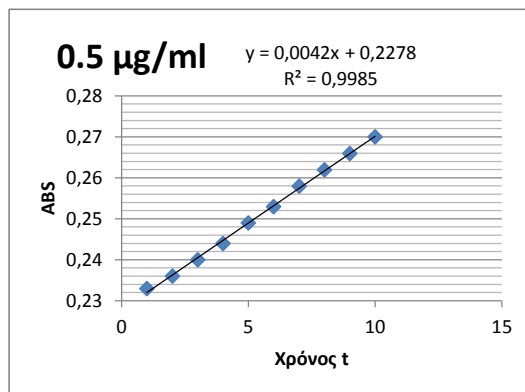
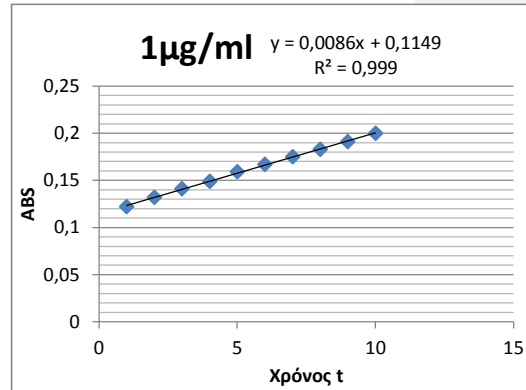
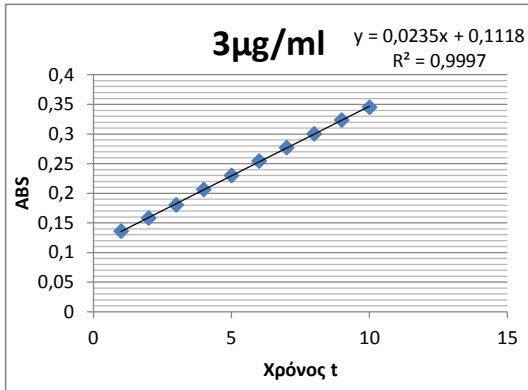
Παράδειγμα υπολογισμών:

Έστω οι χρονομετρημένες απορροφήσεις για τις διάφορες συγκεντρώσεις ενζύμων είναι:

ΧΡΟΝΟΣ (t) / ΕΝΖΥΜΟ (c)	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'
30 μ g/ml	0,309	0,474	0,615	0,73	0,829	0,9	0,978	1,034
20 μ g/ml	0,257	0,39	0,513	0,626	0,728	0,814	0,893	0,958
15 μ g/ml	0,217	0,31	0,397	0,479	0,554	0,624	0,689	0,748
10 μ g/ml	0,196	0,268	0,339	0,404	0,465	0,525	0,579	0,63
8 μ g/ml	0,18	0,233	0,288	0,341	0,394	0,443	0,491	0,536
5 μ g/ml	0,14	0,164	0,189	0,214	0,239	0,265	0,287	0,312
3 μ g/ml	0,136	0,158	0,18	0,206	0,23	0,254	0,277	0,3
1 μ g/ml	0,122	0,132	0,141	0,149	0,159	0,167	0,175	0,183
0,5μg/ml	0,233	0,236	0,24	0,244	0,249	0,253	0,258	0,262

Μεταφέροντας αυτά τα αποτελέσματα σε διαγράμματα ABS/t, θα έχουμε ενδεικτικά:





Από όλα τα παραπάνω έχω:

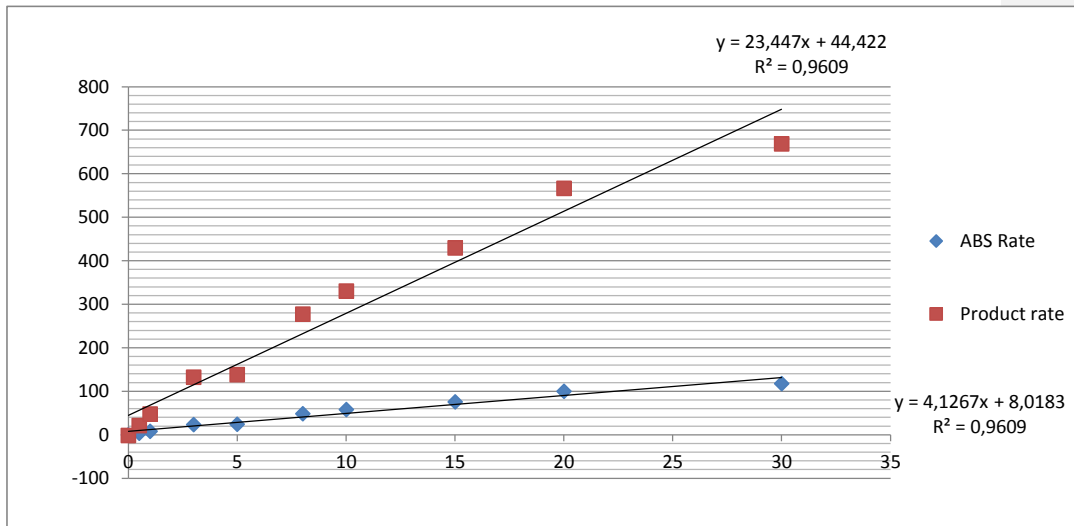
Concentration enzyme (µM)	Abs Rate	Product Rate (µg/ml)
0	0	-1,1364
0,5	4	21,5909
1	8,6	47,7273
3	23,5	132,386
5	24,6	138,636
8	49	277,273
10	58,4	330,682
15	75,8	429,545
20	100	567,045
30	118	669,318

ABS RATE= Είναι η κλίση της κάθε ευθείας R^2 δηλαδή το a

Product rate = Βγαίνει από την εξίσωση $C=(Abs-0,207)/0,178$ όπου ABS βάζετε το ABS rate, άρα βρίσκετε το προϊόν που παράγεται κατά τις μετρήσεις σας.

Εξισώσεις = Κάνετε C/P και ABS/P

Από το παραπάνω πίνακα φτιάχνουμε την νέα καμπύλη(ες) για την εύρεση συγκέντρωσης ενζύμου από την ταχύτητα δημιουργίας προϊόντος:



Προσοχή μην χρησιμοποιήσετε τις παραπάνω τιμές και χρόνους (είναι ενδεικτικές), χρησιμοποιήστε τις τιμές και τους χρόνους από τα δικά σας δεδομένα!

ΑΣΚΗΣΗ 11

ΗΜΙΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΥΛΑΣΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΟΥΡΩΝ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η πέψη του αμύλου και γλυκογόνου αρχίζει στη στοματική κοιλότητα και συνεχίζεται στο λεπτό έντερο. Στο στόμα, οι πολυσακχαρίτες αυτοί υδρολύονται (διασπώνται) σε μικρότερους πολυσακχαρίτες και μαλτόζη (δισακχαρίτης) λόγω της δράσης της **α-αμυλάσης**. Στο δωδεκαδάκτυλο, η **παγκρεατική α-αμυλάση** υδρολύει το άμυλο, το γλυκογόνο και τους μικρότερους πολυσακχαρίτες σε δισακχαρίτες. Το ένζυμο **μαλτάση** υδρολύει τη μαλτόζη σε γλυκόζη, η **σακχαράση** υδρολύει τη σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη και η **λακτάση** υδρολύει τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Τα τρία αυτά ένζυμα, καθώς και άλλα παρόμοια που δρουν πάνω σε δισακχαρίτες, ολοκληρώνουν την πέψη των υδατανθράκων στο λεπτό έντερο και τα μονομερή (μονοσακχαρίτες) είναι τώρα έτοιμα να απορροφηθούν στο αίμα. Υπενθυμίζεται ότι η κυριότερη πηγή ενέργειας για τον εγκέφαλο είναι η γλυκόζη και ότι ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να διασπάσει την κυτταρίνη γιατί δεν διαθέτει τα απαραίτητα ένζυμα (κυτταρινάσες).

Έτσι, το ένζυμο **α-αμυλάση** (EC 3.2.1.1) είναι ένα σχετικά μικρό μόριο το οποίο καθαίρεται ταχέως από τα νεφρά και απεκκρίνεται στα ούρα, όπου η συγκέντρωσή της είναι σταθερή όπως και στο αίμα. Η α-αμυλάση μετράται συχνά στη διάγνωση της οξείας παγκρεατίτιδας όπου τα επίπεδα στον ορό μπορεί να είναι αυξημένα κατά πολύ. Στην οξεία παγκρεατίτιδα η α-αμυλάση αρχίζει να αυξάνεται μετά 3-4 ώρες από την έναρξη του πόνου, τείνοντας σε μέγιστο σε 24 ώρες και παραμένοντας σε αυτά τα επίπεδα για 3-7 ημέρες. Η υπεραμυλασαιμία σχετίζεται επίσης με άλλες οξείες νεφρικές διαταραχές, διαβητική κετοξέωση, σπειραματική δυσλειτουργία, διαταραχές των σιελογόνων αδένων, εξωμήτρια κύηση και μακροαμυλασαιμία.

Οι τιμές αναφοράς ποικίλουν ανάλογα με τη μέθοδο προσδιορισμού της, π.χ. Wohlenmuth, Somoggi και Street Close, και εκφράζονται σε μονάδες ανά λίτρο, ml ή dl, αντίστοιχα, και καλύτερα σε δείγμα 24ώρου.

Αυξημένες τιμές στο αίμα μπορεί να υποδηλώνει:

- Οξεία μη αιμοραγική παγκρεατίτιδα
- Χρόνια παγκρεατίτιδα- φυσιολογικές τιμές στον ορό αλλά αυξημένες τιμές στα ούρα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ισοδυναμεί με σταδιακή καταστροφή του παγκρεατικού ιστού (ασβεστώσεις και αποφράξεις πόρων) κυρίως λόγω κατάχρησης οινοπνεύματος και συνοδεύεται από ισχυρούς πόνους.
- Ιογενή παρωτίτιδα με ή χωρίς παγκρεατίτιδα, μικροβιακές παρωτίτιδες, απόφραξη των σιελογόνων αδένων.
- Νόσους των νεφρών λόγω λήψης ναρκωτικών, χρόνιας αλκοολισμός, αντισυλληπτικά χάπια, κλπ.
- Μακροαμυλασαιμία-αύξηση της αμυλάσης στο αίμα λόγω μειωμένης κάθαρσής της (μειωμένη διήθηση λόγω σχηματισμού πρωτεϊνικού συμπλόκου μεγάλου MB).
- Εξαίρεση αποτελεί ο καρκίνος του παγκρέατος όπου δεν παρατηρείται αύξηση στις τιμές ούτε στα ούρα ούτε στο αίμα.

Ελαττωμένες τιμές αμυλάσης στο αίμα συνδέεται με:

- Βαριά εκτεταμένη νεκρωτική παγκρεατίτιδα
- Ηπατίτιδα
- Χολοκυστίτιδα
- Εγκαύματα
- Θυρεοειδοτοξίκωση
- Δηλητηριάσεις με βαρβιτουρικά, αρσενικό, τετραχλωράνθρακα κα.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Μέθοδοι προσδιορισμού

Οι μέθοδοι προσδιορισμού αμύλας κατατάσσονται στις ακόλουθες κατηγορίες ανάλογα με την αρχή τους:

- **Σακχαρογενετικές**- προσδιορίζεται το ποσό της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τη διάσπαση του αμύλου (μέθοδος Somoggi)
- **Εγχρώμων συμπλεγμάτων**-προσδιορισμός του έγχρωμου συμπλέγματος του αμύλου
- **Αμυλοκλαστικές**- προσδιορισμός του αμύλου που έμεινε μετά από δράση του ενζύμου (μέθοδος Wohlenmuth).

Μέθοδος Wohlenmuth

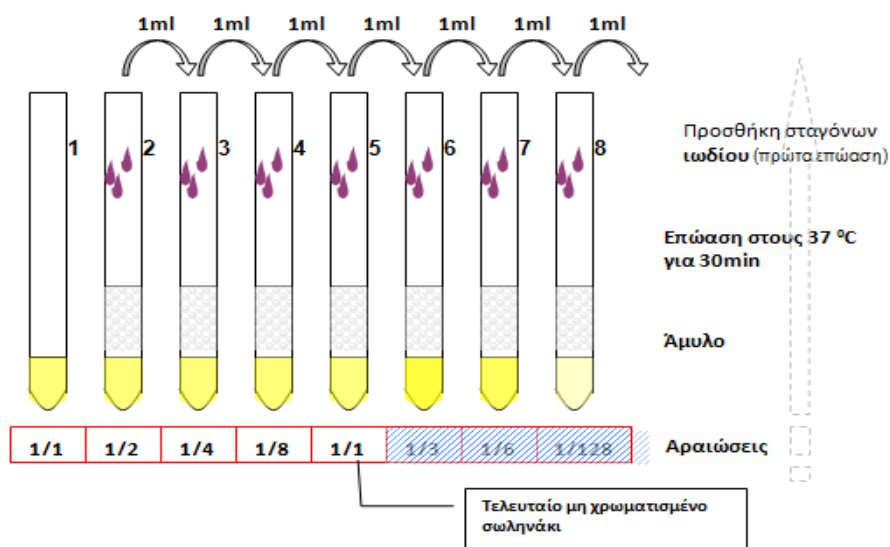
Αρχή μεθόδου

Σε διαδοχικές αραιώσεις δείγματος ούρων προστίθεται ποσότητας διαλύματος αμύλου γνωστής περιεκτικότητας και επωάζονται στους 37 °C. Όσο λιγότερη αμύλαση υπάρχει στο άγνωστο δείγμα, τόσο αδιάσπαστο άμυλο θα υπάρχει σε μεγαλύτερες αραιώσεις. Προσθήκη σταγόνων διαλύματος ιωδίου χρωματίζει εκείνα τα αραιωμένα δείγματα στα οποία μέρος του αμύλου δεν έχει διασπαστεί πλήρως. Η τελευταία-μη χρωματισμένη- αραιώση δίνει τις *μονάδες δραστηρότητας Wohlenmuth* του ενζύμου.

Αντιδραστήρια	-	Υλικά-Όργανα
Διάλυμα αμύλου 1%. (16 ml)		Δοκιμαστικοί σωλήνες (10x1.5cm) (9)
Διάλυμα ιωδίου 0.02N (3ml)		Σιφώνια πλήρωσης 1ml και 2ml (2)
Διάλυμα NaCl 0.9% (10ml)		Αυτόματος αναδευτήρας (Vortex)
		Υδατόλουτρο στους 37 °C
		Γάντια

Σε οκτώ (8) αριθμημένους δοκιμαστικούς σωλήνες (10x1.5cm) πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αραιώσεις του υπό εξέταση δείγματος όπως αυτές αναγράφονται στο παρακάτω σχήμα.

- Σε όλα τα σωληνάκια (εκτός από το 1^ο) μεταφέρεται 1ml διαλύματος NaCl 0.9%
- Στα σωληνάκια 1 (τυφλό) και 2 μεταφέρεται 1ml δείγματος ούρων.
- Μετά από ανάδευση του σωληνά 2 (αραίωσης 1:2) μεταφέρεται 1ml στο σωληνά 3 (αραίωσης 1:4).



Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας.

- Από το σωληνά 3 μεταφέρεται 1ml στο σωληνά 4 (αραίωσης 1:8) κ.ο.κ., μέχρι το σωληνά 8 (αραίωσης 1:128) από τον οποίο 1ml απορρίπτεται.
- Σε όλα τα σωληνάκια (εκτός το 1) προστίθενται 2ml διαλύματος αμύλου και μεταφέρονται σε υδατόλουτρο 37 °C για 30min ακριβώς

Τελικά μετά τις αραιώσεις έχουμε:

Αντιδραστήρια	Σωληνες								(*)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Δείγμα ούρων (ml)	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-	-
Διάλυμα NaCl 0.9%	-	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Αραιωμένο διάλυμα (n-1) σωληνά	-	-	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Άμυλο 1‰ (ml)	-	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	-
Αραιώσεις	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	-

* η αραιωση αυτή φυλάσσεται σε περίπτωση μη επάρκειας της 1:128 αραιωσης

- Μετά το πέρας του χρόνου επώασης τα σωληνάκια ψύχονται σε νερό βρύσης.
- Σ όλα τα σωληνάκια προστίθενται **1-2 σταγόνες** διαλύματος ιωδίου.
- Παρατηρήστε τις πιθανές χρώσεις των διαλυμάτων.

Στο σωληνάριο 2 το άμυλο θα έχει διασπασθεί από τα φυσιολογικά ποσά αμυλάσης των ούρων και επομένως **δεν** θα εμφανίσει χρώμα. Όσο λιγότερη αμυλάση υπάρχει στο άγνωστο δείγμα τόσο *μη διασπασθέν άμυλο* θα υπάρξει στις *μεγαλύτερες αραιώσεις*, αφού όπως είναι γνωστό σχηματίζεται το μπλε-ιώδες σύμπλοκο του **αμύλου-Ι₂**.

Το **τελευταίο σωληνάριο** που δεν χρωματίζεται περιέχει την αραιώση των ούρων που εκφράζει το ποσό της αμυλάσης σε μονάδες Wohlgemuth. Έτσι, αν το σωληνάκι αυτό είναι το 5 (αραιώση 1:16), τότε θα έχουμε 16 μονάδες Wohlgemuth ή 1600 IU/L.

Τιμές αναφοράς για:

- Ορό αίματος: <32 μονάδες Wohlgemuth ή 3200 U/L
- Ούρα: 8-64 μονάδες Wohlgemuth ή 800-6400 U/

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

1. Καταγράψτε την μέτρηση που κάνατε και αιτιολογήστε.

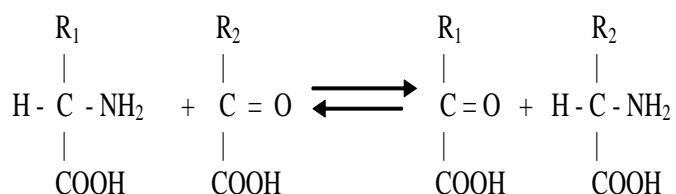
ΑΣΚΗΣΗ 12

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

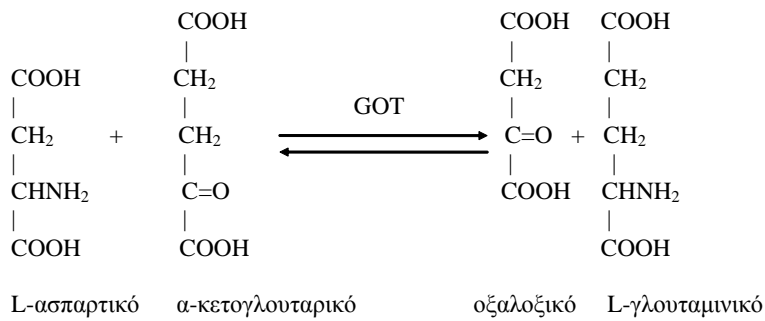
Τρανσαμινάσες

Οι τρανσαμινάσες (ή αμινοτρανσφεράσες ή αμινομεταφοράσες) είναι μία κατηγορία ενζύμων που καταλύουν την μεταφορά μιας αμινομάδας από ένα α-αμινοξύ σε ένα α-κετοξύ, παράγοντας το αντίστοιχο α-κετοξύ και α-αμινοξύ κατά την αντίδραση:



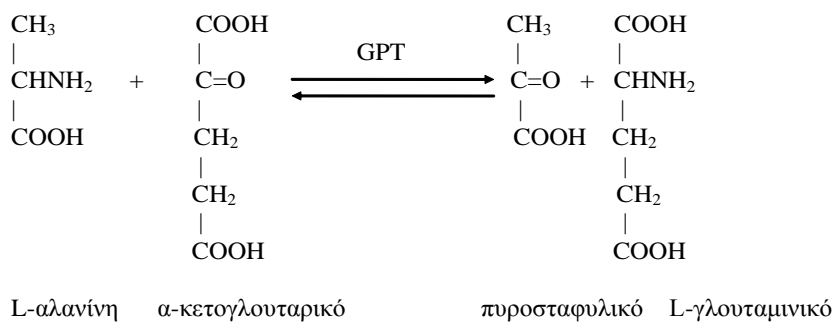
Είναι γνωστός ένας μεγάλος αριθμός τρανσαμινασών. Όλες χρησιμοποιούν σαν συνένζυμο την φωσφορική πυριδοξάλη (βιταμίνη B₆) και οι περισσότερες χρησιμοποιούν το α-κετογλουταρικό ως δέκτη των αμινομάδων. Δύο ένζυμα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον από την σκοπιά της κλινικής χημείας: Η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (αμινομεταφοράση) ή γλουταμινική-οξαλοξική τρανσαμινάση (**GOT** ή **AST**) και η αμινοτρανσφεράση (αμινομεταφοράση) της αλανίνης ή γλουταμινική-πυροσταφυλική τρανσαμινάση (GPT ή ALT). Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται σε όλους τους ιστούς αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ήπαρ, καρδιακούς και σκελετικούς μύς και νεφρούς. Όταν ένας ιστός υποστεί βλάβη ή νέκρωση των κυττάρων επιτρέπει την είσοδο των τρανσαμινασών αυτών στο αίμα κι έτσι η συγκέντρωσή τους στον ορό αυξάνεται πάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα (3-20 IU/l). Σύγκριση της αύξησης SGOT/SGPT (S: Serum) είναι ενδεικτική του οργάνου που υπέστη βλάβη.

Η **GOT** καταλύει την αντίδραση:



Η ενεργότητα του ενζύμου αυτού στον ορό αυξάνεται σε ηπατικές παθήσεις (οξεία ηπατίτιδα, κίρρωση, καρκίνωμα, αποφρακτικός ίκτερος), καρδιακές παθήσεις (έμφραγμα του μυοκαρδίου, αρρυθμία, περικαρδίτιδα) και σε άλλες περιπτώσεις (νεφρική ή πνευμονική εμβολή, μυϊκή δυστροφία κλπ). Χαρακτηριστική είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της GOT στον ορό 24-48 ώρες μετά από έμφραγμα, καθώς και η αύξηση της GOT και της GPT στην οξεία ηπατίτιδα.

Η **GPT** καταλύει την αντίδραση:



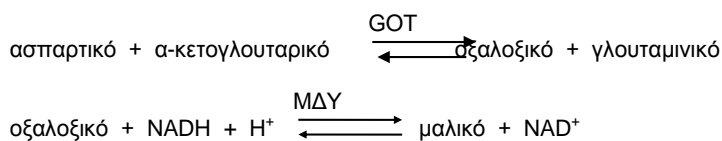
Η ενεργότητα του ενζύμου αυτού στο ορό αυξάνει κυρίως σε ηπατοχολικές παθήσεις.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Θα προσδιορίσετε την ενεργότητα των δύο τρανσαμινασών (GOT και GPT) σε δείγμα ορού που σας δίνεται.

1) Χρωματομετρικός προσδιορισμός της GOT

Αρχή: Η δραστικότητα του ενζύμου θα προσδιοριστεί με τη χρήση δύο συζευγμένων αντιδράσεων και την μέτρηση της ελάττωσης της ανηγμένης μορφής του συνενζύμου NAD^+ . Στις συζευγμένες αντιδράσεις το προϊόν του πρώτου ενζύμου αποτελεί το υπόστρωμα του δεύτερου. Το οξαλοξικό, που παράγεται από το ασπαρτικό με την δράση της GOT, μετατρέπεται σε μαλικό με την δράση της μαλικής δεϋδρογονάσης, παρουσία NADH . Στις συζευγμένες αυτές αντιδράσεις η ταχύτητα μετατροπής του NADH σε NAD^+ είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της GOT στο δείγμα.



Η ποσότητα του NAD^+ μπορεί να υπολογιστεί από την μείωση της απορρόφησης του NADH στα 340nm.

Τεχνική:

Σε ένα φωτομετρικό σωλήνα τοποθετήστε 0,3ml ορού και 3,0ml αντιδραστήριου. Ως τυφλό χρησιμοποιήστε απεσταγμένο νερό. (Το αντιδραστήριο, που έρχεται έτοιμο σε kit, περιέχει σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα τα υποστρώματα ασπαρτικό και α -κετογλουταρικό, το ένζυμο μαλική δεϋδρογονάση και το NADH). Αναδεύστε το περιεχόμενο του σωλήνα και μετρήστε την απορροφητικότητα του δείγματος στα 340nm ακριβώς μετά από 1, 2, 3 και 4 λεπτά. Υπολογίστε την ΔA 340nm/min. (Αν είναι μεγαλύτερη από 0,16 αραιώστε τον ορό 1:5 με 0,9% NaCl και επαναλάβετε την μέτρηση).

Υπολογισμός ενεργότητας GOT

$U/l = 1746 \times \Delta A_{340nm}/min$

$\mu Kat/l = 29,11 \times \Delta A_{340nm}/min$

Φυσιολογικές τιμές (στους 25°C)

Άνδρες : έως 18 U/l ή έως 0,3 $\mu Kat/l$

Γυναίκες : έως 15 U/l ή έως 0,25 $\mu Kat/l$

2) Χρωματομετρικός προσδιορισμός της GPT

Είναι παρόμοιος της GOT με την διαφορά ότι το πυροσταφυλικό, που παράγεται από την αλανίνη με την δράση της GPT, μετατρέπεται σε γαλακτικό με την δράση της γαλακτικής δεϋδρογονάσης παρουσία NADH. Ακολουθήστε την ίδια τεχνική (προσθήκη 3,0ml αντιδραστήριου σε 0,3ml ορού και μέτρηση της A στα 340nm μετά από 1, 2, 3 και 4 λεπτά) και υπολογίστε την ενεργότητα της GPT όπως πριν.

Φυσιολογικές τιμές (στους 25°C)

Άνδρες : έως 22 U/l ή έως 0,36 $\mu Kat/l$

Γυναίκες : έως 17 U/l ή έως 0,28 $\mu Kat/l$

Σημείωση:

U(IU) = Διεθνής μονάδα = ποσό ενζύμου που προκαλεί την μετατροπή 1,0 $\mu mole$ υποστρώματος ανά λεπτό στους 25°C.

1 μικρό – katal (μk) = ποσό ενζυμικής ενεργότητας που μετατρέπει ένα $\mu mole$ υποστρώματος σε ένα δευτερόλεπτο, κάτω από συνθήκες ενζυμικού κορεσμού. Εκφράζεται σε $\mu mole \cdot sec^{-1}$

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ - ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ημερομηνία:/...../201...

Ομάδα: _ _ _ _ _ Μέλη της ομάδας: 1)
2)
3)
4)

1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ GOT:

min	A _{340nm} ορού
1	
2	
3	
4	

$\Delta A_{340} / \text{min} =$
Ενεργότητα GOT:
U / ml =
 $\mu\text{Kat} / \text{l} =$

1. Ποιος είναι ο ρόλος της μαλικής δεϋδρογονάσης σ' αυτή την αντίδραση;

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ GPT:

min	A _{340nm} ορού
1	
2	
3	
4	

$\Delta A_{340} / \text{min} =$
Ενεργότητα GPT:
U / ml =
 $\mu\text{Kat} / \text{l} =$

2. Ποιος είναι ο ρόλος της γαλακτικής δεϋδρογονάσης σ' αυτή την αντίδραση;

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

	GOT		GPT	
	U/l	$\mu\text{Kat/l}$	U/l	$\mu\text{Kat/l}$
ΟΡΟΣ				

ΑΣΚΗΣΗ 13

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ - ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ουρία

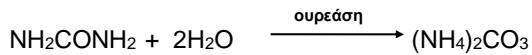
Η ουρία είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού του αζώτου στον άνθρωπο και στους άλλους ουριοτελικούς οργανισμούς. Η ουρία συντίθεται στο ήπαρ σε ένα κυκλικό δρόμο (κύκλος ουρίας) όπου δύο αμινομάδες, που προέρχονται από αμινοξέα (με την μορφή αμμωνίας και ασπαρτικού), ενώνονται με ένα μόριο CO₂ και εξέρχεται ένα μόριο ουρίας. Έτσι η αμμωνία, μια τοξική ένωση που παράγεται κατά τον καταβολισμό αζωτούχων ενώσεων, μετατρέπεται σε μία μη τοξική, υδατοδιαλυτή ένωση που μεταφέρεται με την κυκλοφορία από το ήπαρ στους νεφρούς και αποβάλλεται με τα ούρα.

Η συγκέντρωση της ουρίας στον ορό του αίματος είναι φυσιολογικά 15-50mg/dl, αλλά αυξάνεται σε διάφορες προνεφρικές (καρδιακή ανεπάρκεια, shock), νεφρικές, ή μετανεφρικές παθήσεις (απόφραξη ουρητήρων). Όταν υπάρχει βαρεία βλάβη των ηπατοκυττάρων τότε παρατηρείται ελάττωση της ουρίας στον ορό του αίματος. Επομένως τα επίπεδα της ουρίας στο αίμα αντικατοπτρίζουν την λειτουργικότητα διαφόρων οργάνων (ήπατος, νεφρών κτλ).

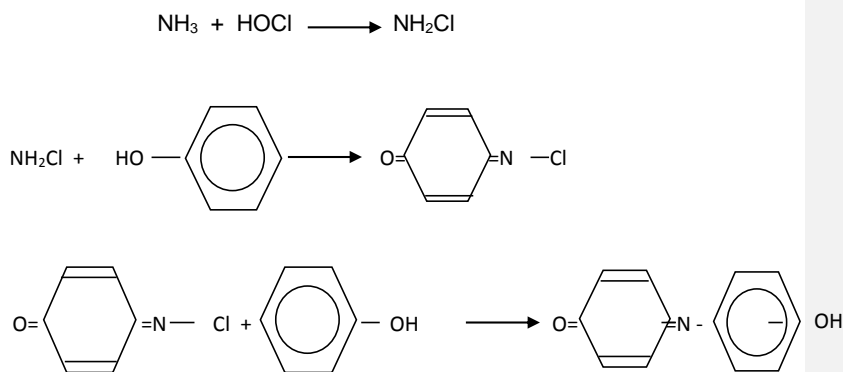
3) Ποσοτικός προσδιορισμός της ουρίας στον ορό

(Μέθοδος Berthelot)

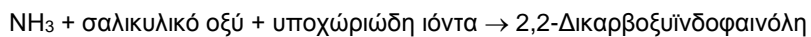
Για τον προσδιορισμό της ουρίας χρησιμοποιούνται δύο είδη μεθόδων, χημικές ή ενζυμικές. Η χημική μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των αμινομάδων της ουρίας με τις κετομάδες της διακετυλομονοξίμης και τη δημιουργία ενός έγχρωμου προϊόντος. Επειδή η αντίδραση αυτή δεν είναι ειδική για την ουρία προτιμάται η μέθοδος κατά την οποία το ένζυμο ουρεάση υδρολύει την ουρία προς ανθρακικό αμμώνιο:



Τα ιόντα αμμωνίου αντιδρούν με υποχλωριώδες νάτριο και φαινόλη, παρουσία νιτροπρωσσικού νατρίου, παράγοντας ινδοφαινόλη. Η ένωση αυτή σε αλκαλικό περιβάλλον έχει μπλέ χρώμα, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουρίας στον ορό. Οι αντιδράσεις είναι οι ακόλουθες:



Η μέθοδος που θα χρησιμοποιήσουμε εργαστηριακά προέρχεται από μια τροποποίηση της μεθόδου Berthelot, όπου η εξαιρετικά τοξική φαινόλη έχει αντικατασταθεί από το σαλικυλικό οξύ. Έτσι, η ουρία υδρολύεται παρουσία ουρεάσης ενώ ταυτόχρονα εκλύονται αμμωνία (NH_3) και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2). Τα ιόντα του αμμωνίου αντιδρούν με το μίγμα σαλικυλικού, νιτροπρωσσικού νατρίου και υποχλωριωδών και δημιουργείται το χρωμοφόρο πράσινο σύμπλοκο, σύμφωνα με την αντίδραση:



Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της ουρίας στο δείγμα μας.

Εναλλακτικά η συγκέντρωση της ουρίας στο αίμα μετράται με τη μορφή του **BUN** (*Blood Urea Nitrogen*).

Μέθοδος:

Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες φωτόμετρου τοποθετήστε τα κάτωθι:

Αντιδραστήρια	Σωλήνας	Σωλήνας	Σωλήνας
	1	2	3
	(T)	(Π)	(Δ)
Reagent 1	2ml	2ml	2ml
Standard ουρίας 80mg%	--	20μl	--
Ορός	--	--	20μl
Ουρεάση	20μl	20μl	20μl

Ανακινήστε τα σωληνάρια και επωάστε για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια τοποθετήστε τα εξής αντιδραστήρια:

	1	2	3
Reagent 2	2ml	2ml	2ml

Ανακινήστε μετά την προσθήκη του τελευταίου διαλύματος και επωάστε τα σωληνάρια άλλα 10'(λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου. Μετρήστε την A του δείγματος και του προτύπου έναντι του τυφλού σε μήκος κύματος 580nm.

Υπολογισμός:

Οι τιμές της ουρίας στον ορό υπολογίζονται ως εξής:

$$\frac{A_{580} \text{ δείγμα}}{A_{580} \text{ Standard Ουρίας}} \times 80 = \text{mg ουρίας/100ml (mg\%)}$$

Για τον υπολογισμό του **αζώτου που βρίσκεται στο αίμα με τη μορφή ουρίας** "BUN" (σε mg/dl) πολλαπλασιάζουμε τα mg/dl ουρίας με το 0,466 (Το standard δείγμα Ουρίας του kit περιέχει 80mg/dl Ουρία, 37,28mg/dl και 0,095% Αζίδιο του Νατρίου).

Φυσιολογικές τιμές:

Για την Ουρία: 15-50 mg/dL (2,5-8,25 mmol/L)

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ - ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ημερομηνία:/...../201...

Ομάδα: _____ Μέλη της ομάδας: 1)
2)
3)
4)

1. Υπολογίστε την τιμή της ουρίας από το δείγμα που πείρατε

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ (Μέθοδος Berthelot)

	A_{580}
Ορός	

Υπολογισμός:
mg % =
mmol / L =

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

	Ουρία	
	mg%	mmol/L
ορός		

2. Σχολιάστε τα αποτελέσματά σας

ΑΣΚΗΣΗ 14

ΔΙΑΔΥΚΤΙΟ ΚΑΙ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

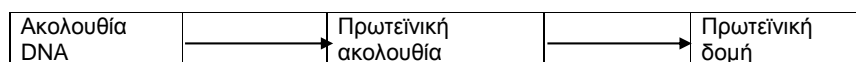
Οι βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων περιέχουν στοιχεία και πληροφορίες σχετικά με την ομολογία, τις συντηρημένες περιοχές και τα βιολογικά χαρακτηριστικά που αφορούν τη δομή-λειτουργία τους και τις φυσικοχημικές παραμέτρους τους.

Όπως είναι ήδη γνωστό το αρχείο πληροφοριών κάθε οργανισμού εντοπίζεται στο γενετικό του υλικό δηλαδή το DNA ή το RNA σε μερικούς ιούς. Οι πληροφορίες αυτές μεταφράζονται σε δομικές και λειτουργικές μονάδες, τις πρωτεΐνες, ο ρόλος των οποίων είναι αναμφισβήτητης σημασίας από τους μύες, τα ένζυμα, οι υποδοχείς και τα αντισώματα.

Παρά το ενιαίο και την ομοιομορφία των οργανισμών κατά προσέγγιση, η ποικιλότητα των πρωτεϊνών αποτυπώνεται τόσο στην αλληλουχία των αμινοξέων (1^{ανής} δομή) όσο και στην τρισδιάστατη διαμόρφωση τους (3^{ανής} δομή). Αυτό οφείλεται στο ότι η αμινοξική ακολουθία είναι αυτή που υπαγορεύει τη διάταξη αυτών στο χώρο *δημιουργώντας* τη μια ενιαία *φυσιολογική κατάσταση δομής* (native state), η οποία λαμβάνεται αυθόρμητα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.

Η λογική εξήγηση αυτής της σχέσης προκύπτει από τη μετάφραση των ακολουθιών του DNA βάση του, σχεδόν καθολικού, γενετικού κώδικα ο οποίος αντιστοιχεί *τριπλέτες* βάσεων του DNA με αμινοξέα. Παρόλα αυτά η αυθόρμητη διαμόρφωση των πρωτεϊνών στο χώρο είναι ακόμη ένα υπό μελέτη φαινόμενο, με πιθανό ένα δρόμο στον οποίο οι σωστά επιτευχθείσες δομικές περιοχές να *κρατούνται* ενώ οι λανθασμένες να επαναδιατάσσονται έως ότου επιτευχθεί η απόλυτα λειτουργική, σε χρόνους πολύ μικρούς σε σύγκριση με μια αντίθετη πορεία (*παράδοξο του Levinthal*). Η δημιουργία του, ακριβών διαστάσεων,

ενεργού κέντρου των ενζύμων είναι το κομβικό σημείο της εξειδικευμένης επαφής τους με τα αντίστοιχα υποστρώματα. Αυτό απεικονίζεται διαγραμματικά ως εξής:



Η ανάλυση των δεδομένων των παραπάνω διαδικασιών είναι το αντικείμενο δραστηριότητας της βιοπληροφορικής.

Βάσεις δεδομένων

Πρόκειται για ένα αρχείο πληροφοριών οργανωμένο και δομημένο με τέτοιο τρόπο ώστε με τη χρήση των κατάλληλων εργαλείων να εξασφαλίζεται η πρόσβαση για μελέτη και άντληση πληροφοριών τόσο από ερευνητές όσο και από κάθε ενδιαφερόμενο για το αντικείμενο αυτό. Στον τομέα μας οι βάσεις δεδομένων καλύπτουν τα σημαντικότερα βιομόρια δηλαδή τα νουκλεϊκά οξέα, τις πρωτεϊνικές ακολουθίες, μακρομοριακές δομές και λειτουργίες.

Οι τρεις μεγαλύτερες βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών ακολουθιών που είναι διαθέσιμες στους χρήστες είναι οι: *GENBANK (NCBI)*, *DNA Data Bank of Japan (DDBJ)* και *EMBL Nucleotide Sequence Data Base (EBI)*.

Η **GENBANK** εποπτεύεται από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των Η.Π.Α. και η κύρια πηγή εμπλουτισμού των δεδομένων της είναι η απευθείας υποβολή αυτών από ερευνητές, με τακτική επανεξέταση τόσο των κατατεθειμένων όσο και των προτεινομένων.

Η **DNA Data Bank of Japan (DDBJ)** ιδρύθηκε το 1986 στο Εθνικό Ινστιτούτο Γενετικής (NIG) και είναι η μοναδική διεθνώς αναγνωρισμένη βάση νουκλεοτιδικών ακολουθιών στην Ιαπωνία και η κύρια πηγή άντλησης δεδομένων στις ερευνητικές εργασίες των Ιαπώνων επιστημόνων.

Η **EMBL Nucleotide Sequence Data Base (EBI)** είναι η μεγαλύτερη βάση DNA δεδομένων στην Ευρώπη και εποπτεύεται από το Ευρωπαϊκό Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας (EMBL) με έδρα το Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (EBI) στο Cambridge, UK. Τα δεδομένα προέρχονται από ανεξάρτητα ερευνητικά εργαστήρια.

Οι ανωτέρω τράπεζες δεδομένων βρίσκονται σε συνεργασία και έχουν δημιουργήσει την *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*. Πρόκειται για μια συνεργασία που αφορά στην καθημερινή ανταλλαγή πληροφοριών, στη θέσπιση κοινών κανόνων ταξινόμησης και στο σχολιασμό των δεδομένων. Οι ηλεκτρονικές διευθύνσεις αυτών είναι:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<http://www.ebi.ac.uk/embl/>

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Βάσεις δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών και ανάλυσης ακολουθιών

Οι πιο σημαντικές βάσεις πρωτεϊνικών ακολουθιών είναι:

Η **SWISS-PROT** <http://www.uniprot.org/>

Η **Protein Information Resource PIR** <http://pir.georgetown.edu/> και

Η **PROSITE** <http://www.expasy.ch/prosite>.

Από αυτές η πρώτη εδρεύει στο Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (European Bioinformatics Institute) και είναι συνδεδεμένη με άλλες 60 τράπεζες. Η δεύτερη βρίσκεται στο πανεπιστήμιο του Georgetown που είναι τμήμα του Εθνικού Ιδρύματος Βιοϊατρικής Έρευνας (NBRF) των Η.Π.Α. και περιέχει στοιχεία και σχόλια σχετικά με τις πρωτεϊνικές ακολουθίες. Τέλος, η PROSITE είναι βάση ταξινόμησης σε οικογένειες πρωτεϊνικών ακολουθιών και αυτοτελών περιοχών ακολουθιών (sequence domains).

Επίσης βάση δεδομένων σχετική με την εύρεση-σύγκριση δομής:

Η **Protein Data Bank (PDB)**, <http://www.rcsb.org>

Η PDB (1971) αποτελεί τη μοναδικά βάση παγκοσμίως η οποία διαθέτει τρισδιάστατες δομές βιολογικών μακρομορίων. Τα εγγραφόμενα μόρια συνοδεύονται από τις συντεταγμένες των ατόμων τους καθώς και από βιβλιογραφικές αναφορές, λεπτομέρειες για τον προσδιορισμό της δομής και στοιχεία που προκύπτουν από αυτήν. Μετά από αυστηρό έλεγχο ορθότητας στοιχείων η δομή ταξινομείται και εντάσσεται στη βάση.

Ολοκληρωμένα συστήματα ανάκτησης πληροφοριών από βάσεις δεδομένων

Το SRS είναι ένα πολύ ισχυρό σύστημα διαχείρισης δεδομένων που δίνει τη δυνατότητα ανάκτησης δεδομένων από 400 βάσεις.

Το Entrez, απ' την άλλη μεριά, δίνει τη δυνατότητα αναζήτησης και ανάκτησης πληροφοριών από όλες τις βάσεις δεδομένων που περιέχονται στο NCBI (National Center for Biotechnology Information) των Η.Π.Α. περιλαμβάνοντας νουκλεοτιδικές και πρωτεϊνικές ακολουθίες, δομές βιομορίων, γονιδιομάτων και αναζήτηση βιβλιογραφίας MEDLINE.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εύρεση πρωτοταγούς ακολουθίας

Έχοντας στη διάθεσή σας την αμινοξική ακολουθία συγκεκριμένου πεπτιδίου καλείστε με την βοήθεια των εργαλείων της βιοπληροφορικής, που είναι διαθέσιμα τόσο στις βάσεις δεδομένων όσο και στα ολοκληρωμένα συστήματα ανάκτησης πληροφοριών από τις βάσεις να αντλήσετε πληροφορίες σχετικά:

- a) Την ακολουθία του δεδομένου ενζύμου
- b) Τις χημικές αντιδράσεις που καταλύει
- c) Την εύρεση της DNA ακολουθίας που το κωδικοποιεί
- d) Πιθανές λειτουργίες
- e) Χαρακτηριστικά δομής
- f) Φυσικοχημικές παράμετροι κλπ.

I. Αναζήτηση πρωτεϊνικής ακολουθίας και εύρεση ομολογίας στους δικτυακούς τόπους:

<http://www.uniprot.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Ακολουθείστε τα ακόλουθα βήματα αφού επιτύχετε **πρόσβαση** στον παγκόσμιο ιστό (**World Wide Web**) με τη βοήθεια ενός φυλλομετρητή (Browser), π.χ. Internet Explorer ή Mozilla Firefox.

Μέρος A

➤ Στο πεδίο εισαγωγής διευθύνσεων του φυλλομετρητή **πληκτρολογείτε** τη διεύθυνση <http://www.uniprot.org/> και πιέζετε *Enter*.

➤ **Επιλογή** τράπεζας δεδομένων (πάνω αριστερά) – Protein Knowledgebase (UniProtKB) και πληκτρολογείτε στο πάνω δεξιά παράθυρο “Query” το όνομα της κινάσης (πρωτεΐνης) σερίνης/θρεονίνης για την οποία αναζητούμε πληροφορίες “**SIK1_MOUSE**” (διαμορφώνει την εκλεκτικότητα και καταλυτική ενεργότητα του υποστρώματος, όπως επίσης και κατευθύνει το καταλυτικό ένζυμο σε συγκεκριμένο υποκυτταρικό χώρο).

➤ Στην αρχή της σελίδας επιλέγουμε το εικονίδιο “Quick BLASTlastP search” (default and go) μετά από αναζήτηση (δεπτερόλεπτα ή λεπτά) στη τρίτη σειρά εμφανίζονται → “Clusters with 100%, 90%, 50% identity” μπορούμε να βρούμε συγκριτικό κατάλογο πρωτοταγούς ακολουθίας της **SIK1_MOUSE** με άλλες όμοιες ή ομόλογες σε διαφορετικά ποσοστά κάθε φορά πρωτεΐνες.

➤ **Επιστροφή** στην αρχική σελίδα της (ένα πίσω).

➤ Προς το τέλος της ιστοσελίδας στο πεδίο **Sequences** Κάντε «κλικ» (κάτω δεξιά) στην ένδειξη «**FASTA**».

➤ Εμφανίζεται σε μορφή γραμμάτων η πρωτοταγής ακολουθία της πρωτεΐνης. **Αποθήκευση και διατήρηση** της ακολουθίας (στο word) για την αναζήτηση πληροφοριών και σε άλλες βάσεις δεδομένων.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: Όχι Έντονα, Όχι Πλάγια

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: Όχι Έντονα, Όχι Πλάγια

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: Όχι Έντονα, Όχι Πλάγια

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Μέρος Β

Στο πεδίο εισαγωγής διευθύνσεων του φυλλομετρητή **πληκτρολογείτε** τη διεύθυνση

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

και επιλέγετε **protein blast** (Search protein database using a protein query)

- **Επικολλάτε** την ακολουθία της **SIK1_MOUSE** σε *FASTA format* στο κενό πεδίο του προγράμματος.
- Επιλέγετε στο Choose Search Set το **nr (non redundant)** και στο Program Selection το blastp και πατάτε το εικονίδιο **BLAST** ➔ και την επιλογή **Show results in a new window**
- **Κάνετε «κλικ»** στην ράβδο με ένδειξη **“Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results”**.
- **“Formatting options”** (αρχική ράβδος πάνω δεξιά) σας οδηγεί σε σελίδα με σχηματική απεικόνιση ομόλογων πρωτεϊνών όσο και σε συγκρίσεις που έγιναν σε επίπεδο αμινοξέων.
- Στην αρχική σελίδα με τα αποτελέσματα βρίσκονται όλες οι πρωτεΐνες προς τα Άντληση πληροφοριών. Η πρώτη πρωτεΐνη είναι αυτή με την μεγαλύτερη ομοιότητα (100%) ακολουθούμενη από την δεύτερη (99%) κ.ο.κ. Επικεφαλίδες στην αριστερή πλευρά της σελίδας της, π.χ. όνομα, οργανισμός απομόνωσης κλπ.

II. Ανάλυση πρωτοταγούς ακολουθίας και άντληση στοιχείων

➤ **Πληκτρολογήστε** στο πεδίο εισαγωγής διευθύνσεων του φυλλομετρητή τη διεύθυνση: <http://www.expasy.ch/tools/> (είναι ένα ολοκληρωμένο σύστημα ανάκτησης πληροφοριών από βάσεις δεδομένων sequence analysis tools).

➤ **Επιλέγετε** από το Other prediction or characterization tools **(τέταρτη ομάδα στην σειρά)** το « **ProtParam** ».

➤ αφού επικολλήσετε την ακολουθία **SIK1_MOUSE** σε FASTA format όπως την υποθηκεύσατε παραπάνω **«Compute Parameters»**

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ., Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ., Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ., Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ., Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ., Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ., Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ., Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 στ.

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Ηνωμένων Πολιτειών)

Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Ηνωμένων Πολιτειών)

Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Ηνωμένων Πολιτειών)

Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Ηνωμένων Πολιτειών)

Προσοχή! Εισάγετε μόνο την αμινοξική ακολουθία *χωρίς* τις αρχικές ενδείξεις που τη συνοδεύουν >Q15...., δηλαδή τους έντονους χαρακτήρες:

```
>sp|Q60670|SIK1_MOUSE Serine/threonine-protein kinase SIK1 OS=Mus
musculus GN=SiK1 PE=1 SV=3
MVIMSEFSAVPSGTGQQQKPLRVGFYDVERTLGKGNFAVVKLARHRVTKTQVAIKIIDK
TRLDSNLEKIYREVQLMKLLNHPNIIKLYQVMETKDMLYIVTEFAKNGEMFDYLTSNHG
LSENEARQKFWQILSAVEYCHNHHIVHRDLKTENLLLDNSMDIKLADFGFGNFYKPGPEL
STWCGSPPYAAPEVFEKGEYEGPQLDVWVSLGVVLYVLCGSLPFDGPNLPTLRQVLEGR
FRIPFFMSQDCETLIRMLVVDPAKRITIAQIRQHRWQADPTLLQDDPAFDMQGYTSN
LGDYNEQVLGIMQALGIDRQRTIESLQNSSYNHFAATYYLLERLKEHRSAQSSRPTPA
PTRQPQLRSSDLSSLEVPQEILPCDPFRPSLLCPQPQALAQSVLQAEIDCDLHSSLQPLL
FPLDTNCSGVFRHRSISPSLLDTAISEEARQGPSLEEEQEVQEPFGSTGRRHTLAEVS
THFSPLNPPCIIVSSSATASPSEGTSSDCLPFSASEGPAGLGSGLATPGLLGTSSPVRL
ASPFLGSQSATPVLTQAGLGTAVLPPVSFQEGRRASDTSLTQGLKAFRQQLRKNARTKG
FLGLNKIKGLARQVCQSSVRTPRGGMSTFHTPAPSSGLQGC'TSNREGRSILLEEV LHQQR
LLQLQHSSSTAASSGCQQGPQLSPVPVYLAPCDLIVSGIPLLP'PLLQAGMSPVASAA
HLLDTHLHISAGPVALPTGFLPQCLTRLSPGCDPAGLPQGDCEMEDLTSGQRGTFVLVQ
```

Γ. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ-ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Θα δοθεί σε κάθε ομάδα το όνομα μιας πρωτεΐνης και θα πρέπει να βρείτε τις παρακάτω πληροφορίες.

1. Την ταξινόμηση της, τη λειτουργία της, ποιος ο βιολογικός ρόλος της (function), που τη συναντάμε (οργανισμό, ιστό).
2. Να αναφέρετε το ισοηλεκτρικό σημείο και το M. B. της πρωτεΐνης.
3. Να αναφέρετε πόσο σταθερή είναι η πρωτεΐνη (Estimated half-life);
4. Να αναφέρετε τα ολικά θετικά και αρνητικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα.
5. Να αναφέρετε το είδος, τον αριθμό και την αναλογία των ατόμων που δομούν το πρωτεϊνικό μόριο-μοριακός τύπος.
6. Ποια η συγκέντρωση διαλύματός με απορρόφηση 0.24, σε κυψελίδα του 1cm;

θα ακολουθείσθε τα ίδια βήματα και την ίδια πορεία όπως και στην πρωτεΐνη **SIK1_MOUS**. Όνομα εισόδου (*entry name*) της πρωτεΐνης στο <http://www.uniprot.org/> κ.ο.κ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΡΙΑ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου Βιοχημείας για την συμβολή του στην δημιουργία αυτών των εργαστηριακών σημειώσεων. Η εύρεση και δόκιμη πειραματικών ασκήσεων ήταν μια επίπονη εργασία που διήρκεσε αρκετά χρόνια. Οι πειραματικές ασκήσεις μέχρι να φτάσουν στην τελική τους μορφή, ώστε να είναι λειτουργικές κατανοητές και οικονομικά συμφέρουσες, απαιτούν τροποποιήσεις και προσαρμογές με συνεχείς πειραματικές δοκιμές.

Προσωπικό που συνέβαλε στην δημιουργία των Εργαστηριακών Ασκήσεων Βιοχημείας:

Χρίστος Παπανεοφύτου Χημικός, Μηχανικός, MSc, PhD

Αστέρης Γρηγορούδης Χημικός, PhD

Μάγδα Ροβολή Μοριακός Βιολόγος, MSc

Βάιος Νικολόπουλος Βιολόγος, MSc

Ανθή Μέττου Χημικός, MSc

Φώτος Αναστάσιος Χημικός Μηχανικός