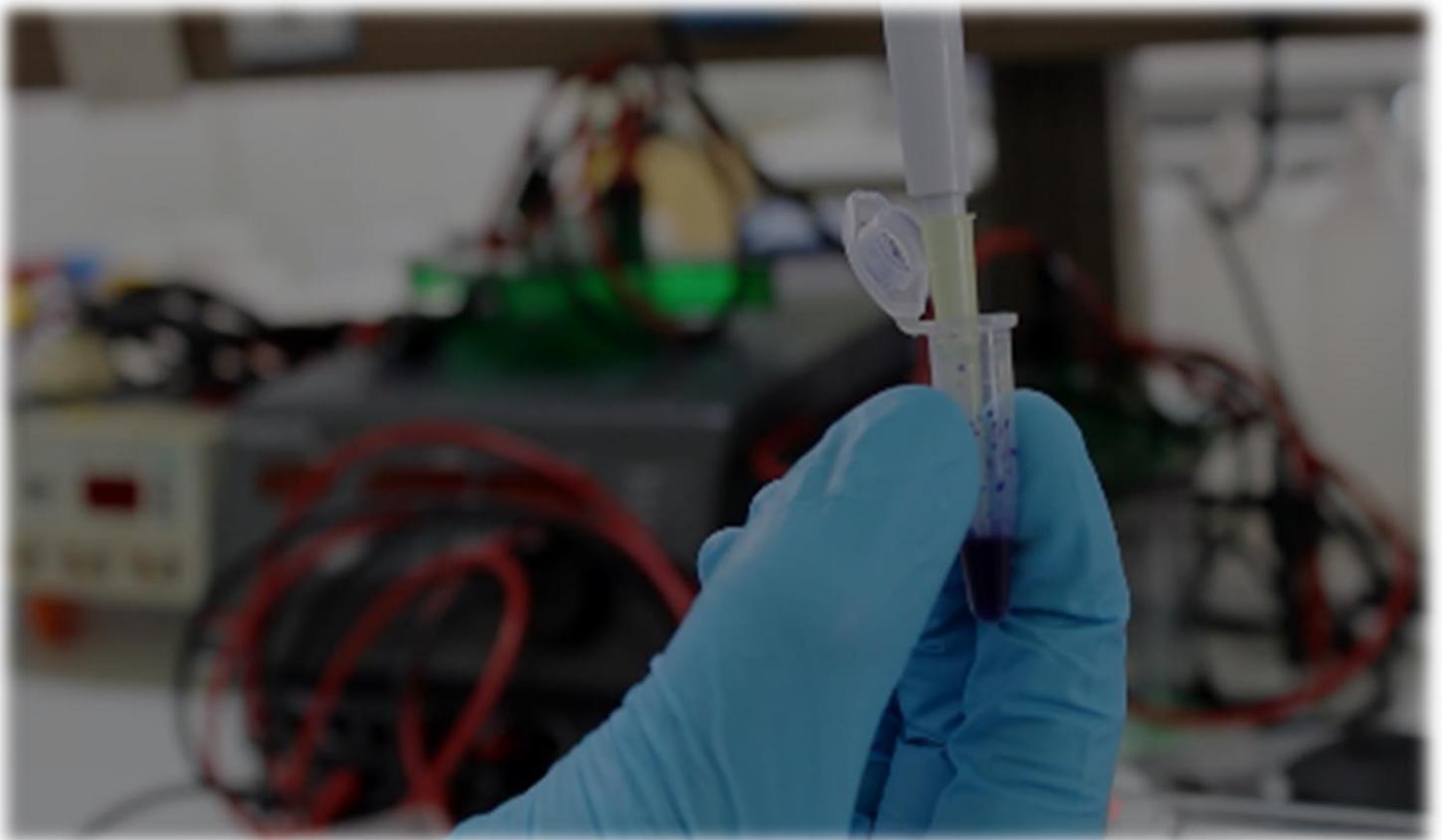


ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ- ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΝΤΟΠΙΔΗΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΑΡΔΙΤΣΑ
2019



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
Εισαγωγικό μάθημα – Εργαστήρια Βιοχημείας	4
Ασφάλεια και Κανόνες Εργαστηρίου	6
Σχέδιο παρουσίασης των εργασιών των φοιτητών	8
Χημικά αντιδραστήρια και γυάλινα σκεύη	9
Διεθνή σύμβολα κινδύνου	14
Επίπεδα Βιοασφάλειας – Μέθοδοι Απολύμανσης	16
Εισαγωγή στην εργαστηριακή διαδικασία	27
Συνήθειες Εργαστηριακοί Υπολογισμοί	30
Σχέδιο ευθύνης οργάνων εργαστηρίου ανά ομάδα	32
<i>1^η Άσκηση</i>	
Ανίχνευση πεπτιδίων – πρωτεϊνών	36
<i>2^η Άσκηση</i>	
Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Μέθοδος BRADFORD	41
<i>3^η Άσκηση</i>	
Προσδιορισμός ισοηλεκτρικού σημείου πρωτεϊνών	46
<i>4^η Άσκηση</i>	
Προσδιορισμός και διαχωρισμός αμινοξέων με χρωματογραφία TLC	50
<i>5^η Άσκηση</i>	
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	56
<i>6^η Άσκηση</i>	
Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων (ΜΕΡΟΣ I)	67
<i>7^η Άσκηση</i>	
Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων (ΜΕΡΟΣ II)	76
<i>8^η Άσκηση</i>	
Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων (ΜΕΡΟΣ III)	81
<i>9^η Άσκηση</i>	
Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων - Ανάλυση Δεδομένων	84
<i>10^η Άσκηση</i>	
Ημιποσοτικός προσδιορισμός αμυλάσης σε δείγμα ούρων	96
<i>11^η Άσκηση</i>	
Προσδιορισμός τρανσαμινασών στον ορό αίματος	101
<i>12^η Άσκηση</i>	
Εφαρμογή ενζυμικής διαγνωστικής χρωματομετρικής μεθόδου	106
<i>13^η Άσκηση</i>	
Διαδίκτυο και βάσεις δεδομένων νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών	111
Ευχαριστήρια	118

Εισαγωγικό μάθημα - Εργαστήρια Βιοχημείας

Βασικοί στόχοι εργαστηρίου Βιοχημείας για την Κτηνιατρική Επιστήμη

Εκπαίδευση φοιτητών ώστε να φτάσουν σε ένα επαρκές για Κτηνιάτρους επίπεδο για προετοιμασία για το επόμενο στάδιο 2^ο και 3^ο έτος (διαφορετικά επίπεδα πρακτικής και θεωρητικής γνώσης εισακτέων)

Ιδιαιτερότητες Κτηνιάτρου σε σχέση με γιατρό (Ζωοτεχνία, Διατροφή, Υγιεινή Τροφίμων)

Εξοικείωση με εργαστήρια, βασικές τεχνικές με σκοπό την επάρκεια για παρασκευή ενός διαλύματος και απλό προσδιορισμό ουσίας.

Η βασικές γνώσεις διαφορετικές και συνεχεία του λυκείου για να κατανοήσει διατροφή, φυσιολογία, Βιοχημεία και τα λοιπά (σε αυτό συμβάλουν και αλλά βασικά μαθήματα όπως Φυσική, Οικολογία κτλ)

Βασικοί Κανόνες εργαστηρίου των Γενικών Αρχών Βιοχημείας

Προσέλευση σε ακριβή ώρα!! (πχ.09.00)

Είναι απαραίτητο για να γίνει η εισαγωγή στην άσκηση της ημέρας, η καταγραφή των φοιτητών/τριών, οι ερωτήσεις και η παράδοση των εργασιών της προηγούμενης άσκησης

...

αλλιώς δεν θα ολοκληρωθεί το εργαστήριο που διαρκεί δύο ώρες!

Παράδοση της εργασίας (αποτελέσματα και επεξεργασία) προηγούμενης άσκησης

Αλλιώς το προσωπικό επιφορτίζεται με επιπλέον εργασία την επόμενη εβδομάδα
Στην εργασία αναγράφεται ημερομηνία άσκησης, ημερομηνία παράδοσης, άτομα που έλαβαν μέρος και φυσικά απαντήσεις, επεξεργασία δεδομένων άσκησης

Τα αντιδραστήρια είναι μετρημένα, δυσεύρετα, ακριβά

και δεν προλαβαίνουμε να ετοιμάσουμε καινούργια (σε 20 λεπτά) εάν τα καταστρέψετε ή τα χρησιμοποιήσετε λάθος. Συνεχίζετε δανειζόμενοι δεδομένα από την διπλανή ομάδα

Τα σκευή είναι μετρημένα, δυσεύρετα, ακριβά

και δεν μπορούμε να βρούμε καινούργια (σε 20 λεπτά) εάν τα καταστρέψετε ή τα χρησιμοποιήσετε λάθος.

Συνεχίζεται δανειζόμενοι δεδομένα ή σκευή από την διπλανή ομάδα.

Συμβουλές προετοιμασίας για το εργαστηριακό μάθημα

Ξυπνητήρι στις 08.00

Διάβασμα 10-15 λεπτά (στο λεωφορείο) διαδικασία άσκησης, βήματα, τι κάνουμε με τι σειρά το κάνουμε.

Βοηθάει να μην καταστρέφετε αντιδραστήρια.

Βοηθάει να παίρνετε επιπλέον βαθμό απαντώντας σε ερωτήσεις

Βοηθάει να τελειώνετε την άσκηση στον ακριβή χρόνο που σαν δίνετε

Βοηθάει να μην βιάζεστε και καταστρέφετε τα σκεύη

Βοηθάει να κατανοείτε καλύτερα τι κάνετε

Συνεργασία ομάδας.

Είναι πάρα πολύ δύσκολο να τελειώσουν κάποιες από τις ασκήσεις με ένα μόνο άτομο. Απαιτείται συνεργασία. Κάποιος/α να κάνει υπολογισμούς, κάποιος/α να παρακολουθεί μετρήσεις και να καταγραφεί αποτελέσματα, κάποιος/α να χειρίζεται όργανο ή σκεύος

ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

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

- Δεν εργάζεται κανείς μόνος του στο εργαστήριο. Η παρουσία του υπεύθυνου είναι απαραίτητη.
- Χρησιμοποιείτε 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 μετακινήστε 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 (γραπτώς) 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).

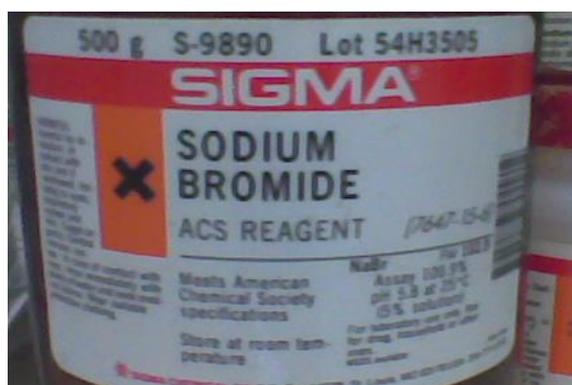
Στην επιγραφή αυτή αναφέρονται συνήθως στοιχεία που αφορούν το όνομα του χημικού αντιδραστηρίου, το χημικό του τύπο, το μοριακό του βάρος και το βαθμό καθαρότητας του. Όταν το περιεχόμενο αντιδραστήριο βρίσκεται σε μορφή διαλύματος αναφέρεται ακόμη η περιεκτικότητά του καθώς και το ειδικό του βάρος.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

με ακρίβεια στο εργαστηριακό ζυγό και κατόπιν 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.

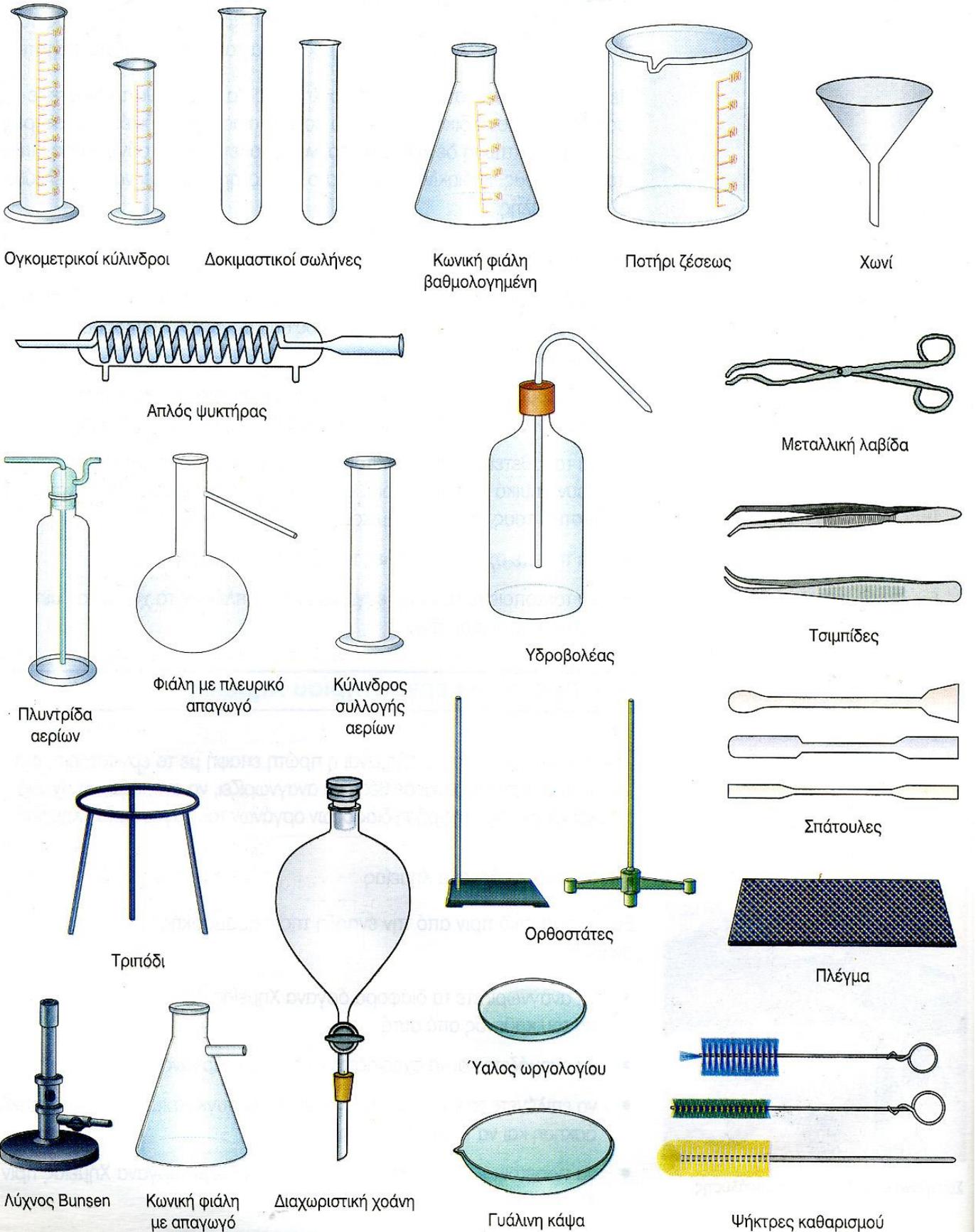
Προσοχή!! Κάθε όργανο έχει διαφορετική ακρίβεια.

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



Σχήμα 2: Μερικά υάλινα εργαστηριακά σκεύη.

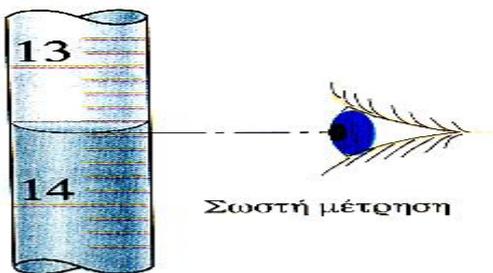
Σχήμα 3: Υάλινα εργαστηριακά σκεύη ογκομέτρησης.

Ογκομετρικός κύλινδρος = 0,7 ακρίβεια

Προχοΐδα = 0,1 ακρίβεια

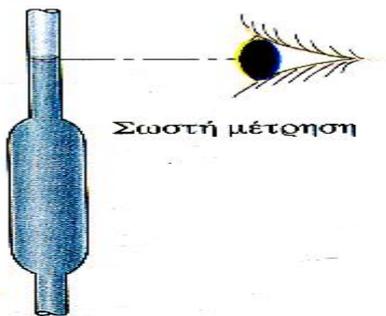
Ογκομετρική φιάλη = 0,1 ακρίβεια

Σιφώνιο = 0,1 ακρίβεια



Σχήμα 4:

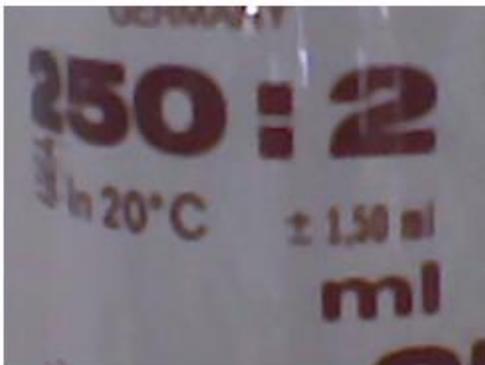
Ανάγνωση τιμής όγκου σε ογκομετρικό
Η ανάγνωση στην κλίμακα
μέτρησης του όγκου,
γίνεται στο σημείο του μηνίσκου
που σχηματίζει το υγρό εντός του σωλήνα.



Αιχμή χωρητικότητα

Βαθμονομημένη χωρητικότητα

Ακρίβεια



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

ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΜΒΟΛΑ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

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.

Σημασία των συμβόλων που χρησιμοποιούνται στην ετικέτα

Σημασία	Σύμβολο	Περιγραφή των κινδύνων	Παραδείγματα προϊόντων	Προληπτικά μέτρα
Τοξικό (T) Πολύ τοξικό (T+)		<ul style="list-style-type: none"> - Τοξικές και επιβλαβείς ουσίες και συσκευάσματα που παρουσιάζουν, ακόμη και σε μικρές ποσότητες, κίνδυνο για την υγεία. - Αν η σοβαρότητα των επιπτώσεων στην υγεία εκδηλώνεται με πολύ μικρές ποσότητες, το προϊόν σημειώνεται με το τοξικό σύμβολο. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Μεθανόλη, φωτιστικό οινόπνευμα, αποσμητικά, στεγανωτικά σπρέϊ ● απολυμαντικά (κρεολίνη) ● π.χ. σπρέϊ φανοποιίας 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Για να αποφύγετε κάθε επαφή με το δέρμα χρησιμοποιείστε προστατευτικά μέσα: γάντια, προσωπίδα, προστατευτικό ένδυμα κλπ. ◆ Προτιμάτε να εργάζεστε στο ύπαιθρο ή σε καλά αεριζόμενο χώρο. ◆ Καλή υγιεινή: πλύντε τα χέρια σας, μην τρώτε ή καπνίζετε ποτέ κατά τη διάρκεια της χρήσης. ◆ Τα προϊόντα σε αεροζόλ είναι πιο επικίνδυνα (εισπνοή!). ◆ Κρατείστε τα μακριά από τα παιδιά!
Επιβλαβές (Xn)		<ul style="list-style-type: none"> - Αυτά τα προϊόντα διεισδύουν στον οργανισμό με εισπνοή, κατάποση ή από το δέρμα. 	<ul style="list-style-type: none"> ● αποσμητικά, τριχλωραιθυλένιο ● διαλυτικά για χρώματα ● προϊόντα καθαρισμού ● προϊόντα για την προστασία και την επεξεργασία του ξύλου ● αντισκωριακά για χρώματα 	
Εύφλεκτο (F) Πολύ εύφλεκτο (F+)		<ul style="list-style-type: none"> - (F) Τα εύφλεκτα προϊόντα αναφλέγονται παρουσία μιάς φλόγας, μιάς πηγής θερμότητας (θερμή επιφάνεια) ή μιάς σπίθας. - (F+) Προϊόν που μπορεί να αναφλεχθεί πολύ εύκολα από τη δράση μιάς πηγής ενέργειας (φλόγα, σπίθες κλπ.), ακόμη και κάτω από 0° C. 	<ul style="list-style-type: none"> ● πετρέλαιο, βενζίνη ● φωτιστικό οινόπνευμα ή μεθανόλη ● τερεβινθέλαιο, λευκό οινόπνευμα ● ακετόνη, καθαριστικά για πινέλα, διαλυτικά για χρώματα ● χρώματα σε αεροζόλ, μεταλλικά χρώματα ● αντιπαγετικά για τζάμια ● κόλλες επαφής, κόλλες (νεοπρένιο) ● αποσμητικά χώρου 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Αποθηκεύετε τα προϊόντα σε καλά αεριζόμενο χώρο. ◆ Μην τα χρησιμοποιείτε ποτέ κοντά σε πηγή θερμότητας, ή σε θερμή επιφάνεια, κοντά σε σπίθες ή σε ακάλυπτη φλόγα. ◆ Απαγορεύεται το κάπνισμα! ◆ Μη φοράτε νάιλον ρούχα και έχετε πάντα πρόχειρο έναν πυροσβεστήρα κατά τη διάρκεια της χρήσης εύφλεκτων προϊόντων ◆ Διατηρείτε τα εύφλεκτα προϊόντα (F) καλά διαχωρισμένα από τα οξειδωτικά προϊόντα (O).
Οξειδωτικό (O)		<ul style="list-style-type: none"> - Η καύση (οξείδωση) χρειάζεται μια καύσιμη ύλη, οξυγόνο και μια πηγή ανάφλεξης· επιταχύνεται σημαντικά από την παρουσία ενός οξειδωτικού προϊόντος (ουσίας πλούσιας σε οξυγόνο). 		

ΕΠΙΠΕΔΑ ΒΙΟΑΣΦΑΛΕΙΑΣ – ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ

Βιοασφάλεια

Βασικός κανόνας για την ασφάλεια αποτελεί ότι η αντιμετώπιση όλων των μικροοργανισμών και μολυσματικών παραγόντων θα πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο σαν να πρόκειται για δυνητικά επικίνδυνους για την ανθρώπινη υγεία παράγοντες και κατά συνέπεια επιβάλλεται η εφαρμογή βασικών κανόνων ασφάλειας. Επειδή η σοβαρότητα των προβλημάτων που μπορούν να προκληθούν στον άνθρωπο ποικίλει ανάλογα το παθογόνο, υπάρχει ταξινόμηση ανάλογα των διαθέσιμων πληροφοριών σχετικά με την επικινδυνότητά του (οι οποίες και αναπροσαρμόζονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα), σε ομάδες έτσι ώστε να είναι εκ των προτέρων γνωστός ο βαθμός κινδύνου στον οποίο εκτίθεται ο εργαζόμενος.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) ταξινομεί τα παθογόνα ως:

- Ομάδα κινδύνου 1

Κανένας ή χαμηλός κίνδυνος για το άτομο και την κοινότητα

- Ομάδα κινδύνου 2

Μέτριος κίνδυνος για το άτομο, χαμηλός κίνδυνος για την κοινότητα, διαθέσιμη θεραπεία

- Ομάδα κινδύνου 3

Υψηλός κίνδυνος για το άτομο, χαμηλός κίνδυνος για την κοινότητα, διαθέσιμη θεραπεία και πρόληψη

- Ομάδα κινδύνου 4

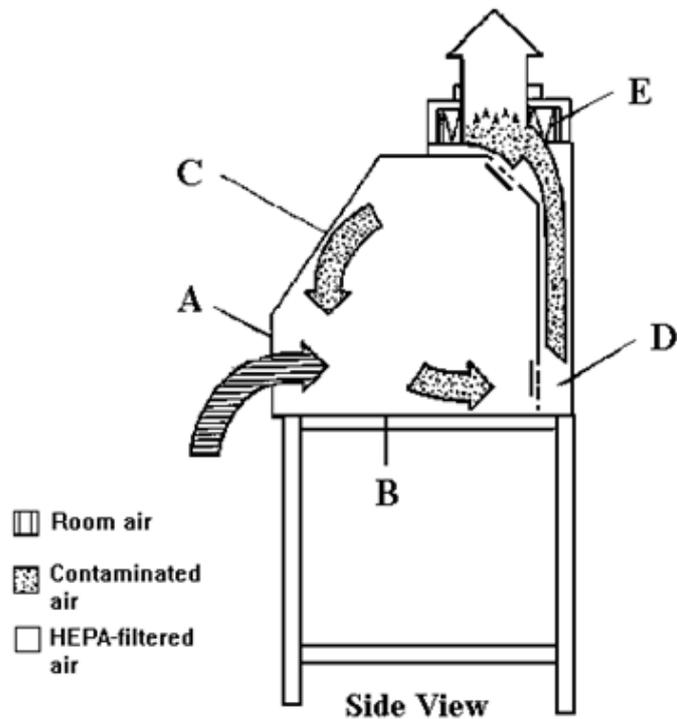
Υψηλός κίνδυνος για το άτομο και για την κοινότητα, συνήθως μη διαθέσιμη αποτελεσματική αγωγή και προφύλαξη

Παρακάτω εμφανίζονται περιληπτικά τα επίπεδα βιοασφάλειας που ισχύουν στα εργαστήρια.

Ομάδα Κινδύνου	Επίπεδο Βιοασφάλειας	Είδος Εργαστηρίου	Εργαστηριακή Πρακτική	Εξοπλισμός Ασφάλειας
1	Βασικό Επίπεδο Βιοασφάλειας 1	Βασική εκπαίδευση και έρευνα	Καλές Εργαστηριακές Πρακτικές (ΚΕΠ)	Κανείς, ανοιχτός πάγκος
2	Βασικό Επίπεδο Βιοασφάλειας 2	Πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας διαγνωστικές υπηρεσίες, έρευνα	ΚΕΠ+ προστατευτικός Ρουχισμός, Σήμανση Βιοκινδύνων	Θάλαμος Βιολογ. Ασφάλειας (ΘΒΑ) για aerosols
3	Απομόνωση Επίπεδο Βιοασφάλειας 3	Ειδικές διαγνωστικές υπηρεσίες έρευνα	Επίπεδο 2 + ειδικός Ρουχισμός, ελεγχόμενη Πρόσβαση, κατευθυνόμενος Αερισμός	ΘΒΑ ή/και άλλες διατάξεις για όλες τις δραστηριότητες
4	Απομόνωση Επίπεδο Βιοασφάλειας 4	Επικίνδυνες Μονάδες Παθογόνων	Επίπεδο 3 + αεροστεγής είσοδος, ντους εξόδου, ειδική αποκομιδή απορριμμάτων	ΘΒΑ, στολές θετικής πίεσης, αποστειρωτής 2 όψεων, φιλτραρισμένος αέρας

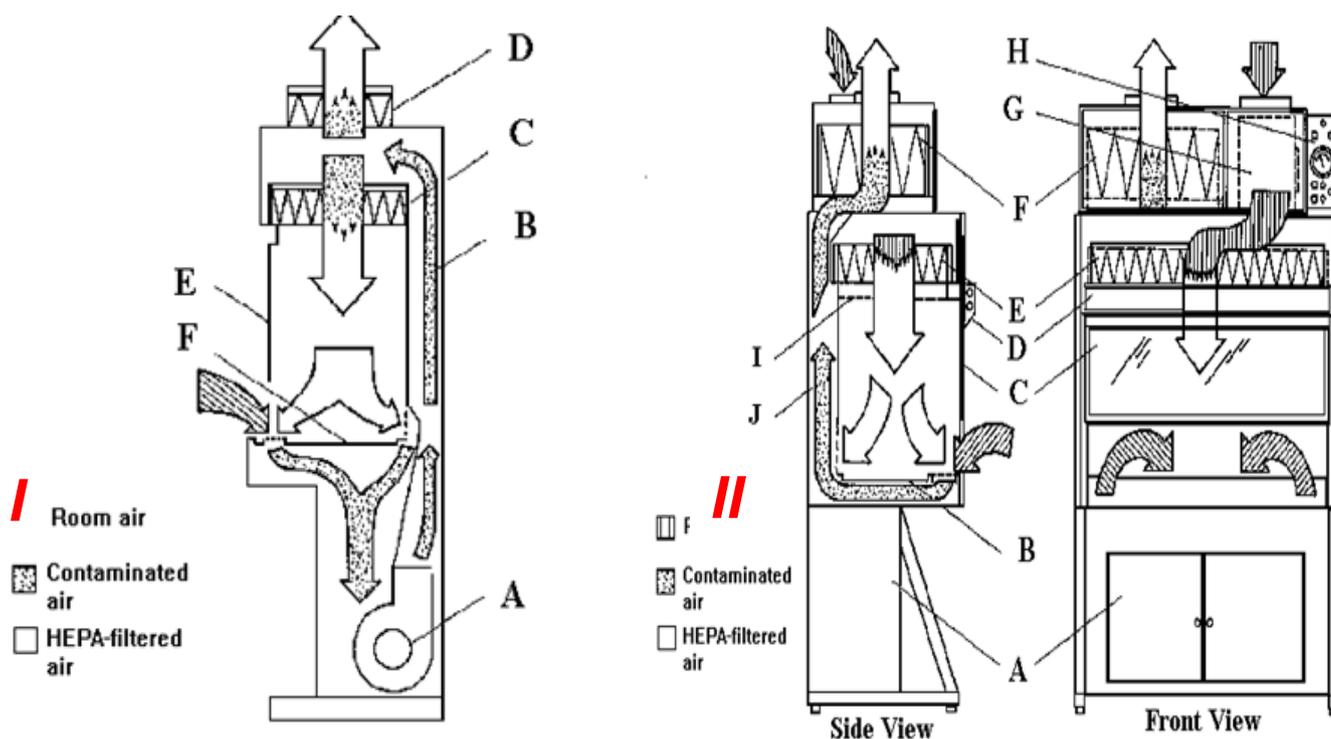
- Ο Κώδικας Καλής Εργαστηριακής Πρακτικής αποτελεί το θεμέλιο για την ασφάλεια του Εργαστηρίου.
- Ο εξειδικευμένος εργαστηριακός εξοπλισμός αποτελεί ένα σημαντικό συμπλήρωμα των πρακτικών και των διαδικασιών που πρέπει να ακολουθούνται απαρεγκλίτως.
- Η πρόσβαση στο Εργαστήριο επιτρέπεται στο εξουσιοδοτημένο προσωπικό μόνον, ενώ απαιτείται ευκρινής σήμανση.

Παρακάτω παρουσιάζονται παραδείγματα συσκευών καθαρισμού αέρα για επικίνδυνες πτητικές ουσίες, μολυσματικούς και παθογόνους παράγοντες αλλά και για χρήση ως περιοχές αποστειρωμένες για αποφυγή επιμόλυνσης στα χειριζόμενα αντιδραστήρια (χημικά, βιολογικά κτλ)



Εικόνα 15. Συσκευή κάθετου νηματικής ροής βιολογικής ασφάλειας , Τάξης I

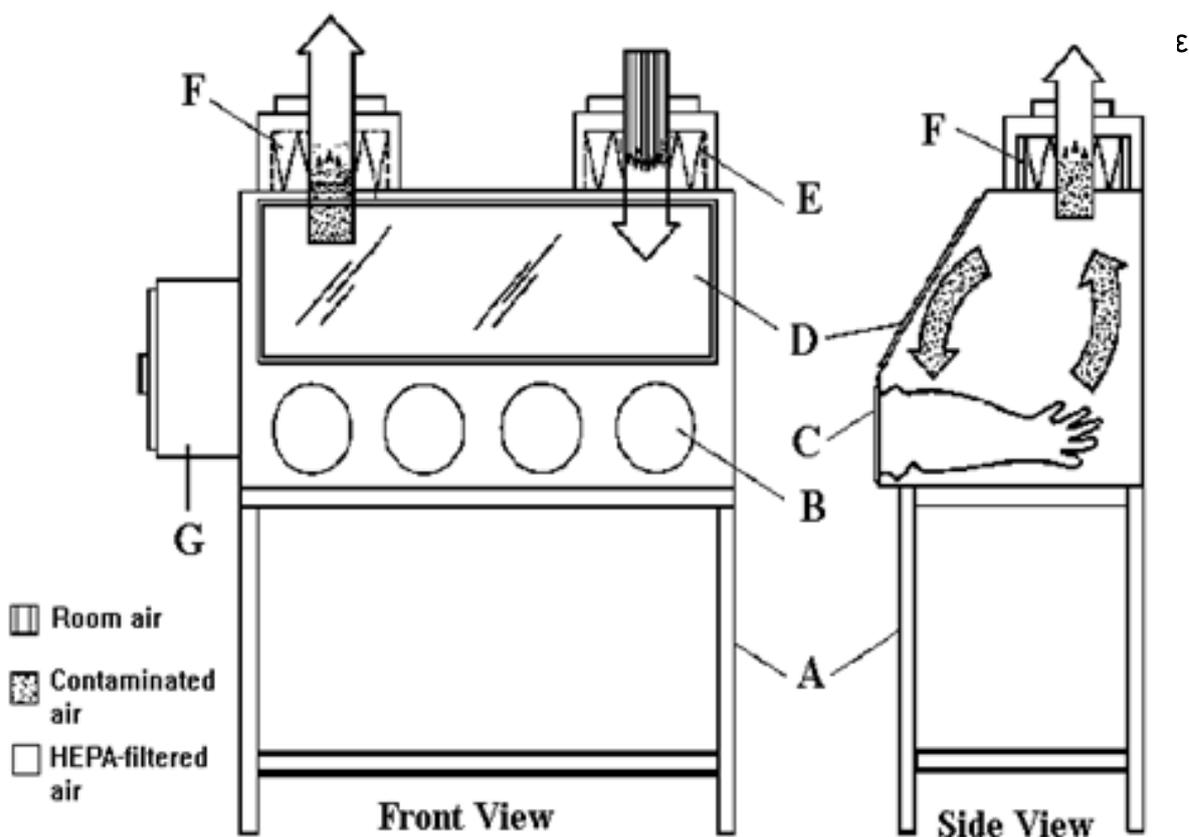
Ο αέρας εισέρχεται από την μπροστινή ανοικτή επιφάνεια (A) της συσκευής, κυκλοφορεί εντός της συσκευής, ενώ ένα μέρος του αέρα αποβάλλεται στον περιβάλλοντα χώρο μέσω ενός φίλτρου HEPA (E) (High Efficiency Particle Arrester) αφού προηγουμένως περάσει από το πίσω τμήμα της συσκευής (D). Με την συσκευή αυτή δεν παρέχεται προστασία του βιολογικού δείγματος, αλλά μόνο του χειριστή και του περιβάλλοντα χώρου.



Εικόνα 16. Συσκευές κάθετου νηματικής ροής βιολογικής ασφάλειας , Τάξης II

I. Ο αέρας εισέρχεται από το μπροστινό μέρος της συσκευής και με την βοήθεια ενός μοτέρ (A) προωθείται μέσω του πίσω μέρους της συσκευής (B) σε δύο φίλτρα HEPA. Διαμέσου του φίλτρου (C) το 70% του αέρα ανακυκλώνεται μέσω της επιφάνειας εργασίας στην συσκευή ενώ το υπόλοιπο 30% εξέρχεται της συσκευής διαμέσου του φίλτρου (D). Η συσκευή αυτή προστατεύει το βιολογικό δείγμα στην επιφάνεια εργασίας, τον χειριστή και τον περιβάλλοντα χώρο. Η συσκευή δεν προστατεύει από τοξικές χημικές ουσίες.

II. Ο αέρας εισέρχεται από το άνω μέρος της συσκευής (G) και φιλτράρεται αμέσως διαμέσου ενός φίλτρου HEPA (E) και εν συνεχεία εισέρχεται στην επιφάνεια εργασίας. Ο αέρας ο οποίος εισέρχεται από το μπροστινό μέρος της συσκευής καθώς και ο αέρας από την επιφάνεια εργασίας μέσω του πίσω μέρους της συσκευής (J) μέσω ενός φίλτρου HEPA (F) οδηγείται εκτός συσκευής στον περιβάλλοντα χώρο χωρίς να πραγματοποιείται ανακύκλωση του αέρα. Η συσκευή αυτή προστατεύει το δείγμα, την επιφάνεια εργασίας, τον χειριστή και τον περιβάλλοντα χώρο. Η συσκευή προστατεύει επίσης μερικώς και από τοξικές χημικές ουσίες.



Εικόνα 17. Συσκευή κάθετου νηματικής ροής βιολογικής ασφάλειας , Τάξης III

Με τις εστίες τύπου III επιτυγχάνεται η πλήρης απομόνωση του δείγματος εργασίας από τον υπόλοιπο χώρο του εργαστηρίου. Οι διάφοροι χειρισμοί γίνονται με ειδικά γάντια που είναι ενσωματωμένα στην εστία. Η είσοδος του προς ανάλυση δείγματος γίνεται μέσω διπλής ασφάλειας εισόδου (G). Στο εσωτερικό της εστίας υπάρχει ελαφρά αρνητική πίεση που προκαλεί συνεχή ροή αέρα ο οποίος διέρχεται από 1 φίλτρο HEPA (E) κατά την είσοδό του. Ο εξερχόμενος αέρας μέσω του φίλτρου HEPA (F) οδηγείται μέσω αεραγωγού, ο οποίος διαθέτει δύο εν σειρά φίλτρα HEPA, εκτός εργαστηρίου. Η συσκευή αυτή προστατεύει το δείγμα, την επιφάνεια εργασίας, τον χειριστή και τον περιβάλλοντα χώρο. Η συσκευή προστατεύει επίσης και από τοξικές χημικές ουσίες.

Με αυτού του τύπου τις συσκευές είναι επανδρωμένα τα εργαστήρια βιοασφάλειας Επιπέδου 3 & 4.

Τα φίλτρα HEPA μετά την αντικατάστασή τους θα πρέπει να καίγονται ώστε να διασφαλίζεται η καταστροφή των μικροοργανισμών.

Αποστείρωση

Για την εργασία σε εργαστήριο είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται υλικά που είναι ήδη αποστειρωμένα ή έχουν περάσει μέσα από τις διαδικασίες αποστείρωσης όπου αυτό κρίνεται απαραίτητο. Μερικές μέθοδοι αποστείρωσης είναι οι εξής:

a. Θερμότητα

Με την επίδραση θερμοκρασίας στο θερμικού σημείου θανάτου του παθογόνου (Thermal Death Point-TDP) είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία όλοι οι μικροοργανισμοί οι οποίοι βρίσκονται σε ένα υδατικό εναιώρημα θανατώνονται εντός 10 λεπτών.

b. Υγρή Θερμότητα

Ένα είδος αποστείρωσης με υγρή θερμότητα είναι ο βρασμός (100°C), ο οποίος νεκρώνει τις βλαστικές μορφές των παθογόνων βακτηρίων, πολλούς ιούς, μύκητες και τα σπόριά τους μέσα σε χρονικό διάστημα 10-20 λεπτών. Τα ενδοσπόρια ωστόσο δεν καταστρέφονται και για μια σωστή αποστείρωση με υγρή θερμότητα απαιτούνται θερμοκρασίες άνω των 100°C. Αυτές οι υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνονται με τη χρήση ατμού κάτω από πίεση σε ειδική συσκευή, το αυτόκαυστο.

c. Παστερίωση

Αποτελεί τη γνωστή κατεργασία του γάλακτος και συνίσταται σε θερμοκρασία τουλάχιστον 72°C για σύντομο χρονικό διάστημα για 15-60 δευτερόλεπτα. Αυτή η κατεργασία είναι γνωστή σαν παστερίωση υψηλής θερμοκρασίας σε σύντομο χρόνο (High Temperature Short Time Pasteurization - HTSTP) και εφαρμόζεται καθώς το γάλα διέρχεται μέσα από ένα εναλλάκτη υψηλής θερμότητας. Η παστερίωση υψηλής θερμοκρασίας σύντομου χρόνου μειώνει τον ολικό βακτηριακό πληθυσμό ώστε το γάλα να διατηρείται σε θερμοκρασία ψυγείου. Το γάλα μετά την παστερίωση του, μπορεί να αποστειρωθεί με διαδικασία υπερβολικά υψηλής θερμοκρασίας (Ultra High temperature Treatment - UHTT) ούτως ώστε να μη χρειάζεται συντήρησή του στο ψυγείο. Στην περίπτωση αυτή το γάλα διέρχεται από ένα θάλαμο ατμού υψηλής θερμοκρασίας (140°C) για 3-5 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια ψύχεται υπό κενό.

d. Αποστείρωση ξηρής θερμότητας

Η πλέον απλή μέθοδος ξηρής θερμότητας είναι η φλόγα του λύχνου Bunsen. Μια άλλη μέθοδος αποστείρωσης με ξηρή θερμότητα είναι η αποστείρωση με θερμό αέρα. Τα αντικείμενα τοποθετούνται σε ένα κλίβανο 170°C για 1-2 περίπου ώρες. Κατά την αποστείρωση με ξηρή θερμότητα απαιτούνται υψηλότερες θερμοκρασίες και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με την αποστείρωση η οποία πραγματοποιείται με υγρή θερμότητα. Χρησιμοποιείται για αντικείμενα στα οποία δεν υπάρχει η δυνατότητα διείσδυσης των υδρατμών και για υλικά τα οποία αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες.

e. Διήθηση

Η διήθηση είναι η διαδικασία διέλευσης υγρού ή αερίου δείγματος ή υλικού μέσω ηθμού, ο οποίος έχει πόρους τόσο μικρούς ώστε να μην επιτρέπεται η διέλευση των μικροοργανισμών μέσω αυτού. Η μέθοδος της διήθησης χρησιμοποιείται κυρίως για υλικά τα οποία είναι ευαίσθητα στη θερμότητα.

Οι ηθμομεμβράνες αποτελούνται από υλικά όπως είναι οι κυτταρικοί εστέρες και πλαστικά πολυμερή. Το μέγεθος των πόρων είναι ομοιόμορφο και μπορεί να είναι πάρα πολύ μικρό. Για τα βακτήρια συνήθως χρησιμοποιούνται μεγέθη από 0,22 μέχρι 0,45 μm. Ο αέρας είναι δυνατόν να αποστειρωθεί με τη μέθοδο της διήθησης. Ο θάλαμος καθέτου νηματικής ροής αποτελείται από ειδικούς ηθμούς υψηλής απόδοσης, φίλτρα HEPA (High Efficiency Particles Arresters) όπου επιτυγχάνεται συγκράτηση του 99.9% των σωματιδίων διαμέτρου μεγαλύτερης των 0,3 μm.

f. Ψύξη

Η επίδραση της χαμηλής θερμοότητας στους μικροοργανισμούς εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού και την ένταση της εφαρμογής της. Π.χ. σε θερμοκρασία ψυγείου 2-8°C η μεταβολική δραστηριότητα των περισσότερων μικροοργανισμών μειώνεται. Άρα η ψύξη αυτή έχει βακτηριοστατική επίδραση. Πρέπει να λαμβάνεται υπόψη πως υπάρχουν όμως και ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί οι οποίοι αναπτύσσονται σ' αυτές τις θερμοκρασίες.

g. Ακτινοβολία

Η ακτινοβολία επιδρά στο DNA του οποίου προκαλεί ρήξη της σύνδεσης των κλώνων και αποφωσφορυλίωση. Η ακτινοβολία επίσης αδρανοποιεί ή καταστρέφει ορισμένα ενζυμικά συστήματα του μικροβιακού κυττάρου. Η δράση της εξαρτάται από το μήκος κύματος, την ένταση και τη διάρκεια. Διακρίνονται δύο τύποι ακτινοβολίας οι οποίοι έχουν την ικανότητα να νεκρώνουν τους μικροοργανισμούς, είναι δηλαδή ακτινοβολίες αποστείρωσης:

- Η ιονίζουσα και
- Η μη-ιονίζουσα ακτινοβολία.

Ιονίζουσες ακτινοβολίες:

Οι ακτίνες γ παράγονται από ραδιενεργό κοβάλτιο και οι ακτίνες ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας από επιταχυντές ηλεκτρονίων. Η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί εκτενώς την ακτινοβολία για την συντήρηση των τροφίμων. Η ακτινοβολία ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας χρησιμοποιείται από τις φαρμακοβιομηχανίες για την αποστείρωση των πλαστικών.

Μη-ιονίζουσα ακτινοβολία:

Η γνωστή υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Το υπεριώδες φως καταστρέφει το DNA των κυττάρων που εκτίθενται σ' αυτό δημιουργώντας δεσμούς μεταξύ γειτονικών μορίων θυμίνης στις αλυσίδες του DNA. Τα διμερή της θυμίνης παρεμποδίζουν το σωστό διπλασιασμό του DNA κατά την διάρκεια αναπαραγωγής του κυττάρου. Το δραστικότερο μήκος κύματος που προκαλεί τη νέκρωση των μικροοργανισμών είναι τα 260 nm διότι απορροφάται από το DNA. Η υπεριώδης ακτινοβολία σε μήκος κύματος 250-260 nm είναι βακτηριοκτόνος και σε μικρότερο βαθμό σποριοκτόνος. Λόγω της χαμηλής ενέργειας παρουσιάζει μικρή διεισδυτικότητα. Στις εστίες καθέτου νηματικής ροής βιολογικής ασφάλειας χρησιμοποιείται για την απολύμανση του χώρου σε συνδυασμό με αιθανόλη. Οι μικροοργανισμοί που καλύπτονται όμως από στερεά υλικά όπως χαρτί, γυαλί, διάφορα πλαστικά αντικείμενα κ.λ.π. δεν νεκρώνονται από την ακτινοβολία UV.

Πρέπει να σημειωθεί ότι το υπεριώδες φως δημιουργεί προβλήματα στα μάτια και το δέρμα. Το υπεριώδες φως χρησιμοποιείται για την αποστείρωση του πόσιμου νερού.

Απολύμανση

Μετά το πέρας της εργασίας επιβάλλεται να καθαρίζεται και να απολυμαίνεται ο χώρος. Οι πιο γνωστές και χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η χρήση αραιωμένης χλωρίνης ($\approx 10\%$) ή η χρήση αραιωμένης αιθανόλης (30-70%) για τον καθαρισμό πάγκων, σκευών και χώρων της εργασίας. Άλλες πρακτικές είναι και η χρήση των παρακάτω:

a) Φαινολικές ενώσεις

Η φαινόλη έχει μικρή αντιμικροβιακή δράση στις χαμηλές συγκεντρώσεις που πρέπει να χρησιμοποιείται, ενώ σε συγκεντρώσεις πάνω από 1% η δράση της είναι περισσότερο αποτελεσματική. Ως αντισηπτικά χρησιμοποιούνται επίσης παράγωγα της φαινόλης τα οποία καλούνται φαινολικές ενώσεις, περιέχουν ένα μόριο φαινόλης και έχουν υποστεί χημική τροποποίηση ώστε να μειωθεί η ερεθιστική δράση τους και να αυξηθεί η αντιμικροβιακή τους δράση, σε συνδυασμό με ένα σαπούνι ή ένα άλλο απορρυπαντικό. Οι φαινολικές ενώσεις συνήθως αδρανοποιούν τα ένζυμα και προκαλούν αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ένα από τα πλεονεκτήματά τους είναι ότι είναι δραστικές παρουσία οργανικών ουσιών και είναι σταθερές για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Η λιζόλη είναι διάλυμα σαπουνιού και φαινολικών ενώσεων (o-phenyl-phenol, o-benzyl-p-chlorophenol, xylenols) και χρησιμοποιείται για την απολύμανση δαπέδων, τοίχων, εργαστηριακών πάγκων κτλ. Μια άλλη ευρέως διαδεδομένη φαινολική ένωση είναι το εξαχλωροφαίνιο. Βακτηριοστατικός παράγοντας δρα κυρίως εναντίον των θετικών κατά Gram σταφυλοκόκκων και στρεπτοκόκκων τα οποία δημιουργούν επιδερμικές μολύνσεις.

b) Αλογόνα

Τα αλογόνα κυρίως το ιώδιο, το χλώριο και το βρώμιο είναι δραστικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες γιατί είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες και χρησιμοποιούνται ως συστατικό ανόργανων ή οργανικών ενώσεων. Το Ιώδιο (I_2) είναι ένα από τα παλαιότερα και δραστικότερα αντισηπτικά. Δρα εναντίον όλων των ειδών των βακτηρίων, πολλών ενδοσπορίων, μυκήτων και αρκετών ιών. Ο μηχανισμός δράσης του βασίζεται στη σύνδεση του με την τυροσίνη με αποτέλεσμα την αναστολή της μικροβιακής πρωτεϊνικής λειτουργίας. Επίσης το ιώδιο οξειδώνει τις θειώδεις ομάδες πολλών αμινοξέων οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της πρωτεϊνικής δομής. Το χλώριο (Cl_2) είτε ως αέριο είτε σε συνδυασμό με άλλα χημικά είναι ένα

ευρέως χρησιμοποιούμενο απολυμαντικό. Η δράση του οφείλεται στο υποχλωρικό οξύ το οποίο σχηματίζεται όταν το χλώριο προστεθεί στο νερό. Εμποδίζει τη λειτουργία των περισσότερων ενζυμικών συστημάτων. Το πλεονέκτημα του είναι ότι διαχέεται με την ίδια ευκολία που διαχέεται το νερό διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος. Υγρή μορφή συμπυκνωμένου αερίου χλωρίου χρησιμοποιείται ευρέως για την απολύμανση του πόσιμου νερού και νερού πισίνας. Το υποχλωριώδες νάτριο χρησιμοποιείται σαν οικιακό απολυμαντικό.

c) Αλκοόλες

Οι αλκοόλες νεκρώνουν αποτελεσματικά τα βακτήρια και τους μύκητες, αλλά όχι τα ενδοσπόρια των βακτηρίων και τους ιούς που δεν έχουν περίβλημα. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου γίνεται η καταστροφή των μικροοργανισμών είναι συνήθως η αποδιάταξη των πρωτεϊνών, αλλά η αλκοόλη καταστρέφει και τις μεμβράνες διαλύοντας πολλά λίπη συμπεριλαμβανομένων και εκείνων στο περίβλημα των ιών. Το πλεονέκτημα των αλκοολών είναι ότι αφού δράσουν εξατμίζονται γρήγορα χωρίς να αφήνουν υπολείμματα. Από τις αλκοόλες χρησιμοποιούνται συχνότερα η αιθανόλη και η ισοπροπανόλη.

Συγκέντρωση αιθανόλης μεταξύ 70% και 95% προκαλεί σύντομο θάνατο των μικροοργανισμών.

d) Αλδεΐδες

Οι αλδεΐδες θεωρούνται οι πλέον δραστικές αντιμικροβιακές ενώσεις. Συνηθέστερα χρησιμοποιούνται η φορμαλδεΐδη και η γλουταραλδεΐδη οι οποίες αδρανοποιούν τις πρωτεΐνες σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς με έναν αριθμό ριζών στις πρωτεΐνες (-NH₂, -HO, -COOH και -SH). Η αέρια φορμαλδεΐδη είναι ένα εξαιρετικό απολυμαντικό. Η συχνότερα όμως διαθέσιμη ουσία είναι η φορμαλίνη, η οποία είναι ένα υδατικό διάλυμα 37% της αέριας φορμαλδεΐδης. Η φορμαλίνη χρησιμοποιείται για την αποστείρωση χώρων εργασίας. Οι ατμοί οι οποίοι απελευθερώνονται αφήνονται να δράσουν επί τουλάχιστον 12 ώρες. Εν συνεχεία ενεργοποιείται το σύστημα εξαερισμού για να εκδιωχθούν οι ατμοί. Η γλουταραλδεΐδη είναι μια χημική ένωση συγγενής της φορμαλδεΐδης λιγότερο ερεθιστική αλλά εξ ίσου δραστική. Το συνηθέστερο διάλυμα έχει συγκέντρωση 2% και είναι βακτηριοστατικό και ιοστατικό (όταν χρησιμοποιείται για 12 τουλάχιστον ώρες).

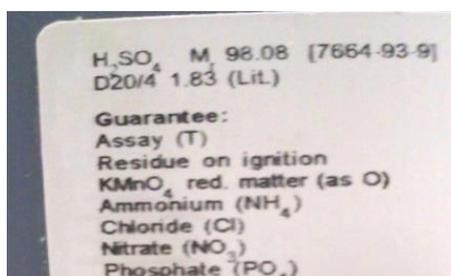
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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 H_2O) ή να είναι **άνυδρα** (δηλαδή να μην περιέχουν μόρια H_2O παρά μόνο τον χημικό τύπο της ουσίας). Κλασσικό παράδειγμα είναι ο **$CuSO_4$** (θειικός χαλκός), όπου σε μια ένυδρη μορφή του είναι $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Κατ' αυτόν τον τρόπο το μοριακό βάρος του αντιδραστηρίου γίνεται ως εξής:

Molecular Formula: $CuSO_4$
Molecular Weight: 159.6

Molecular Formula: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
Molecular Weight: 249.7



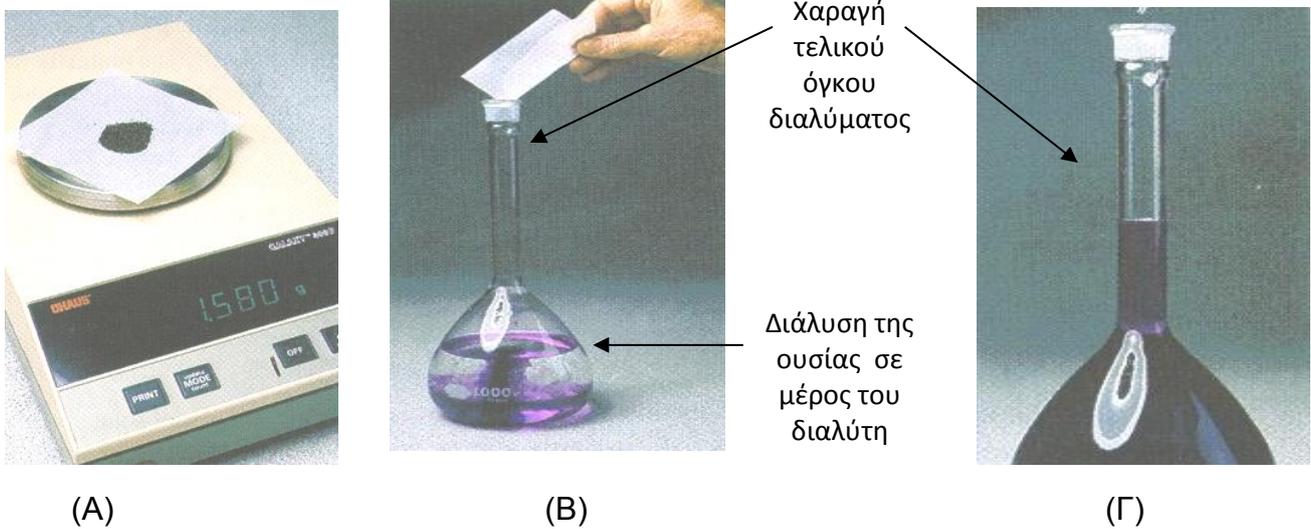
Σχήμα 11. Εύρεση Mr σε αντιδραστήριο του εμπορίου

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:

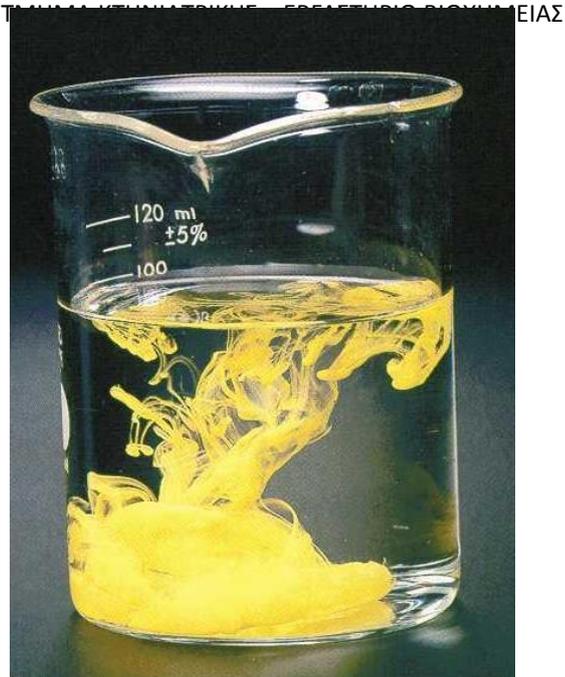
Η διάλυση μιας ή περισσότερων ουσιών, ή η ανάμιξη δύο ή περισσότερων διαλυμάτων, ή ακόμα και συνδυασμός των προηγούμενων πρέπει να γίνεται σε μικρότερο από τον τελικό όγκο του διαλύματος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η διάλυση μεγάλης ποσότητας ουσίας, όπου αν διαλυθεί η ουσία απευθείας στον τελικό 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.



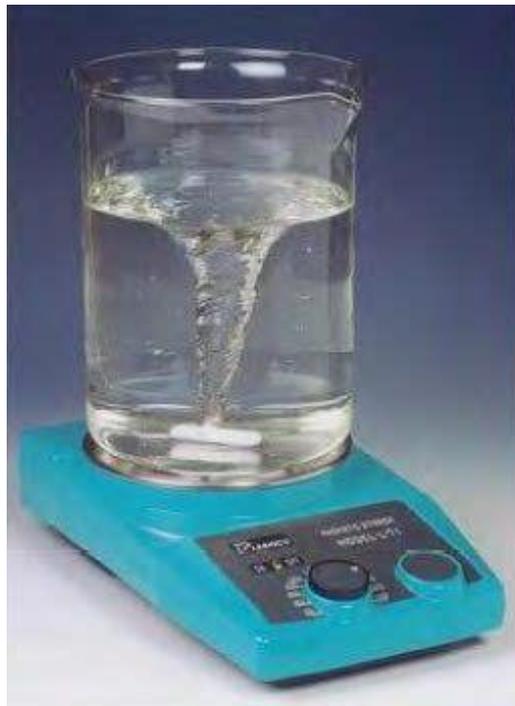
Σχήμα 12. (Α) Σωστή ζύγιση της ουσίας, (Β) Διάλυση της ουσίας σε μέρος του διαλύτη, (Γ) Πλήρωση του διαλύματος με τον διαλύτη μέχρι τελικού όγκου.

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 ανάμιξη 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 ανάμιξη με ανάδευση σε συσκευή που χρησιμοποιεί μαγνήτη ώστε η συγκέντρωση να γίνει ομοιόμορφη στο διάλυμα.

ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Για τη δημιουργία διαλυμάτων όπως αναφέρθηκε στη προηγούμενη ενότητα, θα πρέπει να γίνουν υπολογισμοί για τη συγκέντρωση, το βάρος, τον όγκο κτλ των προς παρασκευή αντιδραστηρίων.

Παρασκευή διαλύματος (το αντιδραστήριο είναι στερεά ουσία):

Οι τύποι που χρησιμοποιούνται για τους υπολογισμούς αυτούς είναι ο τύπος τη συγκέντρωσης $C=n/V$ και ο μοριακός τύπος $n=m/MB$. Από τους δύο αυτούς τύπους συνδυάζοντας τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί εμπειρικά ο

$m = C * V * MB$, όπου m τα γραμμάρια της ουσίας που πρέπει να υπολογιστούν για C την τελική συγκέντρωση σε V τελικό όγκο και MB στο μοριακό βάρος της ουσίας που ζυγίστηκε.

Παρασκευή διαλύματος (το αντιδραστήριο είναι υγρή ουσία ή πυκνό διάλυμα):

Είναι η διαδικασία κατά την οποία προστίθεται σε ένα διάλυμα διαλύτης ή/και άλλα υγρά αντιδραστήρια. Κατά την αραίωση η ποσότητα της διαλυμένης ουσίας (ή του υγρού αρχικού διαλύματος) παραμένει σταθερή ($n_1=n_2$) εφόσον ο διαλύτης είναι απιονισμένο νερό ή δεν αντιδρούν μεταξύ τους οι υγρές ουσίες, ενώ ο όγκος διαλύματος μεγαλώνει $V_2 = V_1 + V_{H_2O}$ και κατά συνέπεια το τελικό διάλυμα θα έχει μικρότερη συγκέντρωση από το αρχικό $C_2 < C_1$.

Κατά την αραίωση ισχύει η σχέση: $C_1V_1=C_2V_2$,

όπου C_1 η αρχική συγκέντρωση της ουσίας προς αραίωση, V_1 ο αρχικός όγκος της ουσίας που λήφθηκε από το αρχικό πυκνό διάλυμα, C_2 η τελική συγκέντρωση στο V_2 τελικό όγκο του διαλύματος.

Σε περιπτώσεις όπου τα αντιδραστήρια αντιδρούν μεταξύ τους (πχ δράση 3ασθενές οξύ με ισχυρή βάση για παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος) ή η υγρή ουσία διίστανται λόγω του ότι μπορεί να είναι δισθενής, τρισθενής κτλ κατά τη διάλυσή της (πχ πυκνόθειικό οξύ όπου και τα τελικά μοι διαφέρουν), τότε συνίστανται οι διαφορικές χημικές εξισώσεις για τον υπολογισμό τελικής συγκέντρωσης.

Υπολογισμός περιεκτικότητας διαλυμάτων

Επί τοις εκατό βάρος κατά βάρος (% w/w ή % κ.β.)

Η έκφραση αυτή δηλώνει τα γραμμάρια μιας χημικής ουσίας που είναι διαλυμένα σε 100g διαλύματος. Η % w/w περιεκτικότητα χρησιμοποιείται συνήθως σε διαλύματα στερεών σε υγρά ή στερεών σε στερεά (κράματα) επειδή τα στερεά περιγράφονται επιτυχέστερα με τη μάζα τους.

$$\frac{\text{μάζα ουσίας (g)}}{100\text{g διαλύματος}}$$

Επί τοις εκατό βάρος κατ' όγκο (% w/v ή % κ.ό.)

Η έκφραση αυτή δηλώνει τα γραμμάρια μιας χημικής ουσίας που είναι διαλυμένα σε 100 mL διαλύματος. Η % w/v περιεκτικότητα χρησιμοποιείται κυρίως για να περιγράψει διαλύματα στερεών σε υγρά.

$$\frac{\text{μάζα ουσίας (g)}}{100\text{mL διαλύματος}}$$

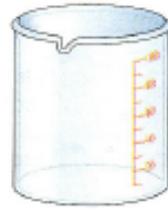
Επί τοις εκατό όγκο κατ' όγκο (% v/v ή % κ.ό. ή % vol ή αλκοολικοί βαθμοί (°))

Η έκφραση αυτή δηλώνει τα mL μιας χημικής ουσίας, συνήθως υγρής, που είναι διαλυμένα σε 100 mL διαλύματος. Η % v/v περιεκτικότητα χρησιμοποιείται κυρίως σε διαλύματα με αλκοόλη και στα αέρια μίγματα.

$$\frac{\text{όγκος ουσίας (mL)}}{100\text{mL διαλύματος}}$$

ΟΡΓΑΝΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΟΜΑΔΑ	
100ml	
50ml	
25ml	
10ml	



Πατήρι ζέσεως

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

ΟΜΛ	
250	
150	
100	
50	
25ml	

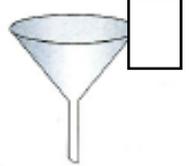
Σιφώνια

ΟΜΑΔΑ	

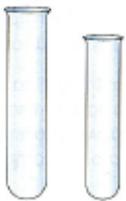


Ογκομετρική φιάλη

ΟΜΑΔΑ	
250ml	
100ml	



Χωνί



Δοκιμαστικοί σωλήνες

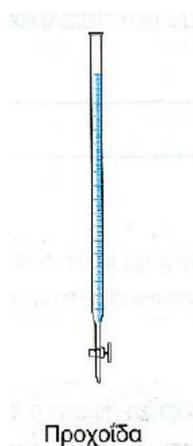
X



Υδροβολέας

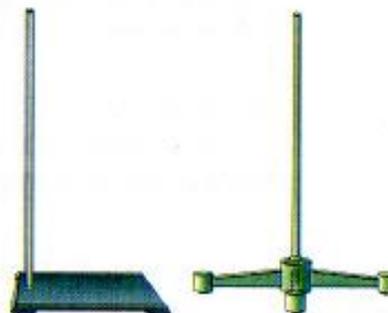


ΟΜΑΔΑ	
ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΠΟΥΑΡ	
ΦΟΥΣΚΑ	
ΒΑΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ	
ΑΝΑΔΕΥΤΗΡΑΣ	
2 ΜΙΚΡΟΠΙΠΕΤΕΣ	
5 ΚΙΟΥΒΕΤΕΣ	



Προχοίδα

X1



Ορθοστάτες

X 1





ΠΕΧΑΜΕΤΡΟ Χ 1



ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ Χ 1

ΑΣΚΗΣΗ 1**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ-ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ****ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

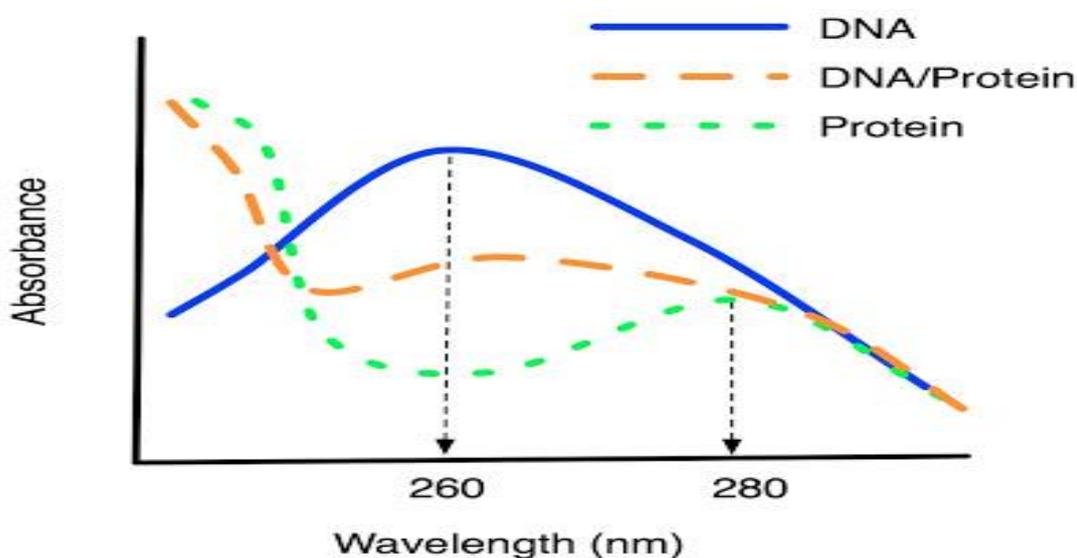
Οι μέθοδοι που στηρίζονται στην απορρόφηση του υπεριώδους φωτός έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα και χωρίς να προστεθεί κανένα αντιδραστήριο στο δείγμα. Δεν απαιτούν επομένως και επώαση του δείγματος. Για την αποφυγή σφαλμάτων, πρέπει όμως να λαμβάνονται υπόψη οι αρχές επάνω 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 φωτόνιο) 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

$A_{260}/A_{280} = \text{μεταξύ } 0,5 - 1,8$

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

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

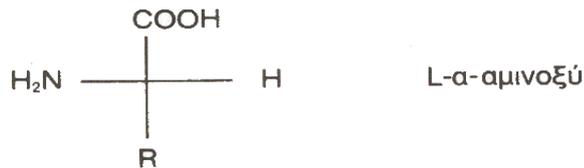
Αυτό σημαίνει ότι το δείγμα σας είναι μολυσμένο με RNA (Επειδή οι βάσεις ουρακίλης U στο RNA απορροφούν περισσότερο φως στα 260 nm από τις βάσεις της θυμίνη T που έχουν αντικαταστήσει)

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

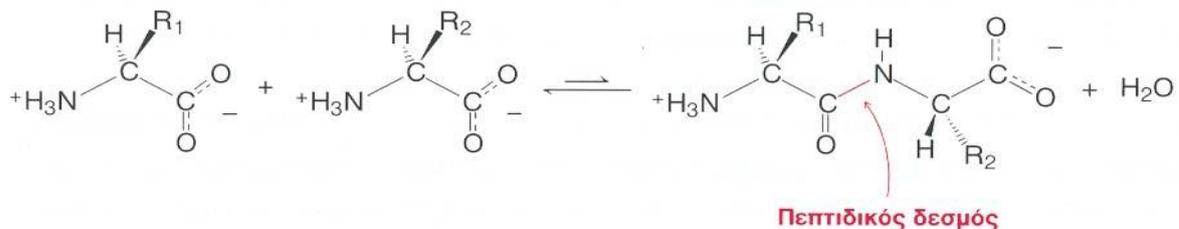
της κάθε μεθόδου, την παρουσία χημικών ενώσεων που παρεμβάλλονται στη μέθοδο και τέλος την ευχέρεια και αξιοπιστία κάθε μεθόδου. Βέβαια, η ευαισθησία της κάθε μεθόδου είναι σχετική, επειδή εν μέρει εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της κάθε πρωτεΐνης. Συχνά για να ποσοτικοποιηθεί μία πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται 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).

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (ΜΕΘΟΔΟΣ Biuret ή διουρίας)

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 σχηματίζεται ανάμεσα στην καρβοξυλομάδα του ενός και την αμινομάδα του άλλου αμινοξέος, ονομάζεται πεπτιδικός δεσμός. Το προϊόν της συμπύκνωσης είναι ένα διπεπτιδίο.



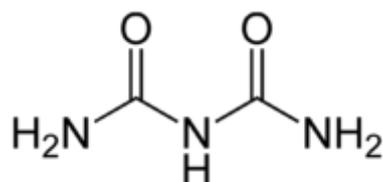
Πολλές τροφές περιέχουν πρωτεΐνες και συνεπώς ο προσδιορισμός τους είναι εξίσου σημαντικός όσο και ο ρόλος τους. Παρακάτω εκτίθενται μερικοί τρόποι για την ανίχνευση πρωτεϊνών των τροφών. Όλες οι μέθοδοι στηρίζονται σε χαρακτηριστικές αντιδράσεις των πρωτεϊνών με ορισμένα χημικά αντιδραστήρια.

Αναλυτικότερα:

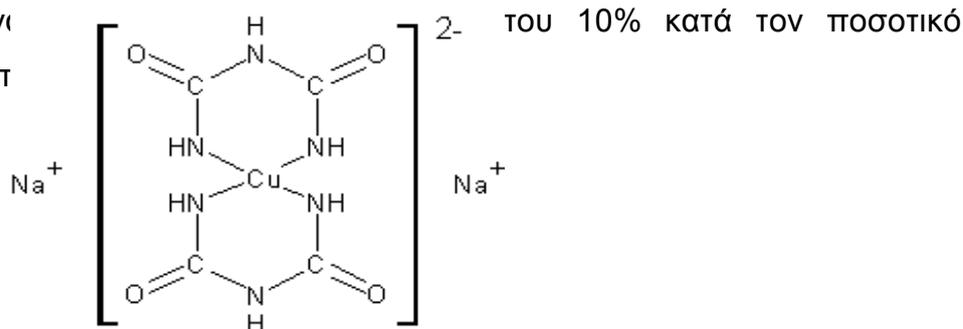
- ♦ Οι πρωτεΐνες σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζουν με ιόντα χαλκού Cu^{++} συμπλοκές έγχρωμες χημικές ενώσεις (αντίδραση Biuret ή διουρίας) από τις οποίες δύνανται να προσδιορισθούν χρωματομετρικά.
- ♦ Με την προσθήκη πυκνού νιτρικού οξέος σε πρωτεΐνες παράγεται χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα που γίνεται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

Αρχή Προσδιορισμού Πρωτεϊνών με την Μέθοδο της Διουρίας ή Biuret

Ουσίες που περιέχουν τουλάχιστον δυο πεπτιδικούς δεσμούς (άρα τριπεπτίδιο) 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 τριπεπτίδιο. Τα φάσματα απορρόφησης των συμπλοκών διαφορετικών πρωτεϊνών είναι παρόμοια και όχι πανομοιότυπα. Η μέθοδος είναι πιο αξιόπιστη αλλά ταυτόχρονα έχει μικρότερη ευαισθησία από την μέθοδο Bradford για την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με μικρή απόκλιση μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνών. Συνήθως η καζεΐνη του γάλακτος χρησιμοποιείται σαν πρότυπο για όλες τις συνηθισμένες πρωτεΐνες χωρίς να προσδιορισμό των π



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

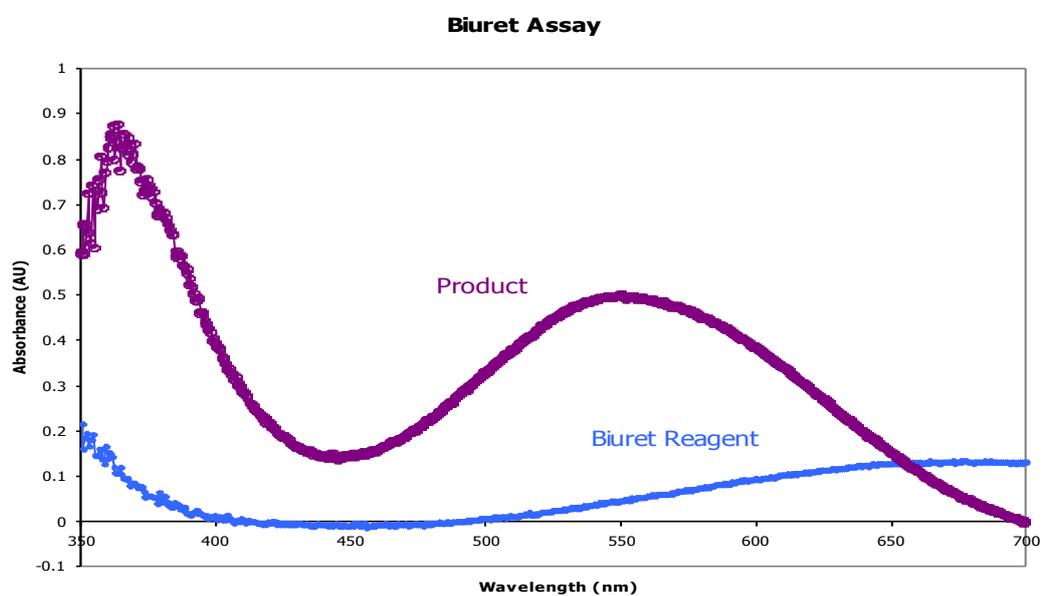
1ml διαλύματος αλβουμίνης 1% κ.ο.	1 ml διαλύματος Γλυκίνης 1% κ.ο	1 ml απιονισμένο νερό
2-3 σταγόνες διαλύματος CuSO_4 , τρυγικού Na-K, NaOH	2-3 σταγόνες διαλύματος CuSO_4 , τρυγικού Na-K, NaOH	2-3 σταγόνες διαλύματος CuSO_4 , τρυγικού Na-K, NaOH

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 δείγματος
dH ₂ O	2 ml	1.9 ml	1.8 ml	1.6 ml	1 ml	0 ml	0 ml
Διά/μα 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 (ml)</i>	<i>Τελική συγκέντρωση (g/ml)</i>	
0.0		
0.1		
0.2		
0.4		
1		
2		
Άγνωστο Δείγμα		

2. Υπολογίστε τις τελικές συγκεντρώσεις της αλβουμίνης.
3. Γιατί η γλυκίνη δε δίνει θετική αντίδραση;
4. Μια πρωτεΐνη υποβάλλεται σε υδρόλυση. Πως θα διαπιστώσετε ότι στο τέλος της αντίδρασης έχει μείνει ποσότητα πρωτεΐνης που δεν έχει υδρολυθεί;
5. Σας δίνονται δοκιμαστικοί σωλήνες οι οποίοι περιέχουν διάφορα πεπτίδια. Ένας από τους σωλήνες αυτούς περιέχει ένα διπεπτίδιο, ενώ άλλοι περιέχουν πολυπεπτίδια. Πως θα διαπιστώσετε ποιος σωλήνας περιέχει το διπεπτίδιο;
6. Φτιάξτε πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας τα πρότυπα διαλύματα
7. Προσδιορίστε τη συγκέντρωση πρωτεϊνών στον ορό αίματος του αγνώστου δ/τος που σας δόθηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη που φτιάξατε.

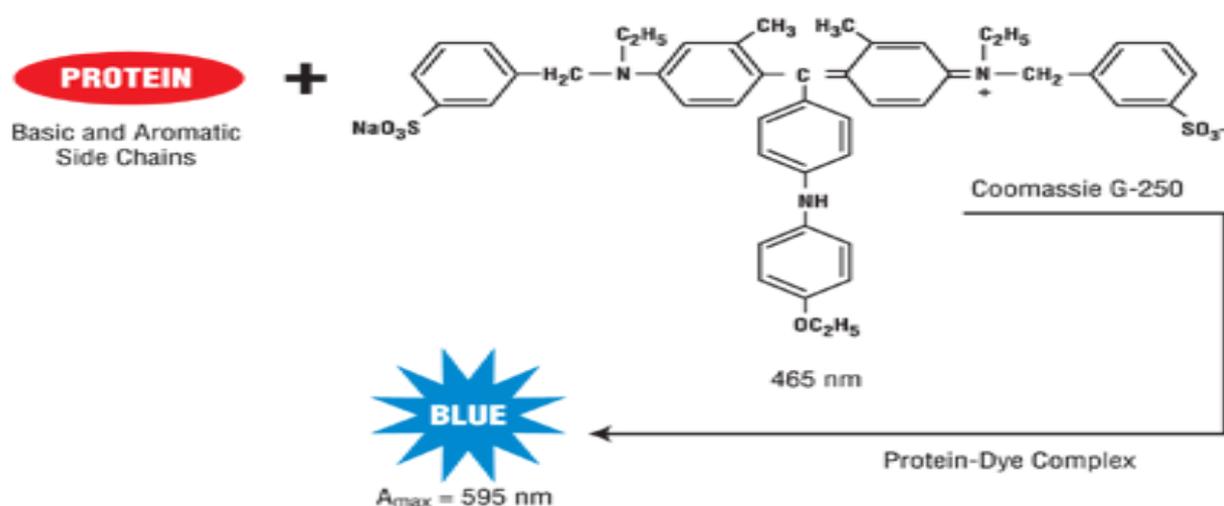
Αναφορές

- 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., Γιουψάνη 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

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.

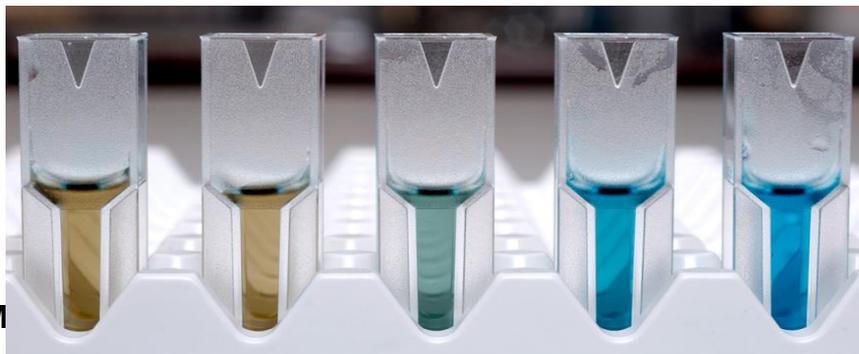


Η μέθοδος αυτή έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

- ✓ 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.

Η χρωστική αλληλοεπιδρά σε διάφορα σημεία της πρωτεΐνης (σημεία με βασικά και αρωματικά αμινοξέα) ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων. Καθώς οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών είναι διαφορετικές πρωτεΐνες δίνουν διαφορετικές απορροφήσεις. Αντίθετα λοιπόν με την μέθοδο της Διορίας και παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι αυστηρά ποσοτική

Τα δείγματα πρέπει να ανακινούνται και ύστερα από μερικά λεπτά μετρίεται 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)



B. ΠΕΙΡΑΜΑ

Παρασκευή του αντιδραστηρίου Bradford:

Διαλύονται 0,2 g Coomassie Brilliant Blue G250 σε 200 ml H_3PO_4 85%. Αναδεύεται καλά για μία νύχτα και στη συνέχεια αραιώνεται με dH_2O 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

6 Δοκιμαστικοί Σωλήνες
 Στήριγμα Δοκιμαστικών Σωλήνων
 Φωτόμετρο
 1 κυψελίδα (επαναλαμβανόμενη χρήση)
 Σιφώνια 1, 2, 5 ml

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΥΛΙΚΑ

Πρότυπο Αλβουμίνης Βόειου Ορού (Bovine Serum Albumin-BSA) **C=1mg/ml**
 Έτοιμο αντιδραστήριο **Bradford** \approx 30ml/ομάδα
 Άγνωστο διάλυμα

Αραιώνετε το αρχικό διάλυμα των 1ml, **BSA 1mg/ml** (Αλβουμίνης Βόειου Ορού Bovine Serum Albumin- BSA), που πήρατε προσθέτοντας άλλα 24ml dH_2O 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	

Αφού δημιουργηθούν τα παραπάνω διαλύματα, **τότε και μόνο τότε** αρχίζετε να προσθέτετε το αντιδραστήριο Bradford

Το αντιδραστήριο Bradford φυλάσσεται σε σκιερό μέρος.

<i>Αντ. Bradford</i>	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 κυψελίδες 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
- 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.
- Τάσος Οικονόμου, Μαρία Μαρκάκη, Έλενα Κουιμτζόγλου, **Τετράδιο εργαστηριακού μαθήματος (ΒΙΟ116) - 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 pK_a 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.

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

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι η pK_a 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 $pK_a \pm 1$ μιας ομάδας, η ομάδα αυτή δρα σαν ρυθμιστής του pH του διαλύματος.

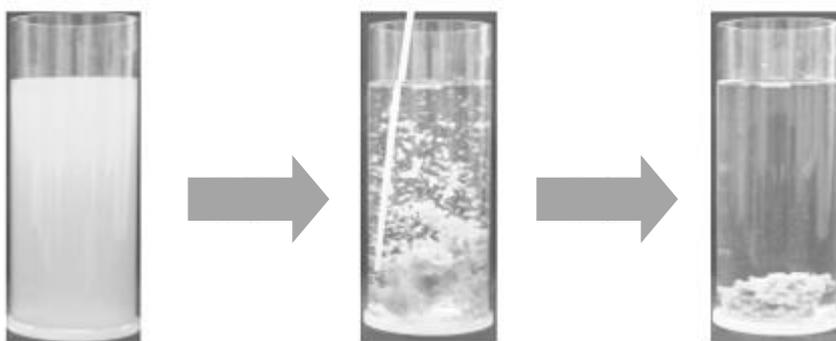
Σημειώστε ότι οι όξινες ομάδες είναι ιονισμένες σε $pH >$ από την pK_a τους, ενώ οι βασικές ομάδες είναι ιονισμένες σε $pH <$ από την pK_a τους.

Πίνακας 1. Ομάδες αμινοξέων που ιονίζονται σε πρωτεΐνες

Ομάδα	Οξύ	Βάση	Χαρακτηριστική pK_a
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 πήζει.



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 και CH_3COONa **1M**, καθώς και διάλυμα καζεΐνης **0.25% 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 την πρωτεΐνη θα δημιουργήσετε διαλύματα τα οποία περιέχουν διαφορετικές ποσότητες των πιο πάνω διαλυμάτων, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί. Τα διαλύματα στους πέντε σωλήνες έχουν διαφορετικά pH λόγω των διαφορετικών συγκεντρώσεων CH_3COOH και CH_3COONa .

Τα διαλύματα CH_3COOH , CH_3COONa , προσθέτονται **πρώτα** και οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται για να δημιουργηθεί το σωστό ρυθμιστικό διάλυμα με το ακριβές pH.

Έπειτα προσθέτονται οι αντίστοιχες ποσότητες της πρωτεΐνης.
(με την σειρά που δίνονται στον πίνακα).

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

- ➔ **1.** Προσθέστε την **καζεΐνη** στους σωλήνες 1-5 και παρατηρήστε σε **ποιο σωλήνα εμφανίζεται πρώτα το ίζημα.**

Διάλυμα/Σωλήνας	1	2	3	4	5
CH_3COOH 0.5M	7,8	7,2	5	1,8	0,8
CH_3COONa 0.5M	0,2	0,8	3	6,2	7,2
Καζεΐνη 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 ($\text{pK}_a \text{ CH}_3\text{COOH} = 4.75$). Συμπληρώστε τις τιμές στους πίνακες.

Σωλήνας	1	2	3	4	5
Βήμα 4. Συγκέντρωση CH_3COOH σε M					
Συγκέντρωση CH_3COONa σε M					
Τιμή pH					

Παρατηρήστε τα σωληνάκια και δώστε τα σχόλια σας σχετικά με το ισοηλεκτρικό σημείο της καζεΐνης.

Αναφορές

- Löffler G. (2007), **Βασικές Αρχές Βιοχημείας με στοιχεία παθοβιοχημείας.**, 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., Καραγιωργα Α., Ασβεστά Σ. (2004), **Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας.** Εκδόσεις Ζήτη (σ. 42-44)

ΑΣΚΗΣΗ 4

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:

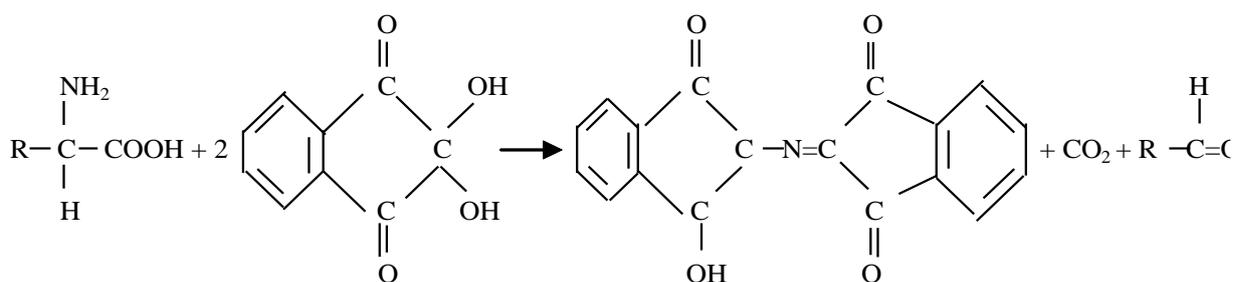
- I) την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό αμινοξέων με την χρωστική δοκιμή της νινυδρίνης
- II) τον διαχωρισμό αμινοξέων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Διάφορες χρωστικές αντιδράσεις χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ελευθέρων 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 και 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 ης 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 στιβάδας (Thin Layer Chromatography – TLC) και ταυτοποίηση τους μέσω της τιμής R_f

Στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας η *στατική φάση* είναι ένα προσροφητικό όπως ξηροπηκτή 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 εναποτεθείσες 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 προπανόλης (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 παραμείνει 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 ΑМИΝΟΞΕΩΝ ΜΕ TLC

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

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

TLC:

R_f Γλυκίνη (Gly, G):

R_f Μεθειονίνης (Met, M):

R_f Αργινίνη (Arg, R):

R_f Τυροσίνη (Tyr, Y):

R_f 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 R_f.

Γλυκίνη:

Μεθειονίνη:

Τυροσίνη :

3. Δικαιολόγηση τιμής R_f:

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

ΑΣΚΗΣΗ 5

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

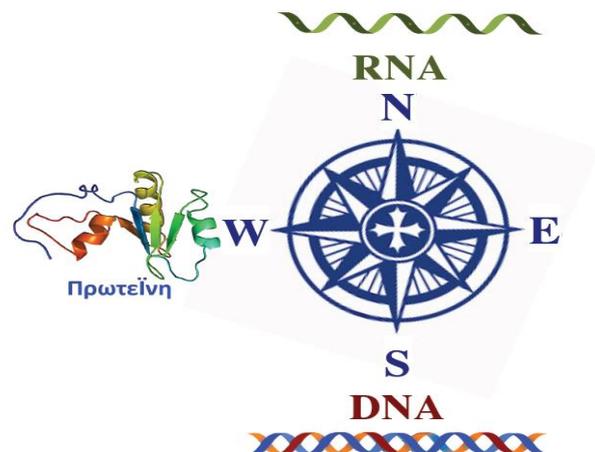
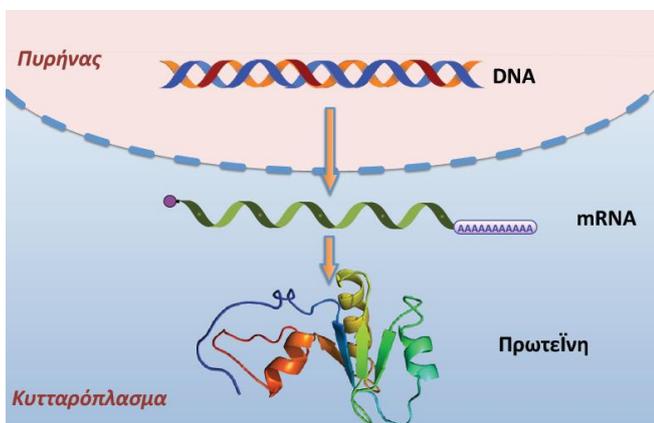
Η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει όλες τις διεργασίες κατά τις οποίες φορτισμένα μόρια κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία. Κάθε πρωτεΐνη έχει ένα χαρακτηριστικό pI ισοηλεκτρικό σημείο. Σε συγκεκριμένο pH λοιπόν θα είναι θετικά (θετικά φορτία > αρνητικά φορτία), αρνητικά φορτισμένη (αρνητικά φορτία > θετικά φορτία), 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 υδατικό 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.

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

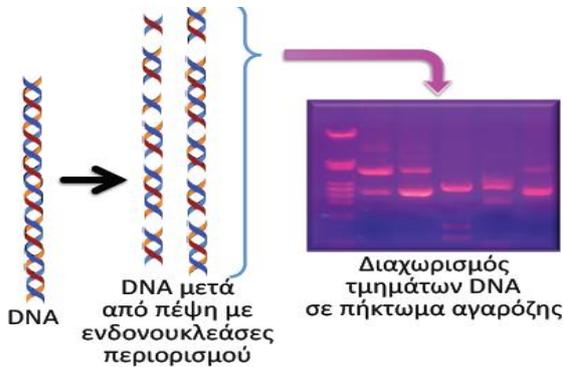
Έτσι η κινητικότητα αυξάνεται με την εφαρμοζόμενη τάση ή το φορτίο και μειώνεται με την τριβή λόγω του σχήματος, του μεγέθους και του μέσου μέσα στο οποίο κινείται το σωματίδιο.



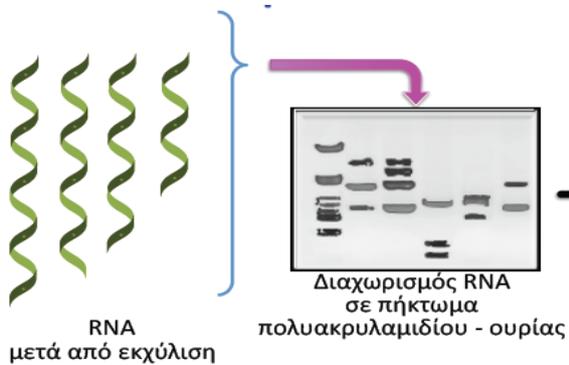
Οι βασικές μέθοδοι ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών, αποτελούν:

- 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

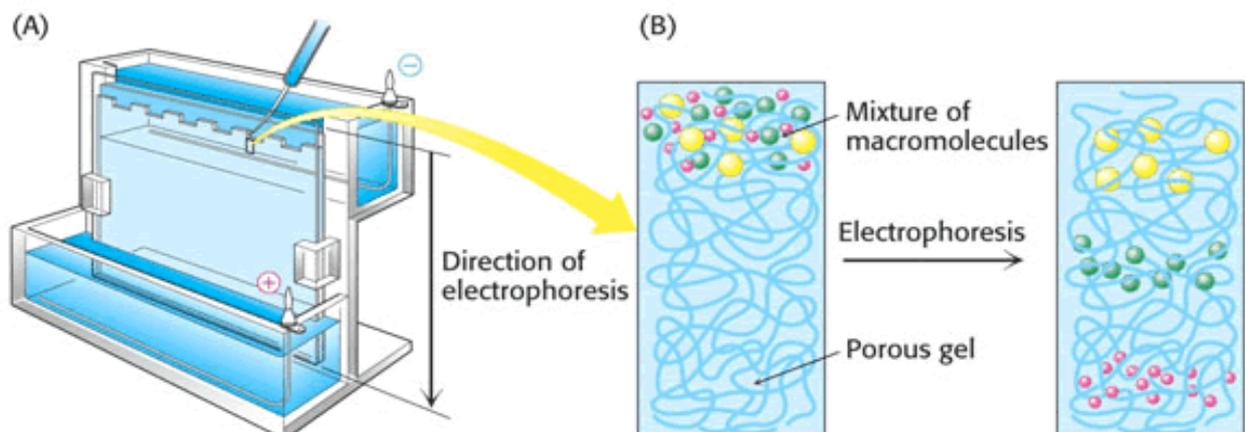
1. Ανάλυση κατά Southern: DNA (πήκτωμα αγαρόζης)

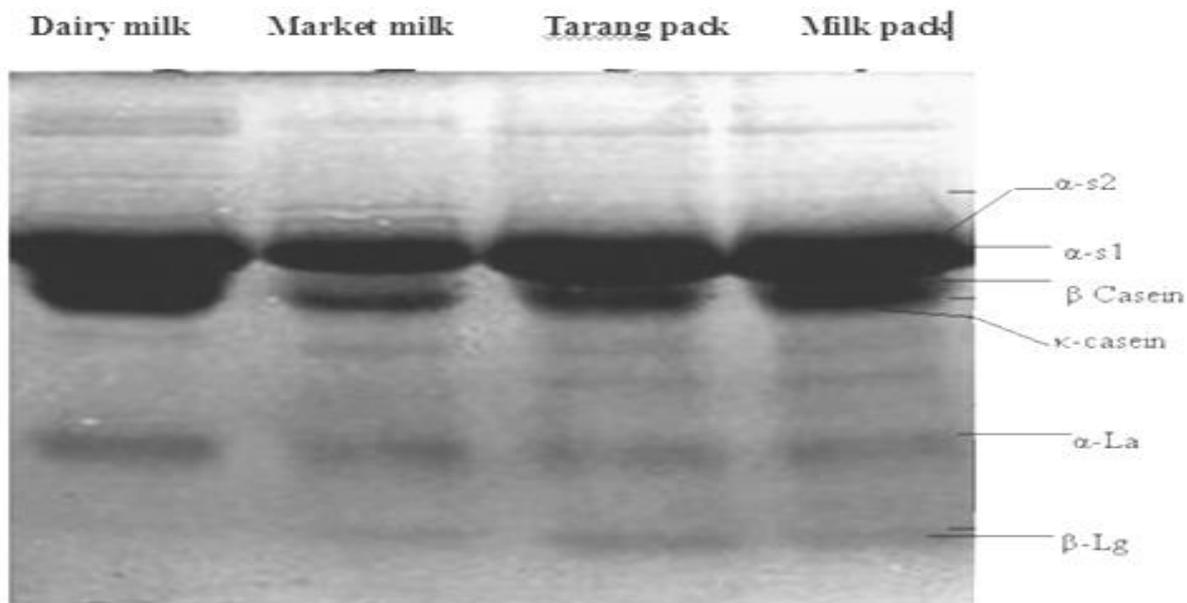


2. Ανάλυση κατά Northern: RNA (πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου)



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 επιλεγθεί 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 πηκτή 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 πηκτή από το μπάνιο και βάλτε την στο πλαίσιο πηκτής (gel frame).
- 8) Τοποθετείστε την πηκτή στο μονιμοποιητικό διάλυμα 1 (**1 Fix 30%** μεθανόλη - 20% οξικό) για 3 min (ανακατεύοντας κάθε 1 λεπτό).
- 9) Στεγνώστε την πηκτή εντελώς στον στεγνωτήρα στους 80°C για ~ 20 min.
- 10) Τοποθετείστε την πηκτή στην μπλε χρωστική (**2 Stain**) για 3 min (ανακατεύοντας κάθε 1 λεπτό).
- 11) Βγάζουμε τη πηκτή από το δοχείο της χρωστικής και στραγγίζουμε όλη την περίσσια χρωστικής στο δοχείο και σε απορροφητικό χαρτί.
- 12) Τοποθετείστε την πηκτή 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 πηκτή (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 ζωών
2. Επισυνάψτε το ηλεκτροφόρημα που πήρατε ή μια φωτοτυπία

ΠΕΙΡΑΜΑ 2^ο - 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).

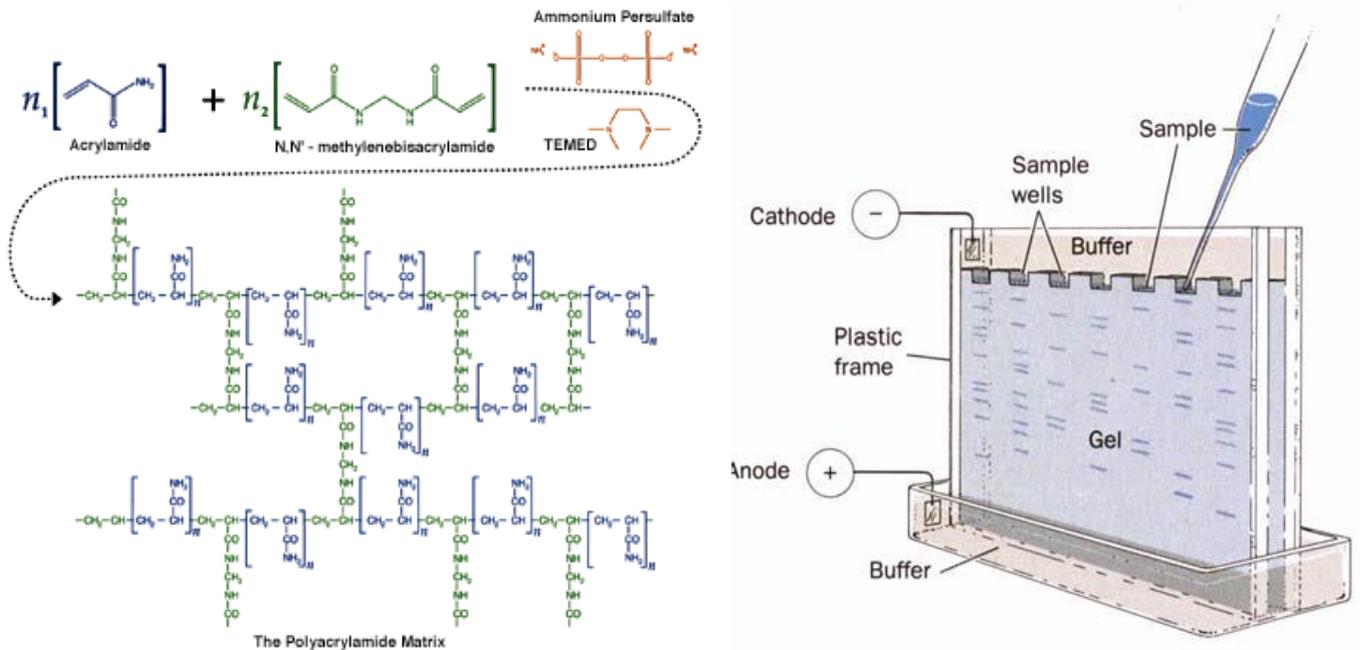
$$u = Ez / f$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez 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 ενδιαμέσου 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,N-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.

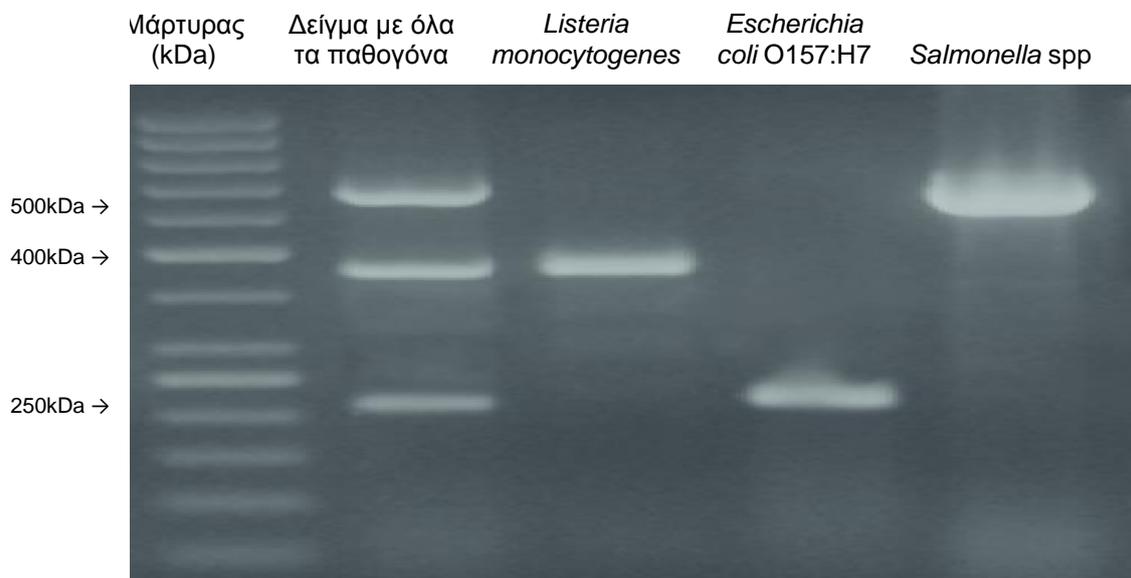
Χρώση με χρωστική Coomassie Brilliant Blue (CBB)

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:

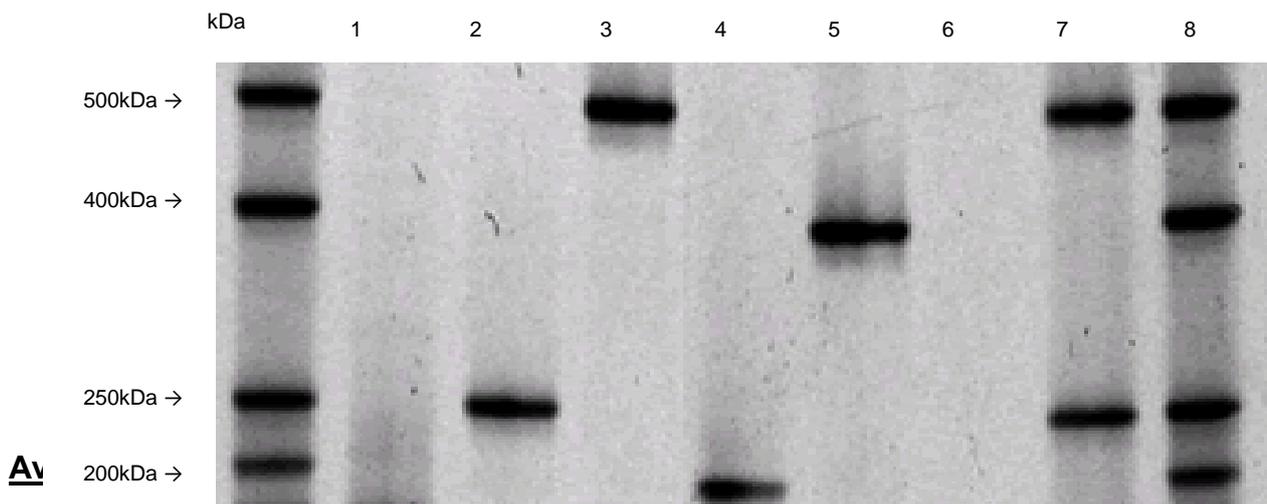
1. Από την ηλεκτροφόρηση που κάνατε βρείτε ποιον από τους ορούς είχατε σαν ομάδα και αιτιολογήστε.

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)



Av

- **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 6

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ (ΜΕΡΟΣ Ι)

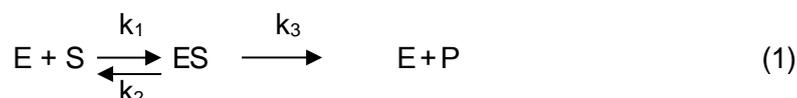
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

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, γνωστής 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 συμπαραγοντες 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 αντίδρασης, 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 υπόστρωμα 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:

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

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 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 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 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 $[E_T] = [E_{\text{ελεύθερο}}]$.

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 μετατρέπει σε προϊόν. Διακρίνονται σε αντιστρεπτούς και μη-αντιστρεπτούς.

Οι μη-αντιστρεπτοί αναστολέες, όπως είναι οι οργανικές ενώσεις φωσφόρου και υδράργυρου, τα κυανιούχα, το μονοξείδιο 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 (διϊσοπροπυλοφωσφοφορίδιο) 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 διαπίδωση. 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 $K^{app}_M = K_M (1 + [I]/K_i)$) 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 K_M 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 εξήγησή 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).

ΜΕΡΟΣ 1°

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης απορροφητικότητας της π-νιτροφαινόλης στα 405nm

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

Αντιδραστήρια	-	Υλικά-Όργανα
Buffer περίπου 30 ml		Δοκιμαστικοί σωλήνες (7)
π-νιτροφαινόλη 1mM περίπου 2ml		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 αποτελέσματα σας (A₄₀₅). 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 R².

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 7

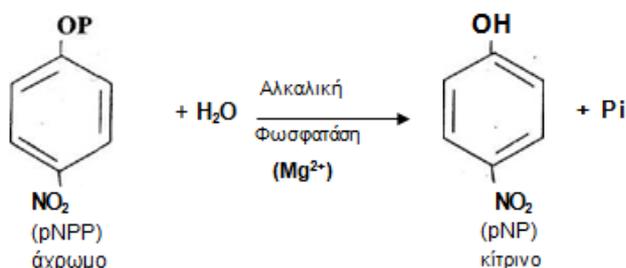
ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ (ΜΕΡΟΣ ΙΙ)

ΜΕΡΟΣ 2^ο

Κατασκευή διαγράμματος Lineweaver-Burk ή του διπλού αντιστρόφου

3. π-νιτροφαινυλ-φωσφορικό (pNPP) (δινатριο 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 βοός). 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.

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		Παραφιλμ (8) κομματάκια για την ανάδευση των κυψελίδων
Ένζυμο 5μg/ml περίπου 1ml		Υδατόλουτρο

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

ΟΛΑ ΤΑ ΔΙΑΛΥΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΙ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΣΑΣ ΔΙΝΟΝΤΑΙ ΕΤΟΙΜΑ, ΕΞΕΙΣ 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)									
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	-

ΟΙ ΜΟΝΕΣ 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 ΕΧΟΝΤΑΣ ΕΤΟΙΜΟ ΚΑΠΟΙΟ ΧΡΟΝΟΜΕΤΡΟ, ΤΟΤΕ ΚΑΙ ΜΟΝΟ ΤΟΤΕ ΘΑ ΒΑΛΑΤΕ ΣΤΟΝ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΣΩΛΗΝΑ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ (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

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.
- **ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΟΙ ΜΟΝΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΘΑ ΕΤΟΙΜΑΣΟΥΝ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΟΥΝ ΤΑ 2' ΚΑΙ 4' ΑΠΟ ΒΡΑΣΜΕΝΟ ΕΝΖΥΜΟ, ΕΝΩ ΟΙ ΖΥΓΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΤΑ 6' ΚΑΙ 8'**

Το ένζυμο προσθέτεται 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 αποτελέσματά 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



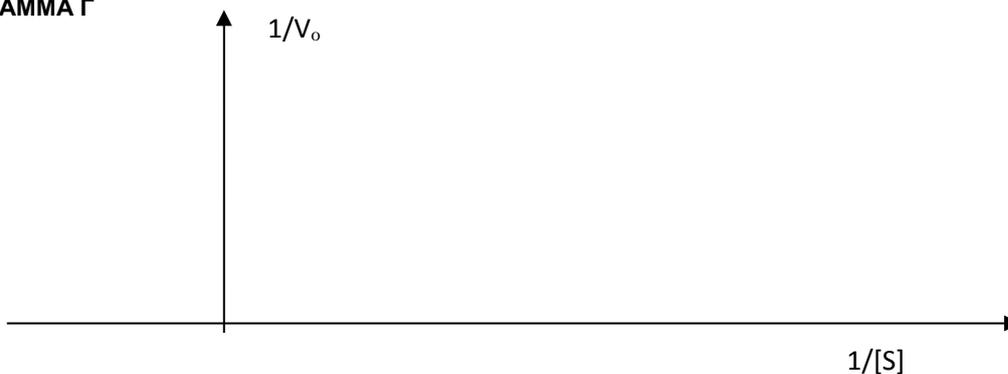
ΠΙΝΑΚΑΣ Β

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

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Β



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Γ



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				

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Δ



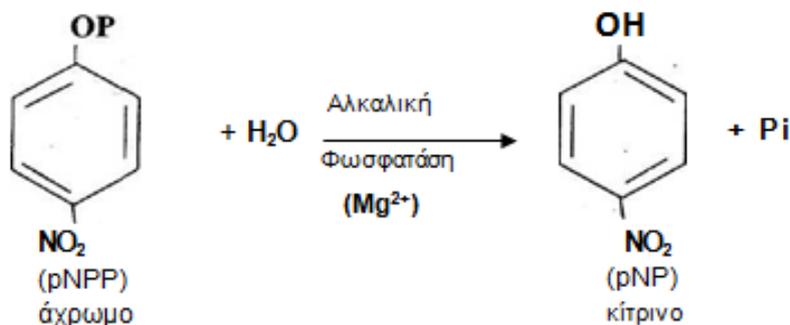
ΑΣΚΗΣΗ 8

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ (ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ)

ΜΕΡΟΣ 3^ο

Προσδιορισμός ενζυμικής συγκέντρωσης διαλύματος

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ:



- 3π-νιτροφαινυλ-φωσφορικό (pNPP) (δινατριο άλας διαλυμένο σε Buffer): **50mM**.
- Ένζυμο **Αλκαλική φωσφατάση**, εμπορικό παρασκεύασμα ενζύμου από την εντερική βλεννογόνο βόος
(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 50mM		Σιφώνια πλήρωσης 1ml, 2ml και 5ml
Ένζυμο Αλκαλική φωσφατάση:		Πάγος
Δίνονται έτοιμα τα 20μg/ml, 10μg/ml		Φωτόμετρο (ρύθμιση στα 405nm)
Παρασκευάζετε τα 15μg/ml, 10μg/ml, 8μg/ml, 5μg/ml, 3μg/ml, 1μg/ml, 0.5μg/ml		κυψελίδες (1)
		Παραφίλμ, κομματάκια για την ανάδευση των κυψελίδων
Άγνωστης συγκέντρωσης ένζυμο		

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	Άγνωστο
										
Buffer pH 9,5 (ml)	2,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2
pNPP 50mM (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<p>ΑΦΟΥ ΕΤΟΙΜΑΖΕΤΕ ΤΑ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΜΗΔΕΝΙΖΕΤΕ ΣΤΟ ΚΕΝΟ ΚΑΙ ΠΡΩΤΑ ΦΩΤΟΜΕΤΡΕΙΤΕ ΤΟ ΤΥΦΛΟ (T) (ΤΟΝ ΣΩΛΗΝΑ ΔΗΛΑΔΗ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΕΝΖΥΜΟ) ΣΤΑ 405nm</p> <p>ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΙΤΕ ΜΕ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΣΑΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΕΧΟΝΤΑΣ ΕΤΟΙΜΟ ΚΑΠΟΙΟ ΧΡΟΝΟΜΕΤΡΟ, ΚΟΙΤΩΝΤΑΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΝΟΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΠΟΜΕΝΟ ΠΙΝΑΚΑ 3, ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΧΡΟΝΟΥΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΙΣ,</p> <p>ΤΟΤΕ ΚΑΙ ΜΟΝΟ ΤΟΤΕ ΘΑ ΒΑΛΑΤΕ ΣΤΟΝ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΣΩΛΗΝΑ ΤΟ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΈΝΖΥΜΟ (ΜΕΤΡΑΤΕ ΕΝΑ ΣΩΛΗΝΑ ΤΗΝ ΦΟΡΑ)</p> <p>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	20μg/ml	15μg/ml	10μg/ml	8μg/ml	5μg/ml	3μg/ml	1μg/ml	0,5μg/ml	Άγνωστο
Ποσότητα σε ml	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ (ml)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

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

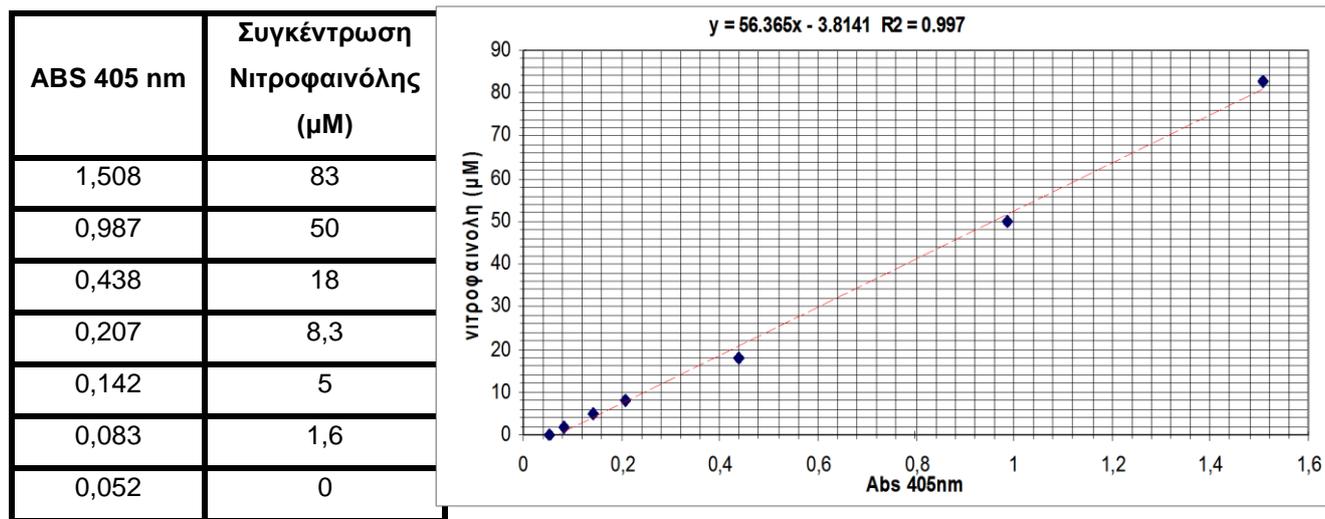
Χρόνος t (sec)	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180
ABS Σωλήνας 1ος												
Χρόνος t (sec)	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
ABS Σωλήνας 2ος												
Χρόνος t (sec)	60	120	160	180	210	240	270	300	330	360	390	420
ABS Σωλήνας 3ος												
Χρόνος t (sec)	60	90	120	180	240	300	330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

ΑΣΚΗΣΗ 9

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 \rightarrow 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:

$$(C_2 - C_1)_{\text{Αντ}} = -(C_2 - C_1)_{\text{Πρ}}$$

Άρα στην ίδια διάφορα χρόνου

$$(C_2 - C_1)/(t_2 - t_1)_{\text{Αντ}} = -(C_2 - C_1)/(t_2 - t_1)_{\text{Πρ}}$$

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 τιμή 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) μmol/L, υπολογισμός C_r (συγκέντρωση αντιδρώντος) και αρχικής ταχύτητας V₀.

C_r (συγκέντρωση αντιδρώντος) υπολογίζεται από

$$C \text{ Αρχική συγκέντρωση αντιδρώντος στον σωλήνα} - C \text{ συγκέντρωση προϊόντος στον σωλήνα}$$

Για τον Σωλήνα 2 ισχύει:

$$1.61 \text{ mM- C προϊόντος} = 1610 \text{ μM- C προϊόντος}$$

(προσοχή μπορεί να έχετε διαφορετική αρχική Συγκέντρωση αντιδρώντος)

Σωλήνας 2	Συγκέντρωση Προϊόντος	Συγκέντρωση Αντιδρόντως	ΔC Αντιδρόντως	t(min)	Δt	V ₀
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:

$$0,32 \text{ mM- C προϊόντος} = 320 \text{ μM- C προϊόντος}$$

(προσοχή μπορεί να έχετε διαφορετική αρχική Συγκέντρωση αντιδρώντος)

Σωλήνας 4	Συγκέντρωση Προϊόντος	Συγκέντρωση Αντιδρόντως	ΔC Αντιδρόντως	V ₀
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:

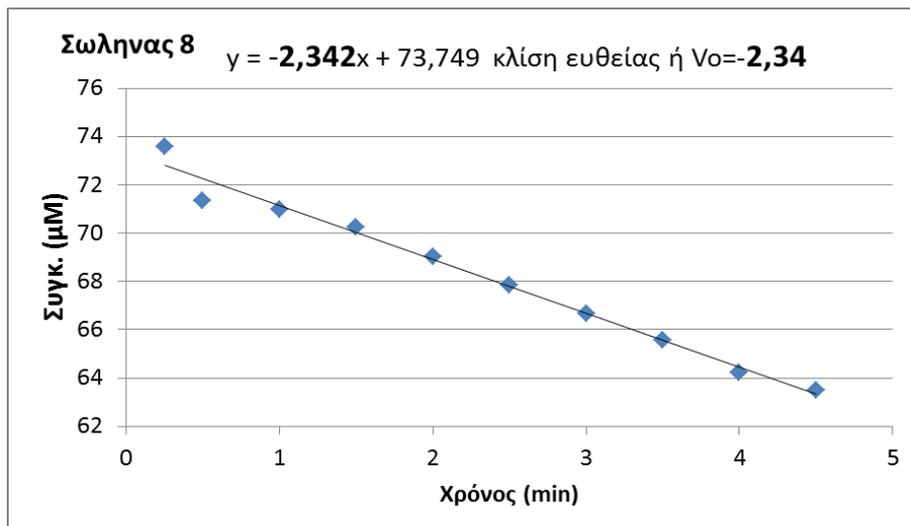
0,0805 mM- C προϊόντος =80,5 μM- C προϊόντος

(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 $Y=a*X+b$ όπου Y = Συγκέντρωση και X = Χρόνος, άρα για τον σωλήνα 8 ισχύει:

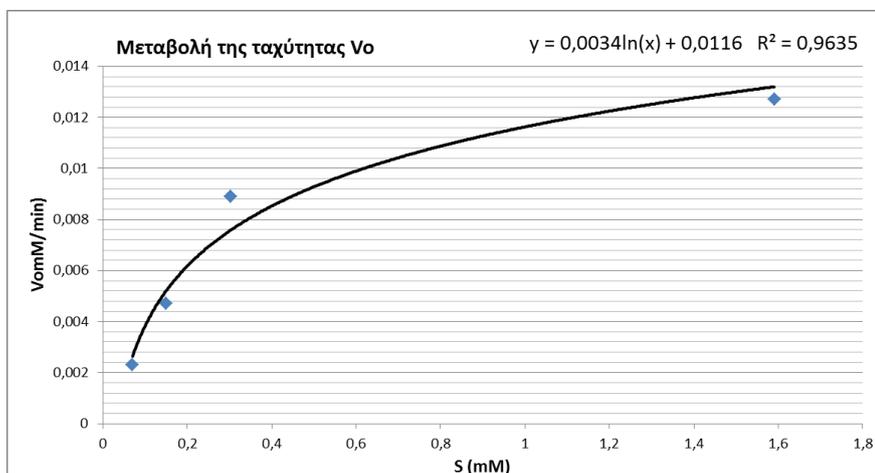
Σωλήνας	8
	Συγκ.
t(min)	Αντιδρόντως
0,25	73,584
0,5	71,328
1	70,9896
1,5	70,2564
2	69,0156
2,5	67,8312
3	66,6468
3,5	65,5752
4	64,2216
4,5	63,4884



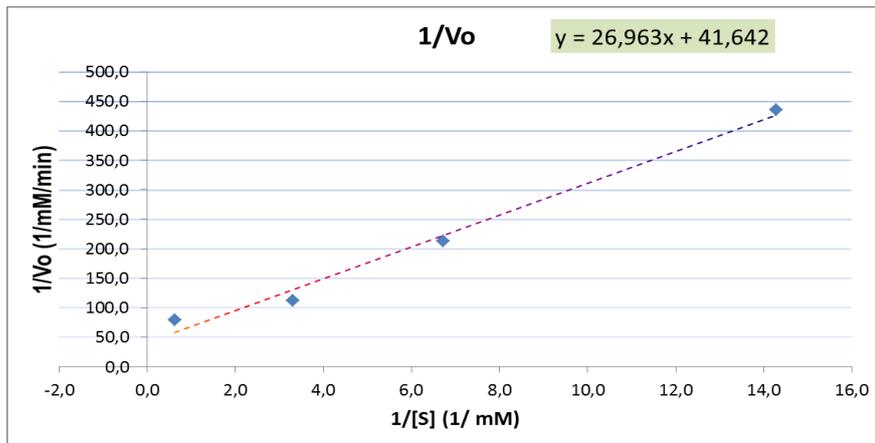
Όταν όλα τα (παραπάνω) δεδομένα είναι διαθέσιμα, μπορούμε να κατασκευάσουμε τον τελικό πίνακα με τα δεδομένα:

Σωλήνας	[S] mM	V_0 [mM/min]	1/S	1/ V_0
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_0 σε mM/min (ψ άξονας) σε σχέση με την μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος S (χ άξονας).



Σχεδιάστε ένα άλλο διάγραμμα χρησιμοποιώντας τις τιμές $1/V_0$ 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:

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

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

$$1/V_{max}=41,6 \rightarrow V_{max}= 20.33 \text{ mM/min}$$

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

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

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

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

Γνωρίζοντας ότι στις ενζυμικές αντιδράσεις $\Delta C/\Delta t = U = K_{cat}[ES] = k_2[ES]$

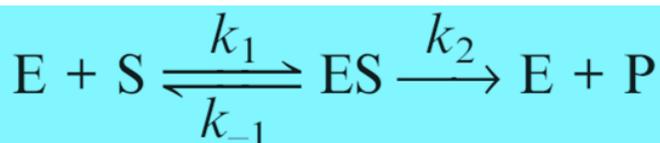
$[ES]$ = Συγκέντρωση συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος

Θεωρία των Michaelis – Menten (παραδοχή αποκατάστασης ισορροπίας)

Βασίζεται στη γενική παραδοχή ότι έχει αποκατασταθεί μια ισορροπία στο σύστημα.

Οι σημαντικές παραδοχές είναι οι εξής:

Η αντίδραση μεταξύ του E και του S δημιουργεί ταχύτατα το σύμπλοκο ES,



το οποίο παραμένει σε ισορροπία και οποιαδήποτε επίδραση της δεύτερης αντίδρασης $ES \rightarrow E + P$ στην πρώτη θεωρείται αμελητέα άρα ταχύτητα εξαρτάται αποκλειστικά από την συγκέντρωση [ES] η οποία εξαρτάται μόνο από την συγκέντρωση του [E] που προσθέτετε στο διάλυμα αφού η συγκέντρωση του υποστρώματος [S] είναι σε περίσσια και όλο το E που προσθέτετε στο διάλυμα προσδένεται στο S και **μετατρέπεται (λόγω χαμηλής Km) σε ES**.

Λάβετε υπόψη ότι η Αλκαλική φωσφατάση με Mr 86000 Da και μέγιστη συγκέντρωση (30μg/ml με αραιώση 1:6) στο πείραμα σας ήταν 5μg/ml ή $5 \times 10^{-3} \text{g/l}$ έχει συγκέντρωση σε M ($(5 \times 10^{-3} \text{g/l}) / 86000$) = $0,058 \times 10^{-3} \text{ M} = 58 \mu\text{M}$ στην κυψελίδα όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος [S] (pNPP) είναι 10mM

Εκτέλεση υπολογισμών:

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

Παράδειγμα υπολογισμών:

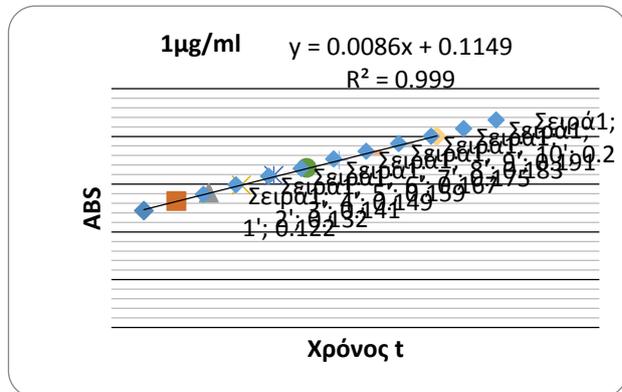
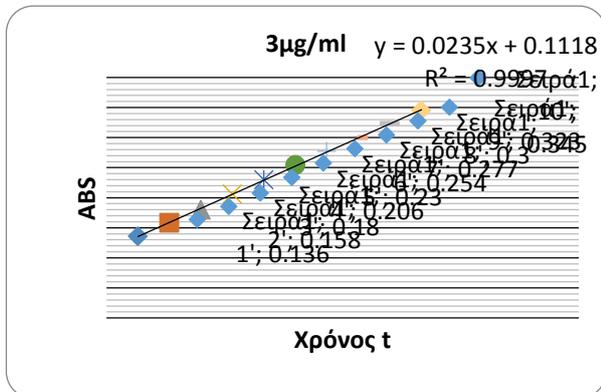
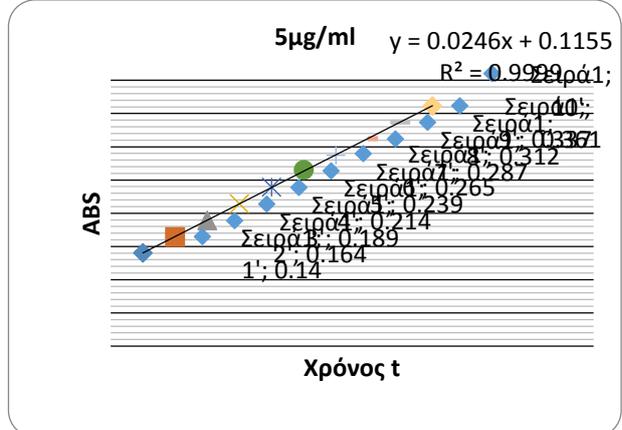
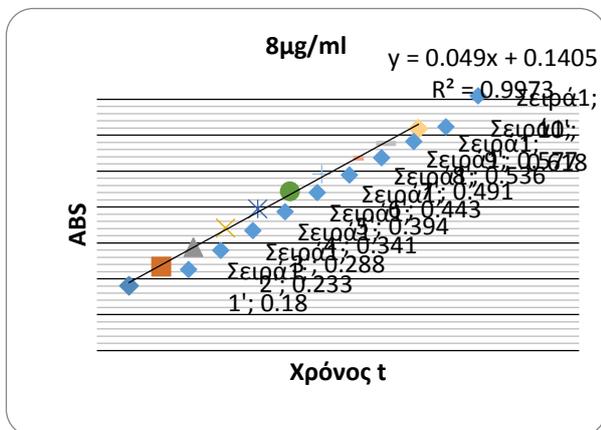
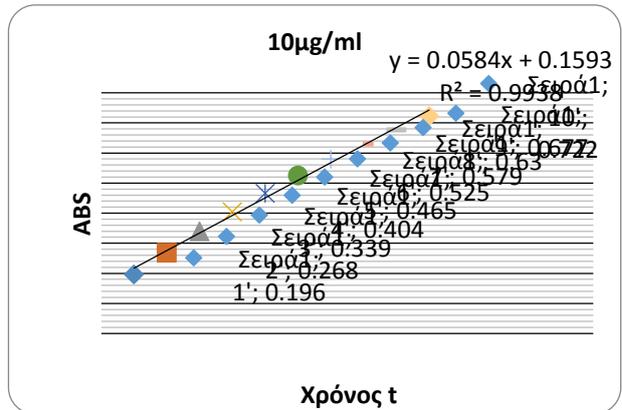
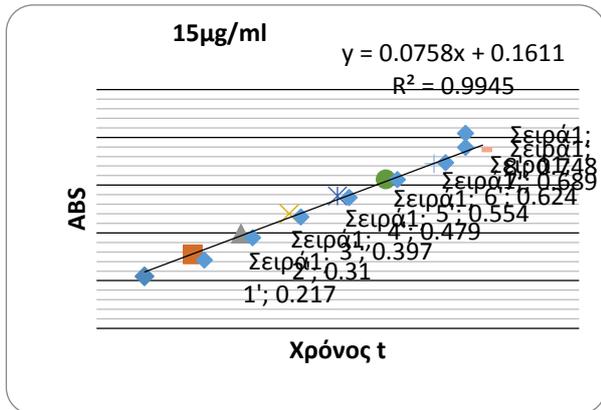
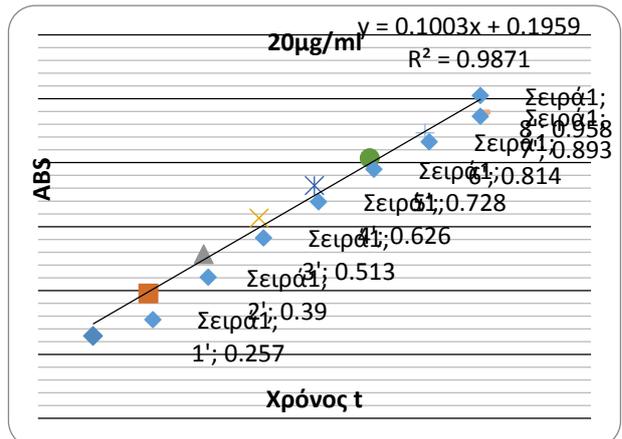
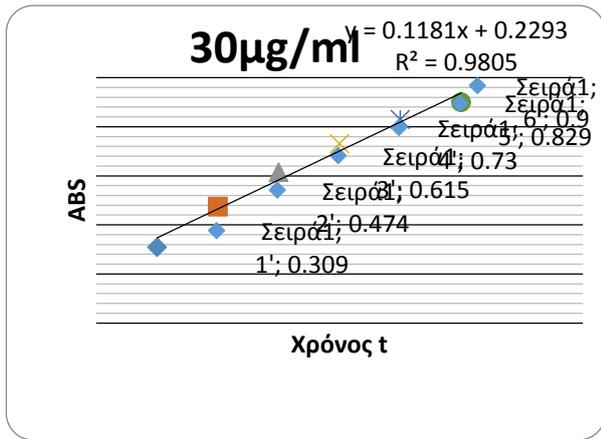
Έστω οι χρονομετρημένες απορροφήσεις για τις διάφορες συγκεντρώσεις ενζύμου που λάβατε κατά την διάρκεια του πειράματος είναι:

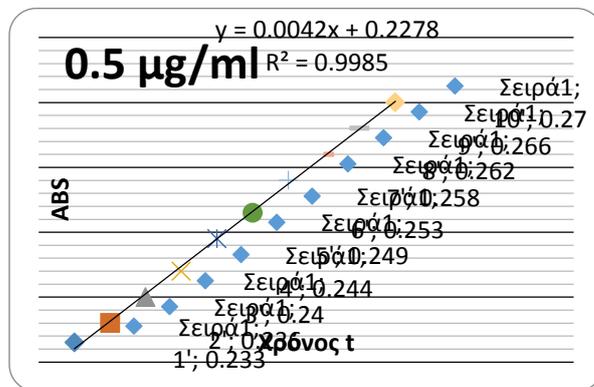
ΧΡΟΝΟΣ (t) / ENZΥΜΟ (c)	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'
30μg/ml	0,309	0,474	0,615	0,73	0,829	0,9	0,978	1,034
20μg/ml	0,257	0,39	0,513	0,626	0,728	0,814	0,893	0,958
15μg/ml	0,217	0,31	0,397	0,479	0,554	0,624	0,689	0,748
10μg/ml	0,196	0,268	0,339	0,404	0,465	0,525	0,579	0,63
8μg/ml	0,18	0,233	0,288	0,341	0,394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

Οι τιμές του παραδείγματος αναφέρονται σε χρόνο 1 λεπτού αλλά οι δικές σας μπορούν και είναι καλύτερα να αναφέρονται σε μικρότερη διάρκεια.

Μήπως γνωρίζεται το γιατί;

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





Παρατηρήστε πως αλλάζει η κλίση για καθένα από τα παραπάνω σχεδιαγράμματα ανάλογα με την συγκέντρωση του ενζύμου.

Η κλίση (α) της κάθε ευθείας για κάθε μια από τις παραπάνω καμπύλες δίνει την μεταβολή της Abs (ABS RATE) ανάλογα με την συγκέντρωση του ενζύμου. Οι τιμές παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Από τις μετρήσεις ABS της πρότυπης καμπύλης της Νιτροφαινόλης (μέρος πρώτο) που βρήκατε σε προηγούμενη άσκηση, έχετε την σχέση της Abs ανάλογα με την συγκέντρωση της Νιτροφαινόλης (πρότυπα διαλύματα) δηλαδή του προϊόντος ή του αντιδρώντος (υποστρώματος) εφόσον κάνετε την αφαίρεση

Αρχική συγκέντρωση αντιδρώντος – συγκέντρωση προϊόντος σε χρόνο T_1 = συγκέντρωση αντιδρώντος σε χρόνο T_1

Λύνοντας την αρχική εξίσωση $y = \alpha x + \beta$ που βρήκατε στο μέρος 1 της άσκησης ως προς x (δηλαδή συγκέντρωση υποστρώματος C) έχετε $C = (Abs - \beta) / \alpha$. Χρησιμοποιώντας αυτή την σχέση και τα δεδομένα από το τρίτο μέρος του πειράματος μπορούμε να μετατρέψουμε τις τιμές της απορρόφησης (405nm) και έτσι να έχουμε την σχέση της συγκέντρωσης υποστρώματος C ως προς το T (χρόνος).

Για χρόνο T_1 $C_1 = (Abs_1 - \beta) / \alpha$ και T_2 $C_2 = (Abs_2 - \beta) / \alpha$ οπότε $C_2 - C_1 = (Abs_2 - \beta) / \alpha - (Abs_1 - \beta) / \alpha = C_2 - C_1 = \beta(Abs_2 - Abs_1) / \alpha$. Διαιρώντας την τελευταία σχέση με $T_2 - T_1$ που είναι η διαφορά του χρόνου λαμβάνω την ταχύτητα της αντίδρασης.

$$U = \Delta C / \Delta t = (C_2 - C_1) / (T_2 - T_1) = \beta(Abs_2 - Abs_1) / \alpha$$

Η τελευταία σχέση μπορεί να ονομαστεί και **Product rate** εφόσον δείχνει την μεταβολή των προϊόντων ανάλογα με το χρόνο

Από όλα τα παραπάνω έχω:

Concentration enzyme (μg/ml)	Abs Rate (x1000)	Product Rate (μM)
0	0	-1,1364
0,5	4,2	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 στα παραπάνω διαγράμματα δηλαδή το a

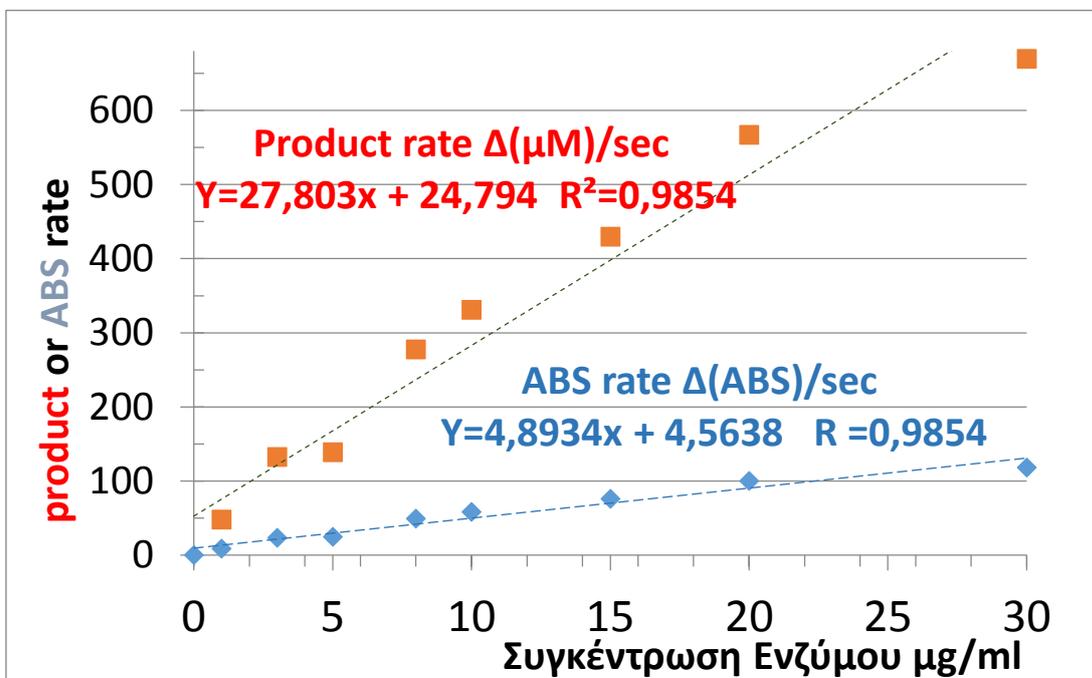
Product rate* = Βγαίνει από την εξίσωση $C=(Abs-0,207)/0,178$ όπου ABS βάζετε το ABS rate, άρα βρίσκετε το προϊόν που παράγεται κατά τις μετρήσεις σας.

Εξισώσεις = Κάνετε C/P και ABS/P

* για την μετατροπή από ABS RATE σε Product rate χρησιμοποιήστε την εξίσωση που έχετε από τα δεδομένα της άσκησης 6 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ (ΜΕΡΟΣ Ι) κατασκευή πρότυπης καμπύλης απορροφητικότητας της π-νιτροφαινόλης.

Κατασκευάστε μια νέα πρότυπη καμπύλη $Y=a*X+b$, όπου Y θα είναι οι ταχύτητες αντίδρασης $U=K_2 [ES]$ από τα πρότυπα που κάνατε και θα είναι το a και το $[E]$ θα είναι το X , ο άγνωστος.

Από τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα φτιάχνουμε την νέα καμπύλη(ες) σχέσης για συγκέντρωση ενζύμου και της ταχύτητα δημιουργίας προϊόντος (ταχύτητα αντίδρασης):



Το a από την γραμμή τάσης της καμπύλης C προς T (χρόνος) είναι ουσιαστικά το $\Delta C/\Delta t=a=U(\text{reaction speed})=\text{ταχύτητα αντίδρασης}$

Χρησιμοποιώντας μια ή και της δυο παραπάνω ευθείες μπορούμε να προσδιορίσουμε την συγκέντρωση του αγνώστου διαλύματος εφόσον πρώτα έχουμε υπολογίσει το ABS RATE ή το Product rate του αγνώστου διαλύματος

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

ΑΣΚΗΣΗ 10

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. Wohlgemuth, 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 αιμορραγική 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 ΜΒ).
- 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 αμυλάσης 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 Wohlgemuth).

Μέθοδος Wohlgemuth

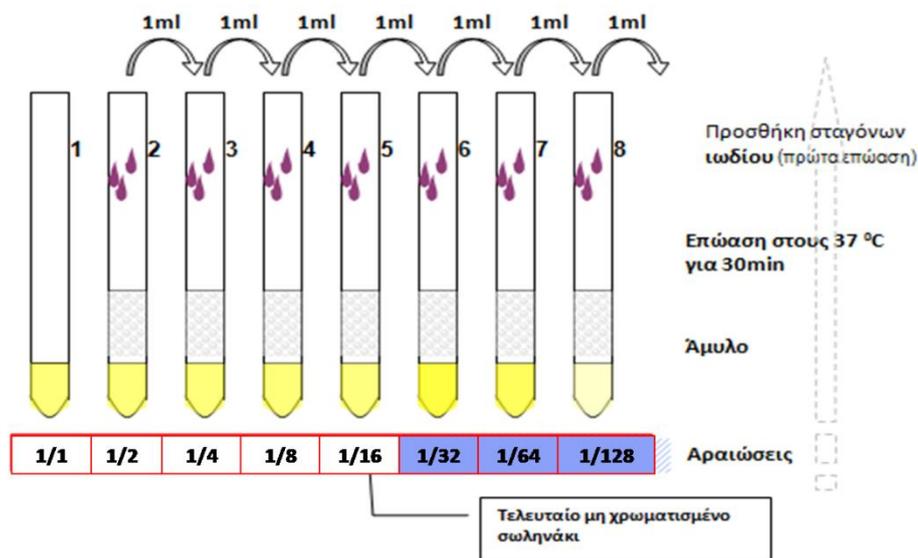
Αρχή μεθόδου

Σε διαδοχικές αραιώσεις δείγματος ούρων προστίθεται ποσότητα 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 δημιουργεί σύμπλοκο με το άμυλο και σχηματίζεται το **μπλε-ιώδες σύμπλοκο του αμύλου- I₃**. Έτσι χρωματίζονται εκείνα τα αραιωμένα δείγματα στα οποία μέρος του αμύλου δεν έχει διασπαστεί πλήρως από την αμύλαση των ούρων. Η τελευταία-μη χρωματισμένη- αραιώση δίνει τις **μονάδες δραστικότητας Wohlgemuth** 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 σωλήνα 2 (αραίωσης 1:2) μεταφέρεται 1ml από αυτόν στο σωλήνα 3 (αραίωσης 1:4).



Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας.

- Από το σωλήνα 3 μεταφέρεται 1ml στο σωλήνα 4 (**αραιώσης 1:8**) κ.ο.κ., μέχρι το σωλήνα 8 (**αραιώσης 1:128**) από τον οποίο 1ml απορρίπτεται έτσι ώστε όλοι οι σωλήνες να έχουν τον ίδιο όγκο και το ίδιο μέγεθος αραιώσης.
- Τέλος 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	Σωλήνες							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Δείγμα ούρων (ml)	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-
Διάλυμα NaCl 0.9% (ml)	-	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Αραιωμένο διάλυμα (v-1) σωλήνα (ml)	-	-	1,0 από τον 2	1,0 από τον 3	1,0 από τον 4	1,0 από τον 5	1,0 από τον 6	1,0 από τον 7
Άμυλο 1‰ (ml)	-	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Τελικός όγκος (ml)	1	4-1=3	4-1=3	4-1=3	4-1=3	4-1=3	4-1=3	4-1=3
Αραιώσεις	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128

- 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.

Στον σωλήνα 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-I₂**.

Ο **τελευταίος σωλήνας** που **δεν** χρωματίζεται **μπλε-ιώδες** το δείγμα που περιέχει, 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/L

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ:

1. Καταγράψτε την μέτρηση που κάνατε και αιτιολογήστε.

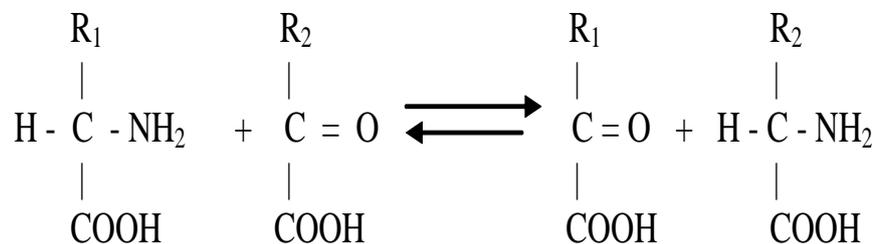
ΑΣΚΗΣΗ 11

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

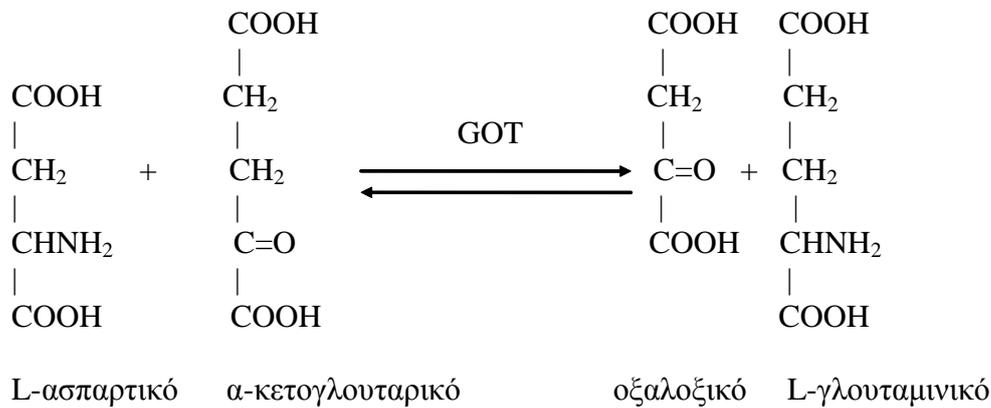
Τρανσαμινάσες

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:



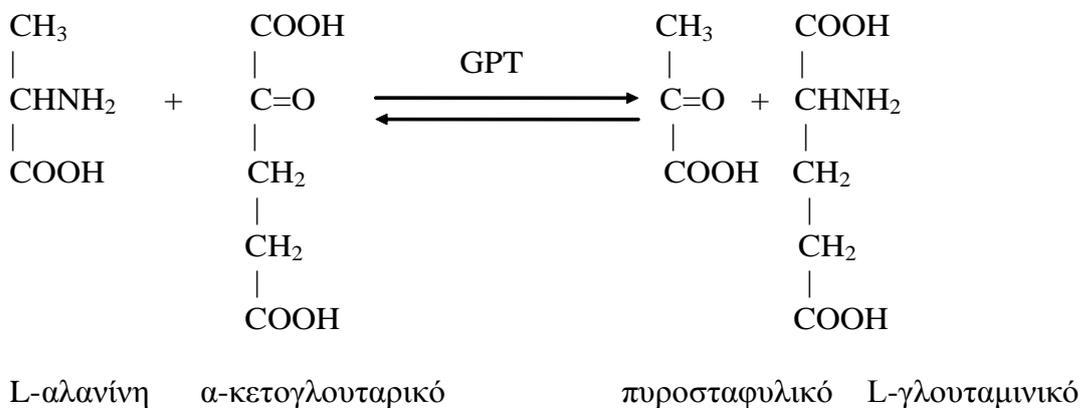
Είναι γνωστός ένας μεγάλος αριθμός τρανσαμινασών. Όλες χρησιμοποιούν σαν συνένζυμο την φωσφορική πυριδοξάλη (βιταμίνη B₆) και οι περισσότερες χρησιμοποιούν το α-κετογλουταρικό ως δέκτη των αμινομάδων. Δύο ένζυμα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον από την σκοπιά της κλινικής χημείας: Η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (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:



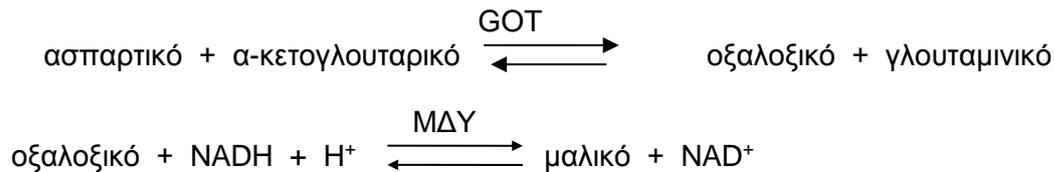
Η ενεργότητα του ενζύμου αυτού στο ορό αυξάνει κυρίως σε ηπατοχολικές παθήσεις.

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 ΔΑ 340nm/min. (Αν είναι μεγαλύτερη από 0,16 αραιώστε τον ορό 1:5 με 0,9% NaCl και επαναλάβετε την μέτρηση).

Υπολογισμός ενεργότητας GOT

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

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

Φυσιολογικές τιμές (στους 25°C)

Άνδρες : έως 18 U/l ή έως 0,3 μKat/l

Γυναίκες : έως 15 U/l ή έως 0,25 μKat/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 μ Kat/l

Γυναίκες : έως 17 U/l ή έως 0,28 μ Kat/l

Σημείωση:

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

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

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

- ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΩΝ-

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 =
 μ Kat / 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 12

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ - ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

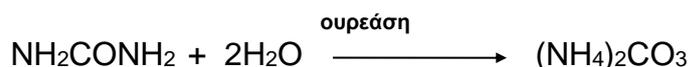
Ουρία

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).

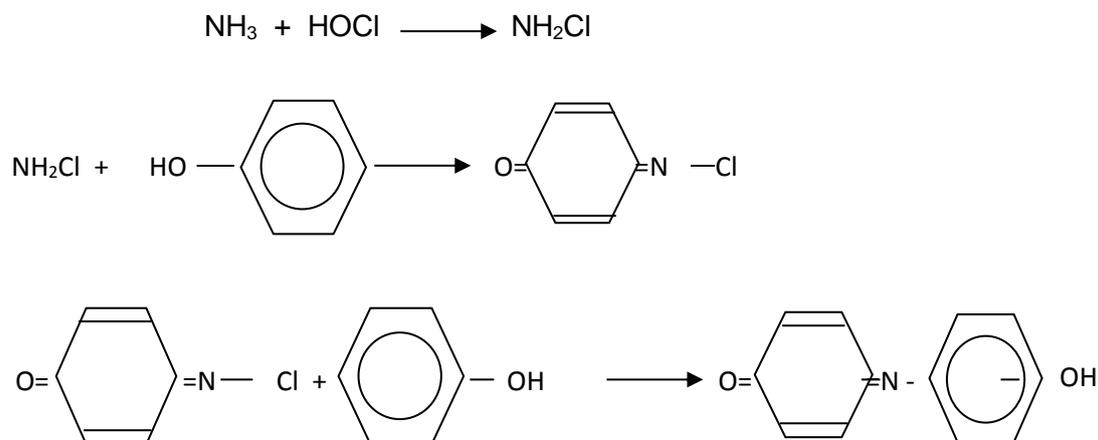
3) Ποσοτικός προσδιορισμός της ουρίας στον ορό (Μέθοδος Berthelot)

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** (**B**lood **U**rea **N**itrogen).

Μέθοδος:

Αντιδραστήρια, συστατικά και συγκεντρώσεις (Σας δίνονται έτοιμα)

Reagent 1	Reagent 2	Urease	Standard Ουρίας
Φωσφορικό Ρυθμιστικό 120 mmol/l	Φωσφορικό Ρυθμιστικό 120 mmol/l	Συμπυκνωμένο Ένζυμο >500 KU/l	Ουρία 80 mg/dl ή 13,3 mmol/l
Σαλικυλικό Νάτριο 60 mmol/l	Υποχλωριώδες Νάτριο		BUN 37,28 mg/dl

	10 mmol/l		
Νιτροπρωσσικό Νάτριο 5 mmol/l	Καυστικό Νάτριο 400 mmol/l		Αζίδιο του Νατρίου 0,095%
EDTA 1 mmool/l			

Αρχικά, γίνεται συλλογή ούρων τα οποία και αραιώνονται 1:100 με αποσταγμένο νερό.

Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες φωτόμετρου τοποθετήστε τα κάτωθι:

Αντιδραστήρια	Σωλήνας	Σωλήνας	Σωλήνας
	1	2	3
	(Τ)	(Π)	(Δ)
Reagent 1	2ml	2ml	2ml
Standard ουρίας 80mg%	--	20μl	--
Αραιωμένα Ούρα	--	--	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 Α του δείγματος και του προτύπου έναντι του τυφλού σε μήκος κύματος 580nm.

Υπολογισμός:

Οι τιμές της ουρίας στον ορό υπολογίζονται ως εξής:

A_{580} δείγμα

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

A_{580} Standard Ουρίας

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.

Φυσιολογικές τιμές:

20-35 mg/dL

Γ. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ - ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΜΣΑΤΩΝ

Ημερομηνία:/...../201...

Ομάδα: _ _ _ _ _ Μέλη της ομάδας: 1)

2)

3)

4)

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

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ (Μέθοδος Berthelot)

	A₅₈₀
Δείγμα	

Υπολογισμός:
mg % =
mmol / L =

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

	Ουρία	
	mg%	mmol/L
Δείγμα		

2. Σχολιάστε τα αποτελέσματά σας

ΑΣΚΗΣΗ 13

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ 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/>

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 Α

- 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).
- “**Quick BlastP search**” στη τρίτη σειρά → “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.

Μέρος Β

Στο πεδίο εισαγωγής διευθύνσεων του φυλλομετρητή **πληκτρολογείτε** τη διεύθυνση <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 το « **ProtParam**».

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

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
MVMSEFSAVPSGTGQGQQKPLRVGFYDVERTLGKGNFAVVKLARHRVTKTQVAIKIIDK
TRLDSSNLEKIYREVQLMKLLNHPNIIKLYQVMETKDMLYIVTEFAKNGEMFDYLTNSGH
```

LSENEARQKFWQILSAVEYCHNHHIVHRDLKTENLLLDNMDIKLADFGFGNFYKPGPEPL
STWCGSPPYAAPEVFEGKEYEGPQLDVWSLGVVLYVLVCGSLPFDGPNLPTLRQRVLEGR
FRIPFFMSQDCE TLIRRM LVDP AKRITIAQIRQHRWMOADPTLLQODDPAFDMQGYTSN
LGDYNEQVLGIMQALGIDRQRTIESLQNSSYNHFAAIYYLLERLKEHRSAQPSSRPTPA
PTRQPQLRSSDLSSLEVPQEILPCDPFRPSLLCPQPQALAQSVLQAEIDCDLHSSLQPLL
FPLDTNCSGVFRHRSISPSSLLDTAISEEARQGPSLEEEQEVQEP L PGSTGRRHTLAEVS
THFSPLNPPCIIVSSSATASPSEGTSSDCLPFSASEGPAGLGSGLATPGLLGTSSPVRL
ASPFLGSQSATPVLQTQAGLGTAVLPPVSFQEGRRASDTSLTQGLKAFRQQLRKNARTKG
FLGLNKIKGLARQVCQSSVRTPRGGMSTFHTPAPSSGLQGCTTSNREGRSLL E EVLHQQR
LLQLQHSS TAAASSGCQQGPQLSPVPYVLAPCD SLLVSGIPLLPTPLLQAGMSPVASAA
HLLDTHLHISAGPVALPTGPLPQCLTRLSPGCDPAGLPQGDCEMEDLTSGQRGT FVLVQ

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 ακολουθείσετε τα ίδια βήματα και την ίδια πορεία όπως και στην πρωτεΐνη **SIK1_MOUSE**. 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 δοκιμή πειραματικών ασκήσεων ήταν μια επίπονη εργασία που διήρκησε 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, PhD

Βάιος Νικολόπουλος Βιολόγος MSc, Υποψ. PhD

Ανθή Μέττου Χημικός MSc, Υποψ. PhD

Φώτος Αναστάσιος Χημικός Μηχανικός