

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΕΥΤΕΡΟΕΤΩΝ ΦΟΙΤΗΤΩΝ

*Τρίτη Έκδοση*

*Ευστάθιος Φριλίγγος, Κωνσταντίνος Σεφεριάδης,  
Θωμαΐς Παπαμαρκάκη και Ορέστης Τσόλας*

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2001



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000290557

ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ  
ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ  
ΤΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ



572  
ΕΡΓ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ**  
**ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΔΕΥΤΕΡΟΕΤΩΝ ΦΟΙΤΗΤΩΝ**

*Τρίτη Έκδοση*

**Ευστάθιος Φριλίγγος, Κωνσταντίνος Σεφεριάδης,**  
**Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, και Ορέστης Τσόλας**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2001**

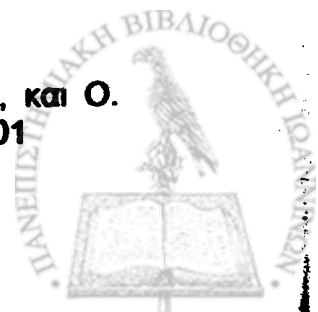


## Ιωάννινα

**Πρώτη έκδοση:** Ο. Τσόλας και Κ. Σεφεριάδης, **Εργαστηριακές Ασκήσεις Χημείας και Βιοχημείας, 1978-79**

**Δεύτερη έκδοση:** Ο. Τσόλας και Κ. Σεφεριάδης, **Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας, 1980**  
Ανατύπωση πρώτη, 1982  
Ανατύπωση δεύτερη, 1983  
Ανατύπωση τρίτη (συμπεριλαμβάνονται οι "Απλές Βιοχημικές Δοκιμασίες στα ούρα και κόπρανα", 1981), 1985  
Ανατύπωση τέταρτη (βελτιώσεις), 1987  
Ανατύπωση πέμπτη (βελτιώσεις), 1988  
Ανατύπωση έκτη (βελτιώσεις), 1993

**Τρίτη έκδοση:** Ε. Φριλίγγος, Κ. Σεφεριάδης, Θ. Παπαμαρκάκη, και Ο. Τσόλας, **Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας, 2001**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ ΣΤΗΝ ΤΡΙΤΗ ΕΚΔΟΣΗ

Το Εργαστήριο Βιοχημείας συμπληρώνει και εμπεδώνει τις βασικές γνώσεις που αποκτούμε από την θεωρητική μελέτη του μαθήματος. Η βιοχημεία είναι μία κατεξοχήν πειραματική επιστήμη, και ο ενδεδειγμένος τρόπος για να εκτιμήσουμε τα συμπεράσματα της είναι ο πειραματισμός. Ειδικά για τον γιατρό, οι γνώσεις της βιοχημείας σήμερα αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο για να κατανοήσει τη λειτουργία του οργανισμού στην φυσιολογική και στην παθολογική του κατάσταση. Επιπλέον, το εργαστήριο θα δώσει στον φοιτητή τα στοιχεία για να μπορέσει αργότερα να εκτιμήσει τις πολλαπλές βιοχημικές αναλύσεις που απαιτούνται στην κλινική πράξη.

Περιγράφουμε βασικές ασκήσεις για να επεξηγήσουμε ορισμένες από τις έννοιες και αρχές στην βιοχημεία. Το εργαστήριο Βιοχημείας των Δευτεροετών είναι η λογική συνέχεια του εργαστηρίου Χημείας των Πρωτεοετών. Το τελευταίο μπορεί να θεωρηθεί και προαπαιτήση για τη σωστή παρακολούθηση και αξιοποίηση των εργαστηριακών ασκήσεων που παραθέτουμε.

Σε σχέση με τις προηγούμενες εκδόσεις των Εργαστηριακών Ασκήσεων Βιοχημείας δευτεροετών φοιτητών της Ιατρικής Σχολής, η παρούσα διαφέρει ριζικά τόσο ως προς τον εκσυγχρονισμό του περιεχομένου της όσο και ως προς την τυποποίηση της δομής της. Συγκοινοούνται 9 Ασκήσεις, εκ των οποίων οι Ασκήσεις 1-5 προβλέπεται να διδαχθούν κατά το Γ' Εξάμηνο φοίτησης και οι Ασκήσεις 6-9 κατά το Δ' Εξάμηνο φοίτησης.

Επιγραμματικά, οι Ασκήσεις 2 (Ενζυμική κινητική-1), 3 (Ενζυμική κινητική-2) και 9 (ELISA) αποτελούν αναμορφωμένες εκδοχές αντίστοιχων Ασκήσεων της Β' Εκδοσης. Οι Ασκήσεις 1 (Χρωματογραφία μοριακής διήθησης), 4 (Φωσφολιπίδια κυτταρικών μεμβρανών), 6 (Γλυκόλυση - Μεταβολική τύχη πυροσταφυλικού), 7 (Αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων - Αναπνευστική αλυσίδα) και 8 (Προσδιορισμός βιοχημικών και ενζυμικών δεικτών στην Κλινική Βιοχημεία) αντιστοιχούν ως προς την θεματολογία με Ασκήσεις της Β' Εκδοσης, αλλά περιλαμβάνουν σημαντικές τροποποιήσεις στις μεθοδολογίες και προσθήκες νέων (περισσότερο σύγχρονων)



πρωτοκόλλων. Η Άσκηση 5 (Απομόνωση και φάσματα απορρόφησης DNA) εισάγεται για πρώτη φορά.

Έκτενή εισαγωγικά σημειώματα, που έχουν ως στόχο την εμπέδωση της συσχέτισης μεταξύ θεωρίας και πειραματικού μέρους, δίδονται σε κάθε Άσκηση. Επίσης, για την αποδοτικότερη επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων από τους ασκούμενους, δίδονται σε κάθε Άσκηση υποδείγματα πινάκων τιμών και φύλλα χιλιοστομετρικού χάρτη (μιλλιμετρέ), και συνοψίζονται στο τέλος του Πειραματικού μέρους τα ζητούμενα στοιχεία (διαγράμματα, υπολογισμοί τιμών). Σημαντικό για την ολοκλήρωση της εργαστηριακής εξάσκησης θεωρείται να απαντηθούν οι Ερωτήσεις Επεξεργασίας και Εμπέδωσης (4 έως 6 κάθε φορά) που αναφέρονται στην κατανόηση των πειραμάτων που εκτελέστηκαν.

Μετά από 23 χρόνια λειτουργίας του φοιτητικού εργαστηρίου, συνεχίζουμε να πιστεύουμε ότι κάθε λεπτό παραγωγικής εργασίας στο Εργαστήριο είναι .ο,τι καλύτερο μπορεί να κάνει ο φοιτητής Ιατρικής για την εμπέδωση της βιοχημείας, μιας κατεξοχήν πειραματικής επιστήμης. Περαιτέρω, θα προετοιμαστεί για τις κλινικές, όπου πλέον σήμερα η αρχή που πρεσβεύουμε είναι η αποδεικτική Ιατρική (evidence-based medicine), ιατρική που βασίζεται στα δημοσιευμένα δεδομένα και στις ηλεγμένες μαρτυρίες.

Ιωάννινα  
27 Ιουνίου 2001

Ορέστης Τσόλας  
Καθηγητής Βιολογικής Χημείας  
Υπεύθυνος του μαθήματος



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΕΚΔΟΣΗ

Η Μ. Σακαρέλλου-Δαΐτσιώτου, ο Ν. Κολαΐτης, η Χρ. Φράγκου-Τζαβέλλα και ο Δ. Μπούμπας βοήθησαν στο γράψιμο ορισμένων ασκήσεων και στη σύνταξη.

Τα σχήματα είναι του Χρ. Ανδρέα, και η δακτυλογράφηση έγινε από την Αικ. Μικρούλη-Νίκου.

Οι ασκήσεις δοκιμάσθηκαν στο εργαστήριο από την Χρ. Φράγκου-Τζαβέλλα και τους Στρ. Κοντοραδέλλη και Χρ. Ανδρέα.

Σε όλους εκφράζουμε τις θερμές μας ευχαριστίες.

Ο. Τ.

Κ. Σ.



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ ΣΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΚΔΟΣΗ

Οι ασκήσεις 13 και 14, κινητικές ιδιότητες της αλκαλικής φωσφατάσης, γράφτηκαν από τη λέκτορα κα. Θ. Παπαμαρκάκη και δοκιμάστηκαν στο Εργαστήριο με την βοήθεια του κου. Χρ. Ανδρέα.

Η άσκηση 15, Ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο (ELISA), γράφτηκε από τον επίκουρο καθηγητή κο. Γ. Παπαδόπουλο και δοκιμάστηκε στο εργαστήριο με την βοήθεια της κας. Π. Μητλιάγκα.

Ο. Τ.

Κ. Σ.





## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

**Πρόλογος στην Τρίτη Έκδοση** (σελ. iii-iv)

Ευχαριστίες στην Πρώτη Έκδοση (σελ. v)

Ευχαριστίες στην Δεύτερη Έκδοση (σελ. vi)

**Περιεχόμενα** (σελ. vii-viii)

**Εισαγωγή στο Εργαστήριο** (σελ. 1-8)

Ασκηση 1

**Χρωματογραφία μοριακής διήθησης** (σελ. 9-23)

Διαχωρισμός κυανής δεξτράνης, κυτοχρώματος c, ριβοφλαβίνης

Χρωματογραφική αφαλάτωση διαλύματος αιμοσφαιρίνης

Αγωγιμομετρικός προσδιορισμός των ιόντων  $\text{Na}^+$

Προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Lowry

Ασκηση 2

**Ενζυμική Κινητική -1** (σελ. 24-35)

Καμπύλη προόδου αντίδρασης αλκαλικής φωσφατάσης

Καμπύλη ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης του ενζύμου

Προσδιορισμοί ενζυμικής ενεργότητας

Ασκηση 3

**Ενζυμική Κινητική -2** (σελ. 36-49)

Καμπύλη κορεσμού υποστρώματος

Μετασχηματισμοί της εξίσωσης Michaelis-Menten

Υπολογισμοί των σταθερών  $K_m$ ,  $V_{max}$

Συναγωνιστική και μη συναγωνιστική αναστολή

Ασκηση 4

**Φωσφολιπίδια κυτταρικών μεμβρανών** (σελ. 50-64)

Απομόνωση μεμβρανών ερυθροκυττάρων ανθρώπου

Εκχύλιση μεμβρανικών λιπιδίων

Ποσοτικός προσδιορισμός φωσφολιπιδίων

Ασκηση 5

**Απομόνωση και φάσματα απορρόφησης DNA** (σελ. 65-81)

Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από ήπαρ επίμυος

Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA

Φάσματα απορρόφησης νουκλεϊκών οξέων στο υπεριώδες

Ασκηση 6

**Γλυκόλυση: Μεταβολική τύχη πυροσταφυλικού** (σελ. 82-95)

Ανίχνευση μεταβολικού ενδιάμεσου (πυροσταφυλικού) με αναστολή του ενζύμου πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση [σε κύτταρα ζυμομύκητα]

Προσδιορισμός ενεργότητας πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης με συζευγμένη αντίδραση αλκοολικής αφυδρογονάσης [σε κύτταρα εκχύλιμα ζυμομονάδων]



**Ασκηση 7**

**Αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων: Αναπνευστική αλυσίδα (σελ. 96-109)**  
Ανίχνευση μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας με δείκτες οξειδοαναγωγής (σε παρασκεύασμα ήπατος επίμυος)  
Υποστρώματα και αναστολείς της αναπνευστικής αλυσίδας

**Ασκηση 8**

**Προσδιορισμός βιοχημικών και ενζυμικών δεικτών στην Κλινική Βιοχημεία (σελ. 110-130)**

Προσδιορισμός γλυκόζης ορού  
Προσδιορισμός α-αμυλάσης ορού  
Ανίχνευση πρωτεϊνών στα ούρα  
Ανίχνευση κετονοσωμάτων  
Ανίχνευση πορφυρινών

**Ασκηση 9**

**Ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο (ELISA)**  
(σελ. 131-149)

Επίστρωση πλακιδίου ELISA με διαλύματα ανοσοσφαιρινών ανθρώπου (coating)  
Δέσμευση κενών/μη ειδικών αντιγονικών θέσεων με λευκωματίνη ορού βοός (blocking)  
Επώαση με σύζευγμα αντι-ανοσοσφαιρίνης γ - αλκαλικής φωσφατάσης  
Επώαση με υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης και φωτομετρικός προσδιορισμός σε μετρητή πλακιδίου ELISA

**Παραρτήματα (σελ. 150-180)**

**Βασική Βιβλιογραφία (σελ. 180-182)**



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

### A. Γενικά για το εργαστήριο

Η διάρκεια του κάθε εργαστηρίου είναι τρεις ώρες και ο κάθε φοιτητής είναι υποχρεωμένος να εκτελέσει όλες τις εργαστηριακές Ασκήσεις.

Σε περίπτωση που ένας φοιτητής θα χάσει ένα εργαστήριο θα το εκτελέσει το επόμενο έτος.

Η εργαστηριακή άσκηση θεωρείται ότι έγινε επιτυχώς (και στην περίπτωση αυτή είναι ολοκληρωμένη) με βάση: α) το τετράδιο εργαστηρίου ή πρωτόκολλο, (ο τρόπος χρήσης του δίδεται κατωτέρω) και β) την προφορική εξέταση που θα γίνεται από τους βοηθούς ή επιμελητές κατά τη διάρκεια της Άσκησης. Σε περίπτωση που η άσκηση δεν θεωρηθεί ολοκληρωμένη, θα πρέπει να επαναληφθεί.

Οι φοιτητές στο εργαστήριο είναι υποχρεωμένοι να φορούν την ποδιά τους, και να μην καπνίζουν.

### B. Γνωριμία με τα γυαλικά του εργαστηρίου, τη χρήση τους και τον καθαρισμό τους.

#### α) Τα γυαλικά και η χρήση τους.

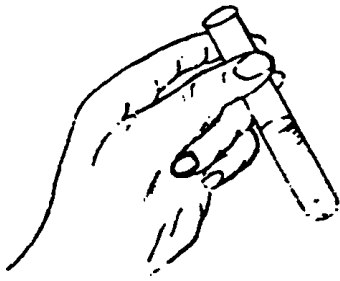
Στο βιοχημικό εργαστήριο όλα τα πειράματα γίνονται με την βοήθεια των γυάλινων σκευών, την χρήση των οποίων πρέπει να γνωρίζει κάθε φοιτητής για σωστότερη και ευκολότερη εκτέλεση των ασκήσεων.

Τα γυάλινα σκεύη χρησιμοποιούνται για την παρασκευή διαλυμάτων και για την μέτρηση του όγκου των υγρών. Συμπεριλαμβάνουν δε τα εξής:

#### 1. Δοκιμαστικός σωλήνας

Στον δοκιμαστικό σωλήνα (Σχήμα 1) γίνονται οι διάφορες αντιδράσεις. Μπορεί να θερμανθεί, αλλά με το στόμιό του όχι στραμμένο προς κατευθύνσεις που βρίσκονται συνάδελφοί μας ή το πρόσωπό μας, γιατί η εκτίναξη του περιεχομένου του μπορεί να προκαλέσει εγκαύματα (Σχήμα 2).


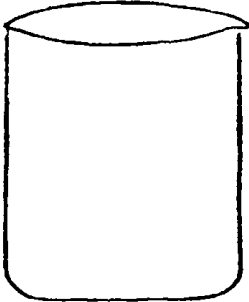
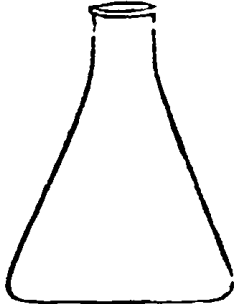



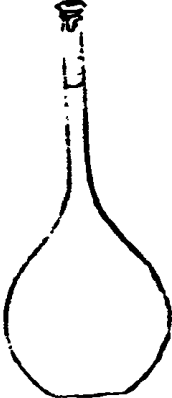




**Σχήμα 2.** Ορθός τρόπος χειρισμού δοκιμαστικού σωλήνα

## 2. Ποτήρι ζέσεως

Το ποτήρι ζέσεως (Σχήμα 3) χρησιμοποιείται για την παρασκευή και την μεταφορά διαλυμάτων. Προσοχή χρειάζεται όταν πιάνουμε το ποτήρι μετά από θέρμανση. Το κρατάμε μόνο από το πάνω μέρος και όχι από την μέση, γιατί η θερμοκρασία είναι υψηλή και μπορεί να μας κάψει το χέρι.

			
<p><b>Σχήμα 1.</b> Δοκιμαστικός σωλήνας (test tube)</p>	<p><b>Σχήμα 3.</b> Ποτήρι ζέσεως (beaker)</p>		<p><b>Σχήμα 4.</b> Κωνική φιάλη (Erlenmeyer flask)</p>
			
<p><b>Σχήμα 5.</b> Σιφώνιο (πιπέτα) πληρώσεως (pipette)</p>	<p><b>Σχήμα 6.</b> Σιφώνιο αριθμημένο</p>	<p><b>Σχήμα 8.</b> Ογκομετρικός κύλινδρος (graduated cylinder)</p>	<p><b>Σχήμα 9.</b> Ογκομετρική φιάλη (volumetric flask)</p>



### 3. Κωνική φιάλη ή Erlenmeyer

Η κωνική φιάλη ή Erlenmeyer (Σχήμα 4) χρησιμοποιείται για τους ίδιους σκοπούς όπως και το ποτήρι ζέσεως. Λόγω του στενού στομίου πρέπει να αποφεύγεται η θέρμανση σε ισχυρή φλόγα.

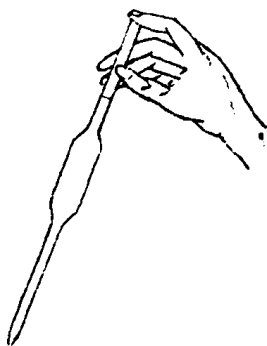
### 4. Σιφώνιο (πιπέτα) πληρώσεως ή ογκομετρικό

Το σιφώνιο (πιπέτα) πληρώσεως ή ογκομετρικό (Σχήμα 5) είναι λεπτός επιμήκης σωλήνας με εξόγκωμα στη μέση. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση ορισμένων όγκων υγρού, όσου αναγράφεται πάνω στο σιφώνιο (1, 2, 5 ml) και όχι κλασμάτων όγκων.

### 5. Σιφώνιο αριθμημένο ή σιφώνιο Mohr

Το αριθμημένο σιφώνιο (Mohr) (Σχήμα 6) είναι λεπτός επιμήκης σωλήνας ο οποίος φέρει υποδιαιρέσεις. Χρησιμοποιείται τόσο για τη μέτρηση του ολικού αναγραφόμενου όγκου, όσο και κλασμάτων αυτού (0.5 ml, 1.8 ml, κλπ.). Τα σιφώνια (πιπέτες) γενικά, είναι όργανα μετρήσεως όγκων μεγάλης ακρίβειας. Είναι απαραίτητα όταν θέλουμε να μετρήσουμε μικρές ποσότητες υγρών (0.1 ml, 0.2 ml, κλπ.). [Σημείωση: Στο παρόν εισαγωγικό κείμενο καθώς και σε όλο το κείμενο της τρίτης έκδοσης των Εργαστηριακών Ασκήσεων Βιοχημείας, έχει υιοθετηθεί το αγγλικό σύστημα γραφής δεκαδικών αριθμών, όπου χρησιμοποιείται τελεία (point) και όχι κόμμα μεταξύ του ακέραιου και του δεκαδικού μέρους]

Η σωστή χρήση των σιφωνίων φαίνεται στο Σχήμα 7:



Σχήμα 7. Ορθός τρόπος χειρισμού του σιφωνίου

### 7. Ογκομετρικός κύλινδρος

Ο ογκομετρικός κύλινδρος (Σχήμα 8) χρησιμοποιείται για μετρήσεις όγκων μεγαλύτερων από αυτούς που μπορούμε να μετρήσουμε με σιφώνια. Η ακρίβεια των μετρήσεων με ογκομετρικό κύλινδρο δεν είναι μεγάλη.

### 8. Ογκομετρική φιάλη

Η ογκομετρική φιάλη (Σχήμα 9) χρησιμοποιείται για την επακριβή μέτρηση μεγάλου όγκου υγρών καθώς και για την παρασκευή διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

### β) Καθαρισμός των γυαλικών

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη σωστή διεξαγωγή των ασκήσεων και για σωστά αποτελέσματα είναι το καλό καθάρισμα των γυάλινων σκευών.

Ο κάθε φοιτητής πρέπει να καθαρίζει καλά τα γυάλινα σκεύη στο τέλος κάθε άσκησης. Το καθάρισμα γίνεται με απορρυπαντικό και με άφθονο νερό της βρύσης. Για ευκολία χρησιμοποιείται η ψήκτρα ή βούρτσα καθαρισμού. Στο τέλος ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό.

Μετά το τέλος του καθαρισμού τα σκεύη τοποθετούνται ανάποδα πάνω σε καθαρό διηθητικό χαρτί για να στεγνώσουν.

### Γ. Βασικά όργανα στο εργαστήριο

Το υδατόλουτρο είναι σκεύος στο τοίχωμα του οποίου υπάρχει μια ηλεκτρική αντίσταση και στο εσωτερικό νερό που θερμαίνεται από την αντίσταση. Τα υδατόλουτρα έχουν θερμόμετρο και θερμοστάτη. Μέσα στα υδατόλουτρα βυθίζονται διάφορα δοχεία τα οποία περιέχουν υγρά που πρέπει να θερμανθούν.

Το παγόλουτρο είναι αντίστοιχο του υδατόλουτρου και χρησιμοποιείται για την ψύξη διαλυμάτων. Αντί για παγόλουτρο μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την χοντρή πλαστική λεκάνη μέσα στην οποία βάζουμε πάγο, ένα θερμόμετρο και το διάλυμα που θέλουμε να ψύξουμε.

Ο κλίβανος αναπτύσσει στο εσωτερικό του ξηρά θερμότητα κατάλληλη για ξήρανση, αποστείρωση κλπ. Η θερμοκρασία του κλιβάνου ρυθμίζεται στο επιθυμητό ύψος.

Οι ζυγοί ακριβείας είναι ευαίσθητα όργανα μεγάλης ακριβείας. Ζυγίζουμε με αυτά μικρά βάρη δηλ. κάτω των 100 g. Με τους ζυγούς



ζυγίζουμε στερεές ουσίες (κρυστάλλους-σκόνες) ή υγρά μέσα σε γυαλικά γνωστού βάρους.

Η φυγόκεντρος διαχωρίζει σε στιβάδες διάφορες ουσίες που αιωρούνται στο διάλυμα. Κατά την φυγόκεντρη εφαρμόζεται επάνω σε κάθε σωματίδιο φυγόκεντρος δύναμη πολλαπλάσια του βάρους του σωματιδίου (M). Η δύναμη αυτή (φυγόκεντρος δύναμη) ισούται προς το γινόμενο του τετραγώνου της γωνιακής ταχύτητας περιστροφής ( $\omega$ ) και της ακτίνας φυγοκέντρωσης (r).

$$\text{Φυγόκεντρος δύναμη} = M\omega^2r$$

Το αποτέλεσμα είναι ότι τα πυκνότερα σωματίδια μαζεύονται στον πυθμένα του φυγοκεντρικού σωλήνα και τα λιγότερο πυκνά σχηματίζουν μία στοιβάδα πάνω από τα προηγούμενα.

Το πεχάμετρο μετρά τη συγκέντρωση των ιόντων  $H^+$  σε διαλύματα και δίνει αποτελέσματα σε μονάδες pH από 0 έως 14. Για την μέτρηση χρησιμοποιούμε, ειδικό ηλεκτρόδιο το οποίο βυθίζεται στο διάλυμα που μετρούμε.

Το αγωγιμόμετρο ανιχνεύει ηλεκτρολύτες μέσα σε ένα διάλυμα. Το όργανο αυτό μετρά και την καθαρότητα του απιονισμένου νερού, όσον αφορά την περιεκτικότητά του σε ιόντα. Η αγωγιμότητα των διαλυμάτων μετράται σε μονάδες Siemens, αντίστροφες της αντίστασης.

Το φασματοφωτόμετρο είναι όργανο με το οποίο μετράμε τις συγκεντρώσεις μια ουσίας που απορροφά ακτινοβολία σε ορισμένο μήκος κύματος και εύρους 1-2 nm, από 190-780 nm. Τα φωτόμετρα είναι απλούστερα όργανα τα οποία απομονώνουν δέσμες φωτός με φίλτρα, και μετρούν ευρύτερα φάσματα.

#### Δ. Βασικές μέθοδοι στην Χημεία και την Βιοχημεία

Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο εκτός από την μέτρηση βάρους και όγκου είναι:

1. Τιτλοδότηση
2. Απόσταξη
3. Ανακρυστάλλωση



4. Εκχύλιση
5. Κατακρήμνιση
6. Φυγοκέντρωση
7. Ηλεκτρομετρικές μέθοδοι (π.χ. μέτρηση pH, μέτρηση αγωγιμότητας)
8. Χρωματογραφία
9. Ηλεκτροφόρηση
10. Φωτομετρία και Φασματοφωτομετρία
11. Ραδιομετρία

#### Ε. Πρωτόκολλο.

Κάθε φοιτητής, φέρνει μαζί του στο εργαστήριο το παρόν βιβλίο. Συμπληρώνει τον αριθμό άσκησης και το ονοματεπώνυμό του. Ο φοιτητής κρατάει σημειώσεις στο κατάλληλο φύλλο του βιβλίου αυτού οι οποίες θα πρέπει να είναι σαφείς και σύντομες. Οτιδήποτε αξιοσημείωτο παρατηρείται κατά την εκτέλεση της άσκησης σημειώνεται με την πιθανή ερμηνεία του. Γενικά, σημειώνονται οι διάφορες τιμές, τα σχεδιαγράμματα και το αποτέλεσμα μαζί με τις παρατηρήσεις που έγιναν κατά την διάρκεια της άσκησης.

Στο τέλος της κάθε άσκησης ο φοιτητής φέρνει το πρωτόκολλό του στους βοηθούς ή τον υπεύθυνο του εργαστηρίου, γίνεται ο έλεγχος των αποτελεσμάτων και σημειώσεων και υπογράφεται η άσκηση.

#### Πρότυπο πρωτοκόλλου

Εισαγωγή: Σκοπός της άσκησης, αντιδράσεις, κλπ.

Περιγραφή με εικόνες και πίνακες (όχι αντιγραφή των σημειώσεων).

Αποτελέσματα με αριθμούς και σχεδιαγράμματα όπου χρειάζονται.

Παρατηρήσεις

Συμπεράσματα

#### ΣΤ. Ατυχήματα

##### 1. Εύφλεκτα διαλύματα και εύφλεκτοι ατμοί

Για να αποφευχθούν ατυχήματα πρέπει να γνωρίζουμε τα εύφλεκτα διαλύματα και να μην πλησιάζουμε με αναμμένα σπέρτα ή καυστήρες





Bunsen κλπ. Εκτός από τα διαλύματα είναι εύφλεκτοι και οι ατμοί τους, γι αυτό δεν αφήνουμε ποτέ ακάλυπτες τις φιάλες που φέρουν τα διαλύματα.

Τα πιο συνηθισμένα είναι: ακετόνη, μεθανόλη, αιθυλική αλκοόλη, δισαιθυλικός αιθέρας, τολουένιο, βενζόλιο, πετρελαϊκός αιθέρας.

## 2. Κανόνες για να αποφύγουμε ατυχήματα στο εργαστήριο.

- Κανείς δεν πρέπει να εργάζεται μόνος στο εργαστήριο. Για λόγους ασφαλείας επιβάλλεται η παρουσία μέλους του προσωπικού.
- Κατά την είσοδο στο εργαστήριο φοράμε την ποδιά μας.
- Απαγορεύεται αυστηρά το κάπνισμα μέσα στο εργαστήριο.
- Προσοχή στα πυρωμένα γυαλικά, προκαλούν σοβαρά εγκαύματα όταν έρθουν σε επαφή με το δέρμα. Δεν θερμαίνονται όλα τα γυαλικά.
- Ουδέποτε θερμαίνουμε εύφλεκτα διαλύματα απευθείας πάνω στην φλόγα.
- Ποτέ δεν θα πρέπει το στόμιο θερμαινόμενων σωλήνων να είναι στραμμένο προς όσους βρίσκονται κοντά μας. Η θέρμανση πρέπει να είναι ομοιόμορφη, να αρχίζει πάντοτε από την ελεύθερη επιφάνεια του υγρού και συγχρόνως να αναταράσσεται το υγρό μέσα στο σωλήνα (Σχήμα 2).
- Τοξικές ουσίες ή πολύ πυκνά διαλύματα δεν ροφούνται με το στόμα αλλά με αυτόματες πιπέτες ή Poire. Εάν δεν απαιτείται μεγάλη ακρίβεια προτιμάται ο ογκομετρικός κύλινδρος.
- Η αραίωση του πυκνού θειικού οξέος γίνεται με προσθήκη του οξέος σε μικρές ποσότητες στο νερό και ουδέποτε αντίστροφα.
- Διαλύματα με αποπνυκτικούς ή δηλητηριώδεις ατμούς χρησιμοποιούνται μόνο μέσα στην απαγωγό εστία.
- Όλοι πρέπει να γνωρίζουμε που βρίσκονται και πώς λειτουργούν οι πυροσβεστήρες.

## 3. Αντιμετώπιση ατυχημάτων

Τα οξέα και οι βάσεις ως πυκνά διαλύματα προκαλούν βαριές κακώσεις όταν ληφθούν από το στόμα ή επιδράσουν στο δέρμα και στα μάτια. Τα



συνηθέστερα οξέα στο εργαστήριο είναι:  $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$ ,  $H_3PO_4$ ,  $HCl$ . Οι συνηθέστερες βάσεις είναι:  $NaOH$ ,  $KOH$ ,  $NH_3$ .

Η δράση των παραπάνω ουσιών διακρίνεται σε πρωτεύουσα (τοπική στους ιστούς) και σε δευτερεύουσα (συστηματική στον οργανισμό). Η πρωτεύουσα δράση έχει διαβρωτικό χαρακτήρα, με αποτέλεσμα τοπική νέκρωση του δέρματος, των ματιών, της στοματικής κοιλότητας, του οισοφάγου κ.λ.π. Η δευτερεύουσα δράση εκδηλώνεται όταν οι παραπάνω ουσίες, σε πολύ αραιά διαλύματα, ληφθούν από το στόμα και οφείλεται στην διαταραχή της οξεοβασικής ισορροπίας. Οι δράσεις αυτές εξαρτώνται κυρίως από την συγκέντρωση και κατά ένα μέρος από το είδος του οξέος ή της βάσεως.

Συνεπώς σε κάθε επίδραση οξέος ή βάσεως οι πρώτες βοήθειες έχουν σα σκοπό να μειώσουν την βλαπτική επίδραση στο στόμα.

1. Αραίωση του καυστικού διαλύματος: Ρίχνουμε άφθονο νερό συνεχώς στα σημεία που επέδρασε το διάλυμα. Τα οξέα πρέπει να αραιωθούν περίπου 100 φορές για να πάψουν να είναι βλαβερά.
2. Εξουδετέρωση του καυστικού διαλύματος. Για τα οξέα μετά την πλύση με νερό χρησιμοποιούμε κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, και για τις βάσεις 1 % θειϊκό οξύ.
3. Εφόσον η επιφάνεια είναι μικρή και δεν πρόκειται για εγκαύματα τρίτου βαθμού, την καλύπτουμε με πηγμα ακριλφλαβίνης. Εάν επιδράσει στο μάτι διάλυμα οξέος αραιώνουμε με άφθονο νερό και ακολούθως πλένουμε με διάλυμα 1% όξινου ανθρακικού νατρίου που πέφτει με πίεση. Η επίδραση διαλύματος βάσεως στο μάτι αντιμετωπίζεται με άφθονο νερό και με διάλυμα 1 % βορικού οξέος που πέφτει με πίεση.

Τα διάφορα μικρά και μεγάλα κοψίματα του δέρματος από σπασμένα γυαλικά, τα εγκαύματα από πυρωμένο γυαλί ή από ανάφλεξη αντιδραστηρίων, τα εγκαύματα από νάτριο ή φώσφορο είναι τα πιο συνηθισμένα ατυχήματα στο εργαστήριο. Η κατάποση διαλυμάτων και τα πιο σοβαρά από τα παραπάνω ατυχήματα αντιμετωπίζονται μόνο από γιατρούς.

Η απροσεξία, η αδικαιολόγητη περιέργεια, η άγνοια του θεωρητικού μέρους της άσκησης που εκτελείται και η μη τήρηση των κανόνων της παραγράφου 2 είναι οι κυριότερες αιτίες ατυχημάτων στο εργαστήριο.



# ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

## ΑΣΚΗΣΗ 1

### Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

1. Διαχωρισμός κυανής δεξτράνης, κυτοχρώματος, ριβοφλαβίνης
2. Χρωματογραφική αφαλάτωση διαλύματος αιμοσφαιρίνης
3. Αγωγιμομετρικός προσδιορισμός των ιόντων  $\text{Na}^+$
4. Προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Lowry

Όνοματεπώνυμο φοιτητή

Υπογραφή επιβλέποντα



## Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

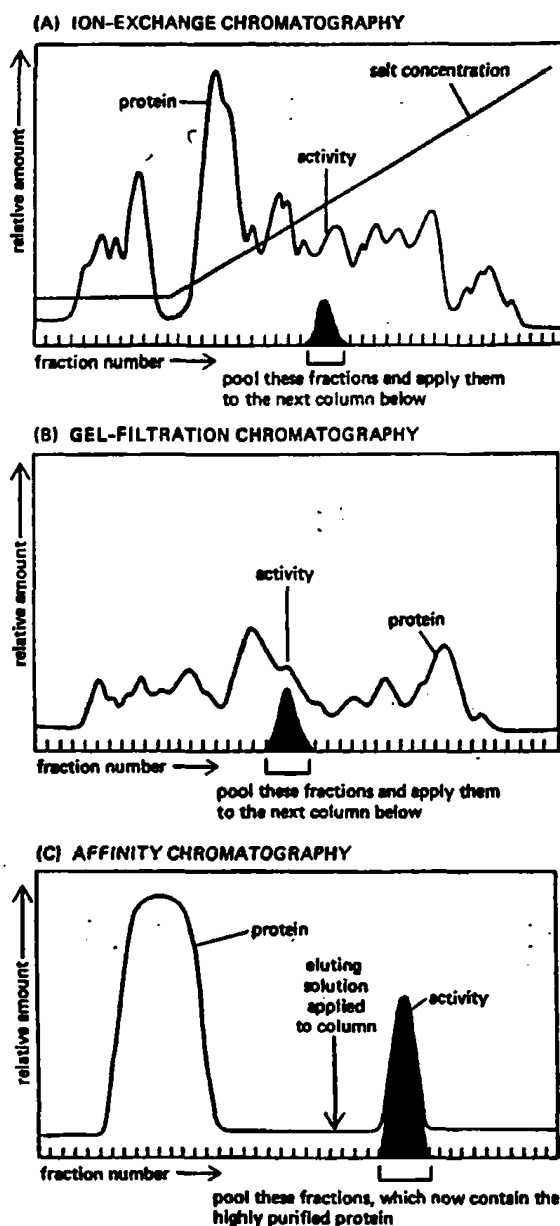
Η απομόνωση και καθαρισμός μιας πρωτεΐνης, δηλ. διαχωρισμός της από όλες τις άλλες πρωτεΐνες και τα άλλα βιομόρια ενός βιολογικού δείγματος, αποτελεί το πρώτο σημαντικό βήμα της πειραματικής διαδικασίας που θα οδηγήσει τελικά στην εξέταση της δομής και λειτουργίας της. Κατά τον σχεδιασμό ενός πρωτοκόλλου απομόνωσης, λαμβάνονται υπόψη οι ιδιαίτερες (φυσικοχημικές, ηλεκτροχημικές, βιοχημικές, ανοσοχημικές) ιδιότητες του πρωτεϊνικού μορίου, που μπορεί να είναι γνωστές εν μέρει ή επιθυμητές. Οι ιδιότητες αυτές αποτελούν απόρροια της συγκεκριμένης πρωτοταγούς δομής (αλληλοδιαδοχής αμινοξέων) της ζητούμενης πρωτεΐνης.

Μία τυπική σειρά πειραματικού σχεδιασμού ενός πρωτοκόλλου απομόνωσης περιλαμβάνει: (α) ανάπτυξη μιας δοκιμασίας (assay) ανίχνευσης της ζητούμενης πρωτεΐνης, (β) επιλογή ενός βιολογικού υλικού που θα χρησιμεύσει ως πηγή (source) της πρωτεΐνης αυτής, (γ) εκχύλιση των βιομορίων από το βιολογικό υλικό (ομοιογενοποίηση), (δ) φυγοκεντρική κλασμάτωση του εκχυλίσματος, (ε) χρωματογραφικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών, (στ) ανάλυση καθαρότητας και μοριακού μεγέθους της ζητούμενης πρωτεΐνης με ηλεκτροφόρηση επί πήγματος (gel electrophoresis). Κεντρικό στάδιο διαχωρισμού αποτελεί το στάδιο (ε) (χρωματογραφικός διαχωρισμός), το οποίο δυνατόν να περιλαμβάνει 3 διαδοχικά βήματα καθαρισμού (Εικόνα 1.1), με βάση (Α) το καθαρό ηλεκτρικό φορτίο (χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, ion-exchange chromatography) (Β) το μοριακό μέγεθος (χρωματογραφία μοριακής διήθησης, gel filtration chromatography) και (C) την συγγένεια (affinity) της ζητούμενης πρωτεΐνης προς κάποια ειδικά μόρια, π.χ. συγκεκριμένο ενζυμικό υπόστρωμα, αντισώματα κλπ. (χρωματογραφία συγγένειας, affinity chromatography). Η Άσκηση 1 αναφέρεται ειδικότερα στις πειραματικές αρχές του σταδίου (ε)-(Β) (χρωματογραφία μοριακής διήθησης, gel filtration).



## A. Αρχή της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης ή μοριακού αποκλεισμού επί πήγματος (gel filtration, size exclusion chromatography) επιτυγχάνει τον διαχωρισμό ενός μίγματος βιομορίων βάσει του μοριακού τους μεγέθους. Η μέθοδος αξιοποιεί τις ιδιότητες μιας ομάδας πολυμερών οργανικών ενώσεων που διογκώνονται σε υδατικό διάλυμα και σχηματίζουν μοριακούς ηθμούς, δηλ. τρισδιάστατα πλέγματα με καθορισμένο μέγεθος πόρων ανάλογα με τον



**Εικόνα 1.1.** Τυπικά βήματα χρωματογραφικού καθαρισμού μιας πρωτεΐνης. Τα κλάσματα που περιέχουν τη ζητούμενη πρωτεΐνη ανιχνεύονται με κάποια ειδική δοκιμασία ανίχνευσης (assay) όπου μετράται η ενεργότητα (activity) (βλ. κείμενο) [από Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 2nd edition, Garland Publishing, New York, 1989]

τύπο του υλικού. Τέτοιες ενώσεις μπορεί να είναι παράγωγα δεξτρανών (α-1,6-πολυγλυκόζης) γνωστά με την εμπορική ονομασία *Sephadex*, παράγωγα αγαρόζης (α-1,3-β-1,4-πολυγαλακτόζης) γνωστά κυρίως με την εμπορική ονομασία *Sepharose*, ή παράγωγα πολυακρυλαμιδίου (πολυπροπεναμιδίου) και δεξτρανών, γνωστά με την εμπορική ονομασία *Sephacryl*.

Η βασική αρχή της μεθόδου αναπαρίσταται διαγραμματικά στην Εικόνα 1.2α. Καταρχήν μία κατακόρυφη στήλη του πλέγματος (μοριακού ηθμού) εξισορροπείται με τον κατάλληλο διαλύτη και, στη συνέχεια, εφαρμόζεται στο επάνω μέρος της στήλης το μίγμα βιομορίων που πρόκειται να διαχωρισθούν. Κατά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, τα μικρότερου μεγέθους μόρια εισχωρούν ευχερέστερα στους πόρους του πλέγματος, μέσω των οποίων επιβραδύνεται η έκλουση τους από τη στήλη. Αντίθετα, τα μεγαλύτερου μεγέθους μόρια εισχωρούν με δυσχέρεια ή αδυνατούν τελείως να εισχωρήσουν στους πόρους του πλέγματος (*μοριακός αποκλεισμός*), με αποτέλεσμα να εκλούνται *ταχύτερα*, μέσω του ελεύθερου όγκου που αφήνουν οι πόροι του πλέγματος.

Αυτός ο "ελεύθερος" όγκος (δηλ. ο όγκος υγρού εξωτερικά των πόρων του πλέγματος) αποκαλείται **όγκος εκκένωσης** της στήλης (*void volume*) και μπορεί να υπολογισθεί από τον όγκο έκλουσης (δηλ. συνολικό όγκο υγρού που απαιτείται για την έκλουση) ενός μορίου *πλήρως αποκλειόμενου* από τους πόρους του πλέγματος, π.χ. του κυανού της δεξτράνης (*dextran blue*) (βλ. Πειραματικό μέρος, Α). Κατά συνέπεια, ο **όγκος έκλουσης** ενός οιοδήποτε μορίου (*elution volume*) θα είναι πάντοτε μεγαλύτερος ή ίσος του όγκου εκκένωσης. Ο όγκος έκλουσης εξαρτάται από τον συντελεστή κατανομής του μορίου μεταξύ *στατικής φάσης* (υγρό που συγκρατείται εντός των πόρων του πλέγματος) και *κινητής φάσης* (υγρό που κινείται εκτός των πόρων του πλέγματος). Ισχύει,

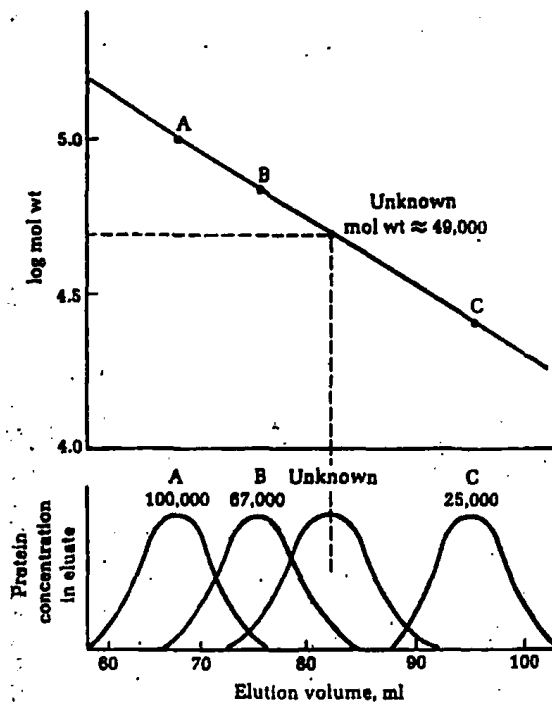
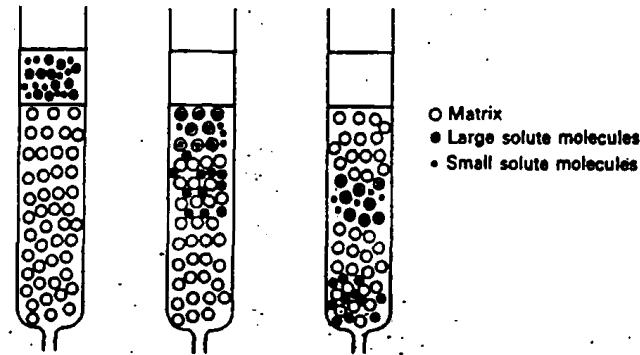
$$V_e = V_o + K_d V_i$$

[ $V_e$ , όγκος έκλουσης,  $V_o$ , όγκος εκκένωσης,  $K_d$ , συντελεστής κατανομής μεταξύ κινητής και στατικής φάσης,  $V_i$ , όγκος υγρού που συγκρατείται εντός των πόρων του πλέγματος]

Για συγκεκριμένο τύπο μοριακού ηθμού, ο όγκος έκλουσης κάθε μορίου εξαρτάται μόνον από τον συντελεστή  $K_d$ , ο οποίος είναι συνάρτηση



του μεγέθους και, κατά δεύτερο λόγο, του σχήματος του μορίου. Ο διαχωρισμός ενός μίγματος μορίων όμοιου σχήματος (π.χ. "σφαιρικών" πρωτεϊνών) βασίζεται αποκλειστικά στις διαφορές μοριακού μεγέθους (μοριακού βάρους). Η τεχνική, επομένως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς μοριακών βαρών, καθώς και για τον προσδιορισμό μοριακού βάρους αγνώστου δείγματος (Εικόνα 1.2β).



Εικόνα 1.2. (α) Πειραματική αρχή και (β) αρχή προσδιορισμού μοριακών βαρών πρωτεϊνών, με χρωματογραφία μοριακής διήθησης [από Lehninger, Biochemistry, Worth Publishers, New York, 1977]

Στο Πειραματικό μέρος της Ασκήσης, θα χρησιμοποιηθεί υλικό των τύπων Sephadex G-75 (Πειραματικό μέρος, Α) και Sephadex G-25 (Πειραματικό μέρος, Β). Η Sephadex G-75 εμφανίζει διάμετρο (ξηρών) σφαιριδίων 20-50 μm, συντελεστή διόγκωσης 12-15 (δηλ. 1 g ξηρού βάρους



δίδει ενυδατούμενο 12-15 ml πήγματος) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός ηθμός στην περιοχή μοριακών βαρών 3-70 kDa (για διαχωρισμό "σφαιρικών" πρωτεϊνών) ή 1-50 kDa (για διαχωρισμό δεξτρανών) (η μονάδα Da (Dalton) ισοδυναμεί με g ανά mol, δηλ. g ανά  $6.023 \times 10^{23}$  μόρια]. Η **Sephadex G-25** εμφανίζει διάμετρο (ξηρών) σφαιριδίων 50-100  $\mu\text{m}$ , συντελεστή διόγκωσης 4-6 (δηλ. 1 g ξηρού βάρους δίδει ενυδατούμενο 4-6 ml πήγματος) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός ηθμός στην περιοχή μοριακών βαρών 1-5 kDa (για διαχωρισμό πεπτιδίων ή μικρών "σφαιρικών" πρωτεϊνών) ή 0.1-5 kDa (για διαχωρισμό δεξτρανών). Συνήθης εφαρμογή της χρωματογραφίας Sephadex G-25 είναι ο καθαρισμός μακρομοριακών δειγμάτων από προσμίξεις μικρού μοριακού βάρους, π.χ. αφαλάτωση πρωτεϊνικών δειγμάτων (βλ. Πειραματικό μέρος, Β).

## **Β. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης**

Για την παρακολούθηση της έκλυσης πρωτεϊνικών μορίων από μία στήλη χρωματογραφίας, απαιτείται η εφαρμογή κάποιας μεθόδου προσδιορισμού της *συγκέντρωσης πρωτεΐνης* στα κλάσματα υγρού που εκλύονται (Εικόνες 1.1-1.3). Ομοίως, προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης απαιτείται σε κάθε στάδιο εφαρμογής του πρωτοκόλλου απομόνωσης μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης (π.χ. ενός ενζύμου) ώστε να μπορεί να υπολογισθεί η ειδική ενεργότητα της πρωτεΐνης αυτής (π.χ. *ειδική ενζυμική ενεργότητα*).

### **Β1. Φωτομετρία**

Οι μέθοδοι προσδιορισμού της ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης (δηλ. ποσοτικού προσδιορισμού της ολικής πρωτεΐνης ενός δείγματος) είναι κατά κανόνα φασματοφωτομετρικές, δηλ. στηρίζονται σε μέτρηση της **απορροφητικότητας (absorbance)** των ίδιων των πρωτεϊνών ή εγχρώμων παραγώγων τους σε ορισμένα μήκη κύματος. Η μαθηματική έκφραση που συνδέει την απορροφητικότητα (A) με τον χαρακτηριστικό **συντελεστή μοριακής απόσβεσης (molar extinction coefficient)** ( $\epsilon$ ) μιας χημικής ουσίας σε ορισμένο μήκος κύματος δίδεται από την σχέση (νόμο) Lambert-Beer. Η σχέση Lambert-Beer αποτελεί συνδυασμό των 2 κλασικών νόμων της φωτομετρίας, δηλ. νόμου του Lambert (η απορρόφηση είναι ανάλογη του μήκους διαδρομής του φωτός στο διάλυμα που εξετάζεται) και νόμου του Beer

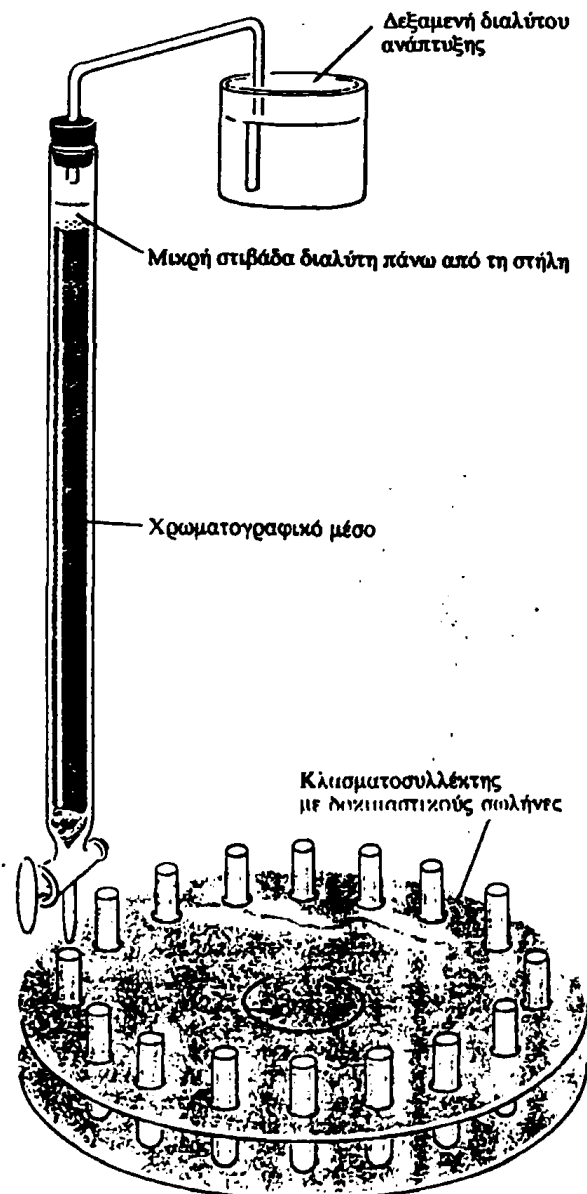




(η απορρόφηση είναι ανάλογη του αριθμού μορίων της ουσίας που απορροφά το φως). Συγκεκριμένα,

$$A = \epsilon c l$$

[A, απορροφητικότητα ή οπτική πυκνότητα (optical density, O.D.) του δείγματος σε ορισμένο μήκος κύματος,  $\epsilon$ , συντελεστής μοριακής απόσβεσης (δηλ. απορροφητικότητα ενός διαλύματος της ουσίας με συγκέντρωση 1 M, σε κυψελίδα πάχους 1 cm), c, συγκέντρωση (σε M), l, μήκος διαδρομής του φωτός, δηλ. απόσταση που διανύει το φως στο διάλυμα ή πάχος κυψελίδας όπου τοποθετείται το διάλυμα (σε cm)]



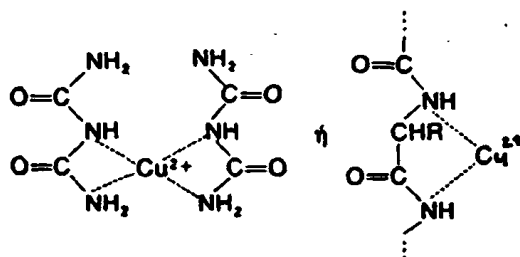
Εικόνα 1.3. Τυπική πειραματική διάταξη χρωματογραφίας στήλης [από Clark and Switzer, Πειραματική Βιοχημεία, Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992]

Οι τιμές της απορροφητικότητας (οπτικής πυκνότητας) καταγράφονται με ειδικά όργανα (φασματοφωτόμετρα) τα οποία μετρούν την ένταση προσπίπτοντος και εξερχόμενου μονοχρωματικού φωτός και μεταγράφουν τις τιμές αυτές ως απορροφητικότητα (A, absorbance),  $A = \log(I_0/I)$ , ή διαπερατότητα (T, transmittance),  $T = I/I_0$ , του δείγματος ( $I_0$  η ένταση προσπίπτοντος φωτός,  $I$  η ένταση εξερχόμενου φωτός).

## B2. Φωτομετρικός προσδιορισμός πρωτεΐνης

Κοινές φωτομετρικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό ολικής πρωτεΐνης είναι:

1. Άμεσος φωτομετρικός προσδιορισμός στο υπεριώδες,
  - 1α. (κατά Warburg-Christian), στα 275-280 nm (απορροφητικότητα των πλευρικών ομάδων τρυπτοφάνης και τυροσίνης). Ανίχνευση 0.05-2.0 mg. Παρεμπόδιση από άλλα βιομόρια, ιδίως νουκλεϊκά οξέα, που απορροφούν έντονα στην περιοχή αυτή.
  - 1β. (κατά Waddell-Wetlaufer), στα 215-225 nm (απορροφητικότητα των πεπτιδικών δεσμών). Ανίχνευση 0.01-0.1 mg. Παρεμπόδιση από μη πρωτεϊνικές χημικές ομάδες.
2. Έμμεσος φωτομετρικός προσδιορισμός (εγχρώμων πρωτεϊνικών παραγώγων) στο ορατό,
  - 2α. μέθοδος διουρίας, στηριζόμενη σε σχηματισμό χηλικών συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνικών αμινομάδων και  $\text{Cu}^{2+}$ , ιώδους-κυανού χρώματος (545-550 nm) (Εικόνα 1.4). Ανίχνευση 1-10 mg.
  - 2β. μέθοδος Lowry, στηριζόμενη σε συνδυασμό της αντίδρασης διουρίας (2α) με την αντίδραση Folin-Ciocalteu (αναγωγή φωσφοβολφραμικών-φωσφομολυβδαινικών ιόντων από  $\text{Cu}^{1+}$  δηλ. το προϊόν αναγωγής του  $\text{Cu}^{2+}$  από πλευρικές ομάδες τρυπτοφάνης ή τυροσίνης), που αυξάνει την ευαισθησία φωτομέτρησης στα 545-550 nm. Ανίχνευση 0.01-0.2 mg.



Εικόνα 1.4. Σύμπλοκα αντίδρασης διουρίας



2γ. **μέθοδος Bradford**, στηριζόμενη στην ιδιότητα της χρωστικής Commassie brilliant blue να αλλάζει χρώμα (από βέλτιστο απορρόφησης 465 nm σε βέλτιστο απορρόφησης 595 nm) κατά τη σύμπλεξη της με πρωτεΐνες, σε όξινο περιβάλλον. Ανίχνευση 0.005 - 0.1 mg.

Στο Πειραματικό μέρος, θα εφαρμοσθεί η μέθοδος Lowry. Οι τιμές απορροφητικότητας των δειγμάτων έκλουσης θα συγκριθούν προς τιμές αναφοράς (διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων μιας πρωτεΐνης αναφοράς, συγκεκριμένα της λευκωματίνης ορού βοός, BSA). Θα κατασκευασθεί καμπύλη αναφοράς, δηλ. διάγραμμα απορροφητικότητας συναρτήσει των γνωστών τιμών συγκέντρωσης πρωτεΐνης (BSA). Με βάση την καμπύλη αναφοράς θα υπολογισθούν οι τιμές συγκέντρωσης πρωτεΐνης των αγνώστων δειγμάτων. Η αναγωγή αυτή είναι επιτρεπτή λόγω της γραμμικότητας της φωτομετρικής σχέσης Lambert-Beer (βλ. ανωτέρω).

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A. Παρατήρηση χρωματογραφικού διαχωρισμού εγχρώμων ουσιών

*[Ιστορικά, έγχρωμες ουσίες (φωτοσυνθετικές χρωστικές) ήσαν και τα πρώτα βιομόρια που διαχωρίστηκαν χρωματογραφικά (Michael Tswett, 1906), γεγονός που δικαιολογεί και την επιλογή του όρου "χρωματογραφία", chromatography]*

Σε στήλη (10 cm X 1 cm) πήγματος Sephadex G-75, ολικού όγκου 9 ml, εξισορροπημένη σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού καλίου, 0.1 M, pH 6.0, εφαρμόσατε προς διαχωρισμό μίγμα (0.6 ml) που περιέχει κυανού της δεξτράνης (0.4 mg), κυτόχρωμα c (0.8 mg) και ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B<sub>2</sub>) (0.02 mg). Θα παρατηρηθεί ο διαχωρισμός των 3 εγχρώμων μορίων επί της στήλης, βάσει του μοριακού τους μεγέθους. Δίδονται τα αντίστοιχα μοριακά βάρη (MB) και χαρακτηριστικά βέλτιστα απορρόφησης στην περιοχή του ορατού (λ).



ΜΟΡΙΟ	ΧΡΩΜΑ	$\lambda$ (nm)	MB (kDa)
κυανού δεξτράνης	κυανού	620	>500
κυτόχρωμα c	ερυθρό	530	12.4
ριβοφλαβίνη	κίτρινο	445	0.376

Επίσης, θα συλλεγούν 15 κλάσματα εκλουόμενου υγρού (του 1 ml) τα οποία, μετά από κατάλληλη αραιώση (1:8 έως 1:10, v/v, ανάλογα με τις οδηγίες του επιβλέποντα), φωτομετρούνται στα 3 αντίστοιχα μήκη κύματος.

### **B. Χρωματογραφική αφαλάτωση διαλύματος αιμοσφαιρίνης**

Η εφαρμογή αυτή περιλαμβάνει απομάκρυνση NaCl από ένα διάλυμα αιμοσφαιρίνης και προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης (αιμοσφαιρίνης) στο αφαλατωμένο δείγμα. Σε στήλη (10 cm X 1 cm) πήγματος Sephadex G-25, ολικού όγκου 9 ml, εφαρμόζεται προς διαχωρισμό υδατικό διάλυμα (0.8 ml) που περιέχει αιμοσφαιρίνη (Hb) και NaCl (0.1 M). Θα συλλεγούν 10 κλάσματα όγκου 1 ml. Στα κλάσματα αυτά (μετά από αραιώση 1:20, v/v) μετράται η συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (με άμεση φωτομέτρηση στα 550 nm) και η συγκέντρωση άλατος (με αγωγιμομέτρηση, βλ. κατωτέρω).

### **B1. Αγωγιμομετρικός προσδιορισμός $\text{Na}^+$ στα κλάσματα έκλουσης**

Η αγωγιμότητα (conductivity) ενός υδατικού διαλύματος είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση ηλεκτρολυτών και συσχετίζεται με την ιοντική ισχύ. Εκφράζει την ευχέρεια διέλευσης του ηλεκτρικού ρεύματος μέσω του διαλύματος και η τιμή της είναι αντίστροφη της τιμής ηλεκτρικής αντίστασης. Μετράται με ειδικά όργανα, τα αγωγιμόμετρα, σε τιμές S (Siemens =  $1/\Omega$  = Mho). Ενδεικτικές τιμές αγωγιμότητας είναι, του απεσταγμένου ύδατος  $2 \times 10^{-4}$  S, ενώ του κατεξοχήν καθαρού ύδατος (διπλής απόσταξης)  $5 \times 10^{-6}$  S.

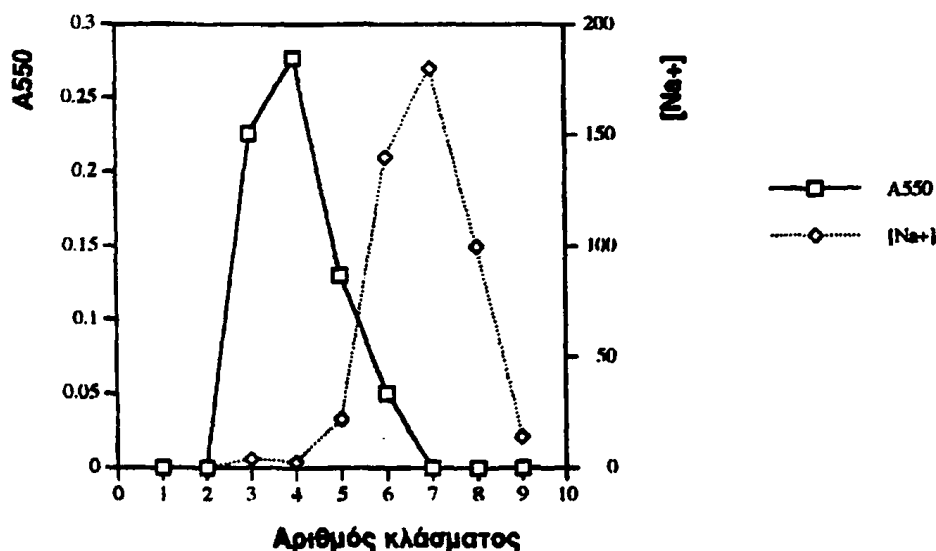
Οι τιμές αγωγιμότητας ( $\Lambda$ ) θα μετρηθούν, κατά τις οδηγίες του επιβλέποντα, στα εκλουόμενα κλάσματα της στήλης Sephadex G-25 (βλ. ανωτέρω, B). Οι τιμές αυτές αντιστοιχούν στις τιμές συγκέντρωσης ιόντων  $\text{Na}^+$ .



Εναλλακτικά, η μέτρηση ιόντων  $\text{Na}^+$  μπορεί να γίνει με την τεχνική της φλογομετρίας, η οποία ανιχνεύει ιόντα  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ή  $\text{Li}^+$  (βλ. Παραρτήματα, Φλογοφωτόμετρο).

## B2. Κατασκευή διαγράμματος έκλουσης

Από τις τιμές φωτομέτρησης (B) και αγωγιμομέτρησης (B1) κατασκευάζονται στο ίδιο σχήμα δύο διαγράμματα έκλουσης, ένα για την αιμοσφαιρίνη ( $A_{550 \text{ nm}}$  έναντι αριθμού κλάσματος) και ένα για το  $\text{Na}^+$  ( $\Lambda$  [σε S,  $\times 10^3$ ] έναντι αριθμού κλάσματος). Τυπικά διαγράμματα έκλουσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.5. Τα κλάσματα έκλουσης που περιέχουν αιμοσφαιρίνη αλλά όχι  $\text{Na}^+$ , δηλ. κλάσματα καθαρής (αφαλατωμένης) αιμοσφαιρίνης (π.χ. κλάσματα 3 και 4 στην Εικόνα 1.5) συνενώνονται, προσδιορίζεται ο συνολικός τους όγκος (σε ml), και ορίζονται ως δείγμα αιμοσφαιρίνης στο Πειραματικό μέρος B3.



Εικόνα 1.5. Τυπικά διαγράμματα έκλουσης αιμοσφαιρίνης ( $A_{550\text{nm}}$ ) και  $\text{Na}^+$  (mS) από στήλη χρωματογραφικής αφαλάτωσης G-25

## B3. Προσδιορισμός πρωτεΐνης (κατά Lowry)

Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

	(όγκοι σε ml)						
δισ-απεσταγμένο ύδωρ	2	1.6	1.2	0.8	0.4	1.9	1.8
BSA (0.1 mg/ml)	0	0.4	0.8	1.2	1.6	0	0
Δείγμα (από B2)	0	0	0	0	0	0.1	0.2

Αλκαλικό διάλυμα $\text{Cu}^{2+}$	6	6	6	6	6	6	6
	επώαση, 10 min, θερμοκρασία δωματίου						
Folin-Ciocalteau	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	επώαση, 30 min, θερμοκρασία δωματίου						
$A_{550 \text{ nm}}$							

Οι τιμές της τελευταίας σειράς θα συμπληρωθούν από τις πειραματικές σας μετρήσεις. Η φωτομέτρηση θα γίνει κατά τις οδηγίες του επιβλέποντα. Τα αντιδραστήρια είναι: αλκαλικό διάλυμα  $\text{Cu}^{2+}$ , διάλυμα  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1% (w/v), 1 ml, διάλυμα τρυγικού νατρίου, 2% (w/v), 1 ml, διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2% (w/v), 98 ml, σε 0.1 N NaOH, Folin-Ciocalteau, αντιδραστήριο φαινόλης κατά Folin-Ciocalteau (Sigma Chemical Co.). Πρωτεΐνη αναφοράς: BSA, λευκωματίνη (αλβουμίνη) ορού βοός [bovine serum albumin].

Από τις τιμές οπτικής πυκνότητας ( $A_{550 \text{ nm}}$ ) έναντι μάζας BSA (στον ορισμένο συνολικό όγκο των 8.3 ml) θα κατασκευασθεί καμπύλη αναφοράς για την μέτρηση κατά Lowry, η οποία θα πρέπει να δίδει γραμμική συσχέτιση στην περιοχή συγκεντρώσεων πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει (ελάχιστη περιοχή γραμμικότητας 0.04 - 0.1 mg). Στη συνέχεια, θα καταγραφούν οι τιμές οπτικής πυκνότητας για το δείγμα (αιμοσφαιρίνης) και, με βάση την καμπύλη αναφοράς BSA, θα αναχθούν σε τιμές μάζας πρωτεΐνης και, τέλος, σε τιμές συγκέντρωσης πρωτεΐνης (αιμοσφαιρίνης) στο δείγμα (σε mg/ml δείγματος).



## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ

### Πειραματικό μέρος Α

Κλάσμα	$A_{620 \text{ nm}}$	$A_{530 \text{ nm}}$	$A_{445 \text{ nm}}$
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			

### Πειραματικό μέρος Β-Β1

Κλάσμα	Φωτομέτρηση $A_{550 \text{ nm}}$	Αγωγιμομέτρηση $\Lambda (\text{Na}^+) [\text{S}, \text{X}10^3]$
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
9		
10		



## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ (συνέχεια)

Πειραματικό μέρος Β2-Β3

Ογκος δείγματος (ml)	BSA (mg)	$A_{550\text{ nm}}$
	0	
	0.4	
	0.8	
	1.2	
	1.6	
0.1		
0.2		

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Πειραματικό μέρος Β2: Διαγράμματα έκλυσης αιμοσφαιρίνης (B) και  $\text{Na}^+$  (B1), στο ίδιο σχήμα.

Πειραματικό μέρος Β3: Πρότυπη καμπύλη Lowry (ως προς BSA)

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Πειραματικό μέρος Β3: Συγκέντρωση πρωτεΐνης στο δείγμα της αφαλατωμένης αιμοσφαιρίνης (σε mg/ml).





## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΠΕΔΩΣΗΣ

Πειραματικό μέρος Α:

1. Πώς ερμηνεύεται η σειρά έκλουσης των 3 εγχρώμων μορίων;
2. Γιατί το κυανού της δεξτράνης χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης του όγκου εκκένωσης (void volume);

Πειραματικό μέρος Β:

3. Που στηρίζεται η αρχή της χρωματογραφίας αφαλάτωσης; Θα μπορούσε στο πείραμα σας να χρησιμοποιηθεί Sephadex G-75 αντί της Sephadex G-25 και γιατί; [Δίδονται οι τιμές μοριακών βαρών (MB) αιμοσφαιρίνης, 64.4 kDa, και NaCl, 58.5 Da]
4. Ποια η συνεισφορά του αλκαλικού διαλύματος  $\text{Cu}^{2+}$  και ποια η συνεισφορά του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu στη μέθοδο Lowry;



# ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

## ΑΣΚΗΣΗ 2

### Ενζυμική Κινητική -1

1. Καμπύλη προόδου αντίδρασης αλκαλικής φωσφατάσης
2. Καμπύλη ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης του ενζύμου
3. Προσδιορισμοί ενζυμικής ενεργότητας

**Ονοματεπώνυμο φοιτητή**

**Υπογραφή επιβλέποντα**



## **Ενζυμική Κινητική -1**

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ**

Από τις πρωτεΐνες που έχουν καταγραφεί, χαρακτηρισθεί και αναλυθεί διεξοδικά έως σήμερα, ως προς τη δομή και λειτουργία τους, οι περισσότερες ανήκουν στην ομάδα των ενζύμων, είναι δηλ. **πρωτεΐνες που καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις**. Τα ένζυμα είναι βιομόρια τα οποία (α) επιταχύνουν μία χημική αντίδραση μειώνοντας το φράγμα της ενέργειας ενεργοποίησης, (β) δεν αναλώνονται και δεν υφίστανται μόνιμη χημική μεταβολή κατά την καταλυτική διαδικασία, (γ) δεν μεταβάλλουν τη θέση χημικής ισορροπίας της αντίδρασης, αλλά μόνο την ταχύτητα με την οποία επέρχεται η χημική ισορροπία, (δ) ενεργούν μέσω σχηματισμού ενός παροδικού συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Επίσης, τα ένζυμα λειτουργούν σε ορισμένο εύρος βιοχημικών συνθηκών, δηλ. συγκεκριμένη περιοχή θερμοκρασιών, pH, και σε ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν ειδικά μόρια-ενεργοποιητές ή συμπαραγόντες (cofactors), δεν περιέχουν αντίστοιχα ειδικά μόρια-αναστολείς (inhibitors) κλπ.

Τα ένζυμα ταξινομούνται γενικά σε έξι κατηγορίες, ανάλογα με τον τύπο χημικής αντίδρασης που καταλύουν: (1) **οξειδοαναγωγάσες**, για αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, (2) **τρανσφεράσες** (μεταφοράσες), για μεταφορά χημικών ομάδων (π.χ. φωσφορικής ομάδας) από μόριο σε μόριο, (3) **υδρολάσες**, για υδρολυτική διάσπαση χημικών δεσμών, (4) **λυάσες**, για διάσπαση ή σχηματισμό διπλών δεσμών με προσθήκη ή αφαίρεση χημικών ομάδων, (5) **ισομεράσες**, για ενδομοριακή αναδιάρθρωση με σχηματισμό ισομερών μορφών, (6) **λιγάσες** (δεσμάσες), για αντιδράσεις συμπύκνωσης μεταξύ δύο μορίων (δηλ. σχηματισμό χημικού δεσμού) με αξιοποίηση χημικής ενέργειας από τη διάσπαση του ATP. Εκτός από το κοινό τους όνομα (που περιγράφει συνοπτικά την λειτουργία τους), όλα τα ένζυμα έχουν και ένα επίσημο, αριθμητικό όνομα (που υποδηλώνει τη συστηματική τους κατάταξη σε ομάδες, υποομάδες, κλπ.), όπως δίδεται από μία διεθνή, επιστημονική Επιτροπή Ενζύμων (Enzyme Commission, EC).

Με τον όρο **Ενζυμική Κινητική** (Enzyme Kinetics) εννοούμε την ανάλυση του μηχανισμού της ενζυμικής κατάλυσης, δηλ. μελέτη των



παραγόντων που επηρεάζουν την ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων. Οι παράγοντες αυτοί είναι η συγκέντρωση ενζύμου, η συγκέντρωση μορίων που συνδέονται με το ένζυμο κατά την κατάλυση (ligands), δηλ. συγκεντρώσεις αντιδρώντων (ενζυμικών υποστρωμάτων) (substrates), προϊόντων (products), αναστολέων (inhibitors) ή ενεργοποιητών (activators), το pH, η ιοντική ισχύς, και η θερμοκρασία. Η κινητική ανάλυση μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να δώσει σημαντικά στοιχεία ( $\alpha$ ) για την ταξινόμηση και διάκριση του τύπου του ενζύμου (βλ. ανωτέρω), ( $\beta$ ) για τον τρόπο βιολογικής ρύθμισης της ενεργότητας του ενζύμου αυτού in vivo, ( $\gamma$ ) για την ταυτότητα των πλευρικών ομάδων αμινοξέων που συνδέονται με το υπόστρωμα κατά την κατάλυση (δηλ. αμινοξέων του ενεργού κέντρου του ενζύμου), ( $\delta$ ) για τον σχεδιασμό ενός θεωρητικού υποδείγματος (μοντέλου) του μηχανισμού της ενζυμικής αντίδρασης, ( $\epsilon$ ) για την πιθανή χρησιμοποίηση του συγκεκριμένου ενζύμου ως ερευνητικού εργαλείου (tool) σε εφαρμογές τεχνικών βασικής έρευνας, κλινικής διάγνωσης, ανάλυσης τροφών, βιοτεχνολογίας, κλπ.

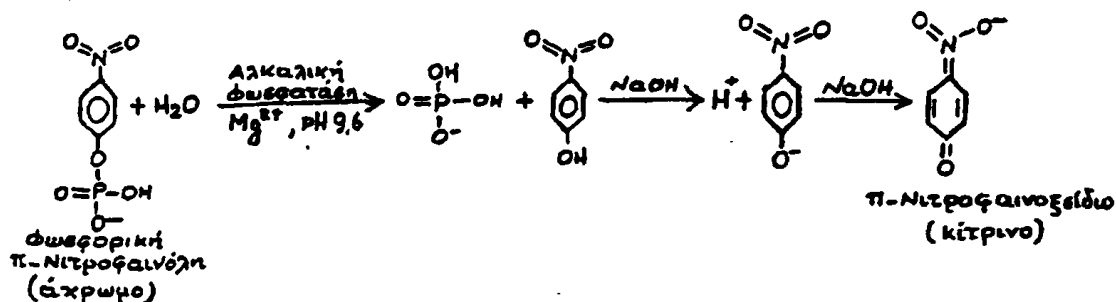
Η κινητική μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων δεν εφαρμόζεται σε ετερογενή παρασκευάσματα, αλλά σε παρασκευάσματα απομονωμένου ενζύμου, ώστε να βελτιστοποιείται ο έλεγχος των συνθηκών (συγκεντρώσεων αναστολέων, υποστρώματος κλπ.) στη δοκιμασία μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας (enzyme assay). Στις Ασκήσεις 2-3, θα μελετηθούν οι κινητικές παράμετροι για το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (EC 3.1.3.1). Τα πειράματα θα γίνουν με καθαρισμένο ενζυμικό παρασκεύασμα που έχει απομονωθεί από εντερικό βλεννογόνο βοός μετά από στάδιο χρωματογραφίας συγγένειας (βλ. και Άσκηση 1, Εισαγωγή).

#### **A. Το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση**

Η αλκαλική φωσφατάση (EC 3.1.3.1) (φωσφοϋδρολάση φωσφορικών μονοεστέρων, με βέλτιστο ενεργότητα σε αλκαλικό pH) έχει ευρύτατη εξελικτική κατανομή, δηλ. απαντάται στα περισσότερα είδη έμβιων οργανισμών, από τα βακτήρια ως τα θηλαστικά. Λειτουργεί ως γλυκοσυλιωμένο ομοδιμερές (μοριακό βάρος υπομονάδας 70-80 kDa) αγκυροβολημένο στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Αναγνωρίζει και φωσφοϋδρολύει μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, συμμετέχοντας μεταξύ των άλλων στη μεταφορά μεταβολιτών δια μέσου της



μεμβράνης. Το βέλτιστο pH ενζυμικής ενεργότητας για την αλκαλική φωσφατάση είναι 9.2-9.8, ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης θα πρέπει να είναι υψηλής ιοντικής ισχύος και να περιέχει δισθενή κατιόντα ως ενεργοποιητές (συνήθως  $Mg^{2+}$ ). Γνωστοί αναστολείς του ενζύμου είναι μεταξύ άλλων τα αμινοξέα L-λευκίνη και L-φαινυλαλανίνη (βλ. Άσκηση 3).



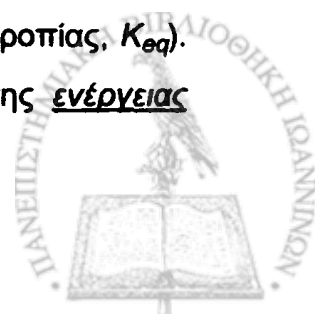
Εικόνα 2.1. Αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης με υπόστρωμα φωσφορική π-νιτροφαινόλη (PNPP)

Σε *in vitro* δοκιμασίες (assays) προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας, το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης είναι η φωσφορική π-νιτροφαινόλη (PNPP). Η PNPP (Εικόνα 2.1) φωσφοϋδρολύεται προς π-νιτροφαινόλη (PNP), η οποία σε αλκαλικό περιβάλλον μεταπίπτει προς π-νιτροφαινοξείδιο, μία ένωση με έντονο κίτρινο χρώμα (φωτομετρείται συνήθως στα 405 nm, όπου έχει συντελεστή μοριακής απόσβεσης  $\epsilon = 18750 M^{-1} cm^{-1}$ , βλ. Άσκηση 1). Ο προσδιορισμός αλκαλικής φωσφατάσης έχει σημαντικές εργαστηριακές εφαρμογές, τόσο στη βασική βιοχημική έρευνα όσο και στην κλινική διαγνωστική (π.χ. χρησιμεύει ως ενζυμικός δείκτης διαταραχών συνδεόμενων με οστεοπάθεια, συζεύγματα αλκαλικής φωσφατάσης με αντισώματα χρησιμοποιούνται σε κοινές ανοσοχημικές τεχνικές όπως ELISA και Western blotting) (βλ. Άσκηση 8).

## Β. Καμπύλη προόδου και αρχική ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης

Ως βιολογικός καταλύτης, ένα ένζυμο επιταχύνει μία χημική αντίδραση χωρίς να μεταβάλλει την τελική θέση ισορροπίας. Η ενζυμική χημική αντίδραση διαφέρει από μία αντίστοιχη μη ενζυμική αντίδραση μόνον **κινητικά** (αυξημένη ταχύτητα) και **όχι θερμοδυναμικά** (ίδια τιμή διαφοράς ελεύθερης ενέργειας μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων,  $\Delta G$ , ίδια τιμή σταθεράς ισορροπίας,  $K_{eq}$ ).

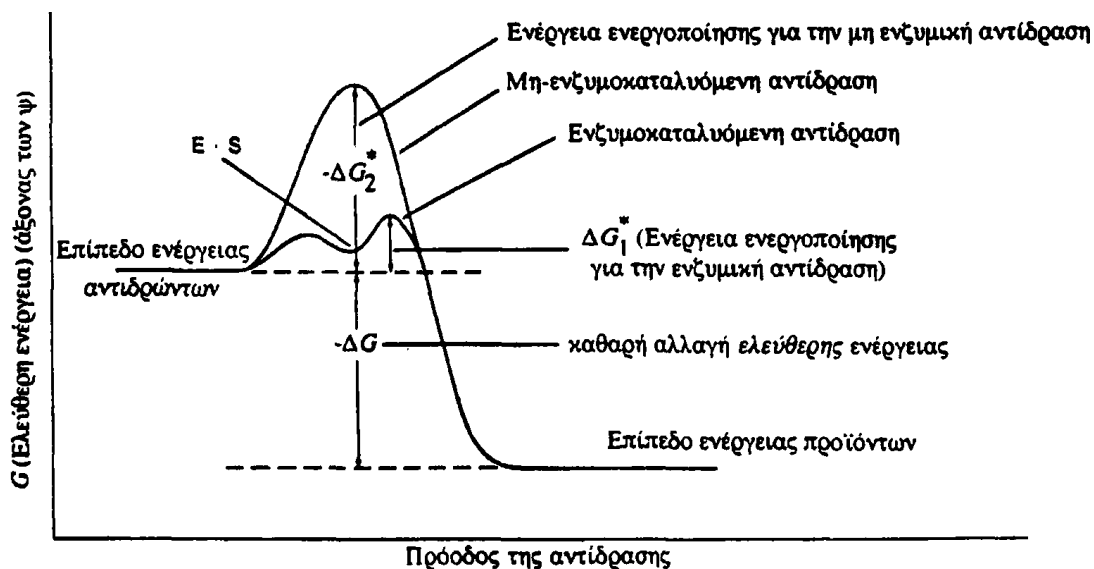
Αύξηση της ταχύτητας αντίδρασης επιτυγχάνεται με μείωση της ενέργειας



ενεργοποίησης, δηλ. της ελάχιστης επιπρόθετης ενέργειας που απαιτείται ώστε τα μόρια των αντιδρώντων να φθάσουν σε κατάσταση μετάπτωσης που θα επιτρέψει μετατροπή αντιδρώντων (S) σε προϊόντα (P). Ο τρόπος με τον οποίο τα ένζυμα επιτυγχάνουν μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης είναι με σχηματισμό ενός παροδικού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (ES). Με το μοριακό σύμπλοκο ES, τα μόρια υποστρώματος διευθετούνται πολύ ευνοϊκότερα (στο ενεργό κέντρο του ενζύμου), ώστε η ενέργεια ενεργοποίησης να είναι μικρότερη (Εικόνα 2.2). Η ενζυμική χημική αντίδραση, στην πλέον απλοποιημένη μορφή της, μπορεί να περιγραφεί ως εξής:



[S, υπόστρωμα, E, ένζυμο (ελεύθερο υποστρώματος), ES, σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, P, προϊόν].



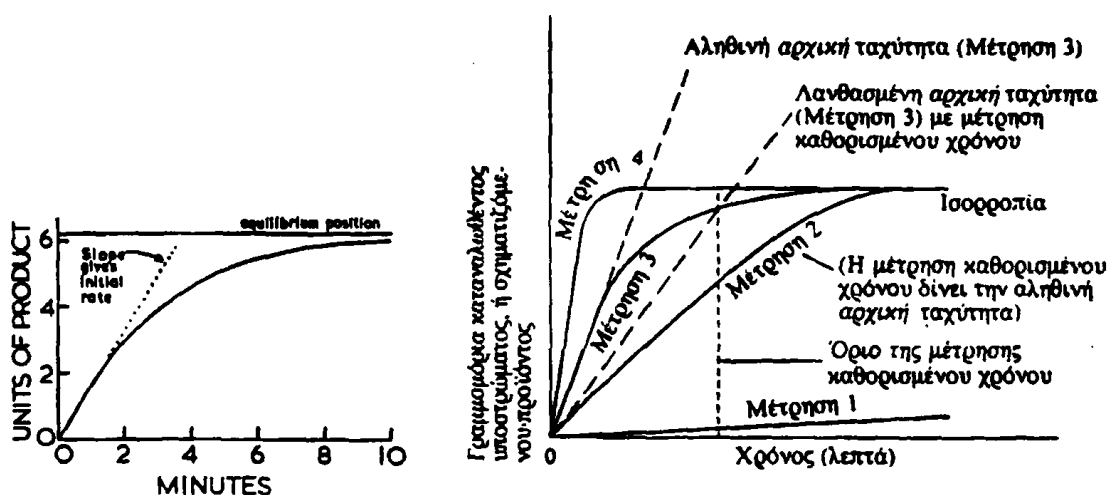
**Εικόνα 2.2.** Ενεργειακό διάγραμμα της προόδου μιας ενζυμικής αντίδρασης [από Clark and Switzer, Πειραματική Βιοχημεία, Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992]

Ο A. J. Brown (1902) και, στη συνέχεια, ο Henri, ήσαν οι πρώτοι που διατύπωσαν την έννοια του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, και οι L. Michaelis και M. Menten (1913) οι πρώτοι που εξέτασαν την κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων συστηματικά. Η ανάλυση της ανωτέρω χημικής αντίδρασης κατά Michaelis και Menten (1913) και κατά Briggs και Haldane (1925) οδηγεί στην πρόβλεψη μιας μαθηματικής σχέσης εξάρτησης της



αρχικής ταχύτητας ενζυμικής αντίδρασης από τον παράγοντα συγκέντρωση υποστρώματος (S). Η σχέση αυτή θα εξετασθεί πειραματικά στην Άσκηση 3. Στην Άσκηση 2, θα εξετασθεί η αρχική ταχύτητα υπό συνθήκες όπου η συγκέντρωση υποστρώματος (S) είναι πολύ υψηλή και δεν επηρεάζει την πρόοδο της αντίδρασης (συνθήκες κορεσμού με υπόστρωμα, βλ. αμέσως κατωτέρω).

Κατά την χρονική πορεία μιας ενζυμικής αντίδρασης, η συγκέντρωση υποστρώματος [S] συνεχώς ελαττώνεται, ενώ η συγκέντρωση προϊόντος [P] αυξάνει. Σε συνθήκες, ωστόσο, μεγάλης περίσσειας υποστρώματος, η ελάττωση συγκέντρωσης υποστρώματος κατά την αρχική περίοδο της αντίδρασης μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα. Στην περίπτωση αυτή, η αρχική ταχύτητα είναι πρακτικά "ανεξάρτητη" από τη συγκέντρωση υποστρώματος (συνθήκες κορεσμού υποστρώματος). Επομένως, η αύξηση του παραγόμενου προϊόντος συναρτήσει του χρόνου θα είναι αρχικά γραμμική (σταθερή αρχική ταχύτητα αντίδρασης), εφόσον οι υπόλοιπες συνθήκες (συγκέντρωση ενζύμου, θερμοκρασία κλπ.) διατηρούνται σταθερές. Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, όμως, καθώς η αντίδραση προσεγγίζει την τελική θέση ισορροπίας, η ταχύτητα αντίδρασης μειώνεται, λόγω (α) μείωσης της συγκέντρωσης υποστρώματος, (β) αύξησης της συγκέντρωσης προϊόντος (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3. Γραφικές παραστάσεις της καμπύλης πρόοδου ενζυμικής αντίδρασης [από Engel, Enzyme Kinetics, Chapman & Hall, London, 1981, Clark and Switzer, Πειραματική Βιοχημεία, Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992]



Στο Πειραματικό μέρος, εξετάζεται επίσης η συνάρτηση μεταξύ αρχικής ταχύτητας αντίδρασης και συγκέντρωσης ενζύμου. Η συνάρτηση αυτή (υπό συνθήκες κορεσμού με υπόστρωμα) είναι επίσης γραμμική, για ορισμένο εύρος συγκεντρώσεων ενζύμου. Η γραμμική συνάρτηση μεταξύ αρχικής ταχύτητας και συγκέντρωσης ενζύμου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του *αριθμού μετατροπής* (turnover number) του ενζύμου, δηλ. του αριθμού μορίων υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μόριο ενζύμου, ανά μονάδα χρόνου.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A. Καμπύλη προόδου της αντίδρασης αλκαλικής φωσφατάσης

Στο κατωτέρω πρωτόκολλο (α) το υπόστρωμα (PNPP) δίδεται σε περίσσεια (συνθήκες κορεσμού υποστρώματος, Εισαγωγή Β), (β) έχει προεπιλεγεί η συγκέντρωση ενζύμου ώστε να υπάρχει επαρκής χρόνος για την μέτρηση της αρχικής ταχύτητας (Εικόνα 2.3), (γ) έχουν επίσης προεπιλεγεί οι λοιπές συνθήκες (ιοντική ισχύς, pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου, απουσία ενζυμικών αναστολέων).

	(όγκοι σε ml)					
υπόστρωμα	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
δισ-απεσταγμένο ύδωρ	0.3	0	0	0	0	0
EC 3.1.3.1	0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	<b>επώαση, θερμοκρασία δωματίου</b>					
χρόνος (min)	20	1	2	5	10	20
NaOH (1 N)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
$A_{405 \text{ nm}}$						

Υπόστρωμα = φωσφορική π-νιτροφαινόλη (PNPP), 2.7 M σε ρυθμιστικό διάλυμα διαιθανολαμίνης, 1 M,  $MgCl_2$ , 1 mM, pH 9.6, EC 3.1.3.1 = Διάλυμα





αλκαλικής φωσφατάσης (4.8 mg/ml), αραιωθέν 1:40000 (v/v), σε ρυθμιστικό διάλυμα διαιθανολαμίνης, 1 M, MgCl<sub>2</sub>, 1 mM, pH 9.6

Από τα δεδομένα που θα ληφθούν κατασκευάζεται καμπύλη προόδου της αντίδρασης συναρτήσει του χρόνου και προσδιορίζονται: (α) η αρχική ταχύτητα (από την περιοχή γραμμικότητας, Εικόνα 2.3), (β) ο καταλληλότερος χρόνος που θα πρέπει να επιλεγεί για την μελέτη της εξάρτησης της αρχικής ταχύτητας από τη συγκέντρωση ενζύμου (Πειραματικό μέρος Β) (Εικόνα 2.3).

### Β. Εξάρτηση της αρχικής ταχύτητας αντίδρασης από τη συγκέντρωση ενζύμου

Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

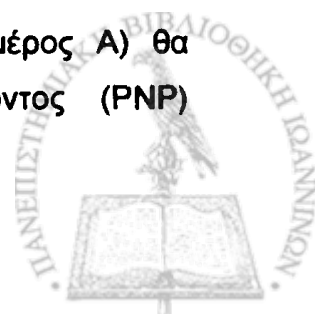
	(όγκοι σε ml)								
υπόστρ/μα	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
ddH <sub>2</sub> O	0.30	0.29	0.28	0.26	0.22	0.18	0.15	0.10	0.05
EC 3.1.3.1	0	0.01	0.02	0.04	0.08	0.12	0.15	0.20	0.25
<b>επώαση, θερμοκρασία δωματίου</b>									
<i>Η χρονική διάρκεια επώασης θα επιλεγεί από τα δεδομένα του Πειρ. μέρους Α</i>									
NaOH, 1 N	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
A <sub>405 nm</sub>									

Υπόστρωμα = φωσφορική π-νιτροφαινόλη (PNPP), 2.7 M σε ρυθμιστικό διάλυμα διαιθανολαμίνης, 1 M, MgCl<sub>2</sub>, 1 mM, pH 9.6, EC 3.1.3.1 = Διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης (4.8 mg/ml), αραιωθέν 1:40000 (v/v), σε ρυθμιστικό διάλυμα διαιθανολαμίνης, 1 M, MgCl<sub>2</sub>, 1 mM, pH 9.6

Από τα δεδομένα, θα κατασκευασθεί καμπύλη εξάρτησης της αρχικής ταχύτητας αντίδρασης από τη συγκέντρωση ενζύμου και θα προσδιορισθεί ο αριθμός μετατροπής (turnover number) (βλ. Εισαγωγή, Β).

### Γ. Ενζυμική ενεργότητα και ειδική ενζυμική ενεργότητα του παρασκευάσματος της αλκαλικής φωσφατάσης

Από την καμπύλη προόδου της αντίδρασης (Πειραματικό μέρος Α) θα προσδιορισθούν καταρχήν οι τιμές συγκέντρωσης προϊόντος (PNP)



συναρτήσει του χρόνου, με βάση τις τιμές  $A_{405 \text{ nm}}$  και τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης του *p*-νιτροφαινοξειδίου (Εισαγωγή Α). Για τον προσδιορισμό των τιμών αυτών θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ο τύπος Lambert-Beer (Άσκηση 1, Εισαγωγή Β1). Στη συνέχεια, από την κλίση της γραμμικής περιοχής της καμπύλης προόδου θα προσδιορισθεί η αρχική ταχύτητα αντίδρασης (σε  $\mu\text{mol}$  παραγόμενης PNP ανά  $\text{min}$ ). Οι τιμές αυτές θα αναφέρονται ως μονάδες ενζυμικής ενεργότητας (Units) ( $1 \text{ Unit} = 1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$ ).

Θα προσδιορισθούν επίσης

(α) η ενζυμική ενεργότητα του παρασκευάσματος EC 3.1.3.1, σε  $\text{U}/\text{ml}$

(β) η ειδική ενζυμική ενεργότητα του παρασκευάσματος, σε  $\text{U}/\text{mg}$

[η τιμή (β) θα συγκριθεί προς επαλήθευση με την τιμή που αναγράφεται από τον Εμπορικό Οίκο, Sigma Chemical Co., π.χ. η αναγραφόμενη τιμή του παρασκευάσματος που χρησιμοποιήθηκε κατά το Ακαδημ. έτος 2000-01 ήταν  $2083 \text{ U}/\text{mg}$ ]

Από την καμπύλη εξάρτησης της ταχύτητας από τη συγκέντρωση ενζύμου (Πειραματικό μέρος Β) θα προσδιορισθούν και πάλι οι τιμές συγκέντρωσης προϊόντος (PNP), όπως προηγουμένως, και στη συνέχεια, από την κλίση της γραμμικής περιοχής της συνάρτησης θα προσδιορισθεί ο αριθμός μετατροπής (turnover number) (σε αριθμό καταλυτικών κύκλων ανά  $\text{sec}$ ) [Δίδεται,  $\text{MB}$  ενζύμου 140000].



## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ

### Πειραματικό μέρος Α

Χρόνος επώασης (min)	A <sub>405 nm</sub>
1	
2	
5	
10	
20	
20, control (χωρίς ένζυμο)	

### Πειραματικό μέρος Β

Όγκος ενζύμου (ml)	Συγκ. ενζύμου (ng/ml)	A <sub>405 nm</sub>
0		
0.01		
0.02		
0.04		
0.08		
0.12		
0.15		
0.20		
0.25		

### Πειραματικό μέρος Α-Γ (ενζυμική ενεργότητα)

Χρόνος (min)	A <sub>405 nm</sub>	Προϊόν (μmol/ml)	Προϊόν (μmol/min) (U)
1			
2			
5			
10			
20			



## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ (συνέχεια)

Πειραματικό μέρος Β-Γ (ειδική ενζυμική ενεργότητα)

Ενζυμο (ng)	$A_{405\text{ nm}}$	Προϊόν ( $\mu\text{mol/ml}$ )	Προϊόν ( $\mu\text{mol/min}$ ) (U)
-			
-			
-			
-			
-			
-			
-			
-			
-			

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Πειραματικό μέρος Α: Διάγραμμα προόδου της ενζυμικής αντίδρασης ( $A_{405\text{ nm}}$  έναντι χρόνου)

Πειραματικό μέρος Β: Διάγραμμα εξάρτησης της ταχύτητας αντίδρασης από τη συγκέντρωση ενζύμου ( $A_{405\text{ nm}}$  έναντι συγκ. ενζύμου)

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Πειραματικό μέρος Γ:

Ενζυμική ενεργότητα (σε U/ml ενζυμικού παρασκευάσματος)

Ειδική ενζυμική ενεργότητα (σε U/mg αλκαλικής φωσφατάσης)

Αριθμός μετατροπής του ενζύμου (σε αριθμό κύκλων ανά sec)



## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΠΕΔΩΣΗΣ

Πειραματικό μέρος Α:

1. Ποιος είναι ο ρόλος του NaOH στο πρωτόκολλο της δοκιμασίας αντίδρασης αλκαλικής φωσφατάσης;
2. Γιατί απαιτείται να εξετασθεί η καμπύλη προόδου της ενζυμικής αντίδρασης (μέρος Α) πριν από την εξέταση της επίδρασης της συγκέντρωσης ενζύμου (μέρος Β);
3. Με βάση τα δεδομένα σας, τι θα συνέβαινε αν το διάλυμα του ενζύμου είχε χρησιμοποιηθεί σε μικρότερη αραιώση (π.χ. 1:1000, v/v);

Πειραματικό μέρος Β-Γ:

4. Πού μπορεί να οφείλεται η πιθανή διαφορά μεταξύ της αναγραφόμενης τιμής ειδικής ενεργότητας που δίδει ο εμπορικός οίκος Sigma και της τιμής ειδικής ενεργότητας που προσδιορίσατε;
5. Είναι δυνατόν ο αριθμός μετατροπής (turnover number) της αλκαλικής φωσφατάσης να λάβει άλλη τιμή από αυτήν που προσδιορίσατε αν τροποποιηθούν οι συνθήκες αντίδρασης; Πώς θα μπορούσε να επηρεάζεται η τιμή αυτή (α) από το pH, (β) από τη θερμοκρασία;



# ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

## ΑΣΚΗΣΗ 3

### Ενζυμική Κινητική -2

1. Καμπύλη κορεσμού υποστρώματος
2. Μετασχηματισμοί της εξίσωσης Michaelis-Menten
3. Υπολογισμοί των σταθερών  $K_m$ ,  $V_{max}$
4. Συναγωνιστική και μη συναγωνιστική αναστολή

Όνοματεπώνυμο φοιτητή

Υπογραφή επιβλέποντα



## Ενζυμική Κινητική - 2

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Η Άσκηση 3 αποτελεί εργαστηριακή συνέχεια της Άσκησης 2. Στην Άσκηση 2, εξετάστηκε η αρχική ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης σε συνθήκες όπου η συγκέντρωση υποστρώματος είναι πολύ υψηλή και δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την πορεία της αντίδρασης (συνθήκες κορεσμού υποστρώματος). Στην Άσκηση 3, θα εξετασθεί ακριβώς η επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος επί της αρχικής ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (Εισαγωγή, Α). Επίσης θα εξετασθεί η επίδραση της L-φαινυλαανίνης, δηλ. ενός ειδικού αναστολέα της αντίδρασης αλκαλικής φωσφατάσης, και θα προσδιορισθεί με βάση τα δεδομένα το είδος της αναστολής (βλ. κατωτέρω, Εισαγωγή Γ).

#### Α. Κινητική κορεσμού υποστρώματος (Michaelis-Menten)

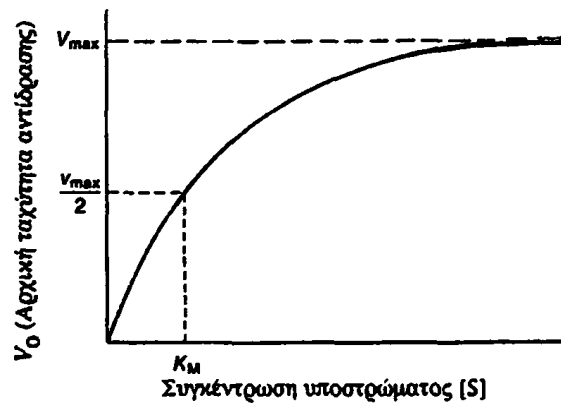
Εφόσον οι λοιπές συνθήκες διατηρούνται σταθερές (συγκέντρωση ενζύμου, ιοντική ισχύς, θερμοκρασία, pH, συγκεντρώσεις αναστολέων κλπ.), η αρχική ταχύτητα ( $v_0$ ) της ενζυμικής αντίδρασης αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης υποστρώματος (S), προσεγγίζοντας ασυμπτωματικά μία μέγιστη τιμή ( $V_{max}$ ). Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, για τις οποίες η  $v_0$  προσεγγίζει την τιμή  $V_{max}$ , δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση της ταχύτητας με περαιτέρω προσθήκη υποστρώματος (συνθήκες κορεσμού). Η θεωρητική ανάλυση της συνάρτησης μεταξύ  $v_0$  και [S] (Εικόνα 3.1) στηρίζεται στην πλέον απλοποιημένη μορφή της ενζυμικής χημικής εξίσωσης (με ένα μόνο ενζυμικό υπόστρωμα), δηλ. την



[S, υπόστρωμα, E, ένζυμο (ελεύθερο υποστρώματος), ES, σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, P, προϊόν]. Επιπρόσθετα, εφαρμόζονται δύο προϋποθέσεις: (α) ότι το ένζυμο ευρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση σε σχέση με το υπόστρωμα ("καταλυτική" συγκέντρωση), δηλ. η συγκέντρωση υποστρώματος (S) παραμένει πρακτικά αμετάβλητη, και (β) ότι η



συγκέντρωση προϊόντος (P) είναι πρακτικά μηδενική, δηλ. η ταχύτητα ανασχηματισμού του συμπλόκου EP από E και P είναι αμελητέα ( $k_4 = 0$ ). Η αρχική ανάλυση της μαθηματικής συνάρτησης έγινε από τους Michaelis και Menten (*rapid equilibrium approach*, 1913) και, στη συνέχεια, η ανάλυση ολοκληρώθηκε από τους Briggs και Haldane (*steady-state approach*, 1925).



**Εικόνα 3.1.** Καμπύλη κορεσμού υποστρώματος κατά Michaelis και Menten [από Clark and Switzer, Πειραματική Βιοχημεία, Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992]

Η μαθηματική ανάλυση εκκινά από τις συναρτήσεις

$$k_1 [E] [S] = k_2 [ES] + k_3 [ES]$$

$$v_0 = k_3 [ES]$$

$$V_{max} = k_3 ( [E] + [ES] ),$$

και καταλήγει στην εξίσωση:

$$v_0 = V_{max} [S] / ( K_m + [S] )$$

[που είναι γνωστή ως εξίσωση Michaelis-Menten]

[όπου [S], συγκέντρωση υποστρώματος,  $v_0$ , αρχική ταχύτητα,  $V_{max}$ , μέγιστη αρχική ταχύτητα,  $K_m$ , σταθερά Michaelis-Menten, ισχύει  $K_m = (k_2 + k_3) / k_1$ ]

Σύμφωνα με την ανωτέρω εξίσωση, η σταθερά  $K_m$  ισούται με την συγκέντρωση υποστρώματος για την οποία η αρχική ταχύτητα λαμβάνει τιμή ίση με το ήμισυ της μέγιστης ( $V_{max} / 2$ ).

Η τυπική συνάρτηση Michaelis-Menten δίδεται διαγραμματικά στην Εικόνα 3.1 (καμπύλη κορεσμού υποστρώματος).





## **B. Γραμμικοί μετασχηματισμοί της εξίσωσης Michaelis-Menten**

Κατά την κινητική μελέτη ενός ενζύμου είναι ιδιαίτερα χρήσιμο να προσδιορίζεται η σταθερά  $K_m$  για τους εξής λόγους: (α) η τιμή της  $K_m$  υποδεικνύει και την περιοχή φυσιολογικών (ενδοκυτταρικών) συγκεντρώσεων του υπό μελέτη ενζυμικού υποστρώματος [σύμφωνα με το σχήμα της καμπύλης κορεσμού (Εικόνα 3.1), συγκεντρώσεις υποστρώματος που είναι είτε πολύ μεγαλύτερες είτε πολύ μικρότερες της  $K_m$  θα οδηγούσαν σε αντιοικονομική κατανάλωση ενζύμου, δηλ. άστοχη απώλεια καταλυτικής ισχύος για το κύτταρο], (β) η τιμή της  $K_m$  είναι χαρακτηριστική του κάθε ενζύμου (υπό δεδομένες συνθήκες αντίδρασης) και αποτελεί μέτρο σύγκρισης μεταξύ ενζύμων από διαφορετικές βιολογικές πηγές, (γ) για δεδομένο υπόστρωμα η τιμή της  $K_m$  του ενζύμου παραμένει σταθερή και δίδει ένα μέτρο της σχετικής "συγγένειας" (affinity) του υποστρώματος αυτού προς το ένζυμο [μεγαλύτερη  $K_m$  αντιστοιχεί σε μικρότερη συγγένεια υποστρώματος], (δ) συστήματα ρύθμισης της ενζυμικής ενεργότητας από άλλα μόρια, όπως αναστολείς ή ενεργοποιητές του ενζύμου, είναι δυνατόν να ανιχνευθούν από μία μεταβολή της τιμής  $K_m$  (δηλ. της σχετικής συγγένειας του υποστρώματος προς το ένζυμο) (βλ. και Εισαγωγή Γ).

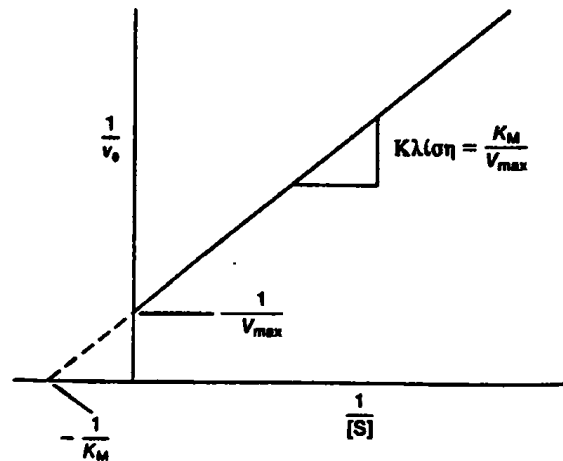
Ο προσδιορισμός της μέγιστης αρχικής ταχύτητας ( $V_{max}$ ) είναι επίσης χρήσιμος διότι δίδει το μέτρο της ολικής συγκέντρωσης ενζύμου που χρησιμοποιείται ( $[E] + [ES]$ ) ή, εναλλακτικά, την τιμή του αριθμού μετατροπής του ενζύμου ( $k_3$ ) (βλ. Εισαγωγή Α, ανωτέρω).

Οι τιμές  $K_m$  και  $V_{max}$  είναι δυνατόν να προσδιορισθούν γραφικά από τις πειραματικές μετρήσεις συγκεντρώσεων υποστρώματος ( $S$ ) και αντίστοιχων τιμών αρχικής ταχύτητας ( $v_0$ ). Για τον γραφικό αυτό προσδιορισμό, όμως, δεν αρκεί το διάγραμμα καμπύλης κορεσμού, αλλά απαιτούνται εναλλακτικές γραφικές παραστάσεις των δεδομένων που να στηρίζονται σε **γραμμικούς μετασχηματισμούς** της εξίσωσης Michaelis-Menten. Η κλασικότερη και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος γραμμικού μετασχηματισμού είναι αυτή των Lineweaver και Burk (1934), που οδηγεί στην γραμμική συνάρτηση του "διπλού αντιστρόφου" (μεταξύ  $1/[S]$  και  $1/v_0$ ), δηλ.



$$1/v_o = (K_m / V_{max}) (1/[S]) + 1 / V_{max}$$

Από το διάγραμμα του "διπλού αντιστρόφου" (Εικόνα 3.2) προσδιορίζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια οι τιμές  $K_m$  και  $V_{max}$ .



**Εικόνα 3.2.** Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου κατά Lineweaver και Burk [από Clark and Switzer, Πειραματική Βιοχημεία, Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992]

Ομοίως, μεγαλύτερη ακρίβεια προσδιορισμού των τιμών  $K_m$  και  $V_{max}$  δίδουν και άλλοι γραμμικοί μετασχηματισμοί της εξίσωσης Michaelis-Menten, όπως

$$v_o = V_{max} - K_m (v_o/[S]) \quad (\text{Eadie-Hofstee})$$

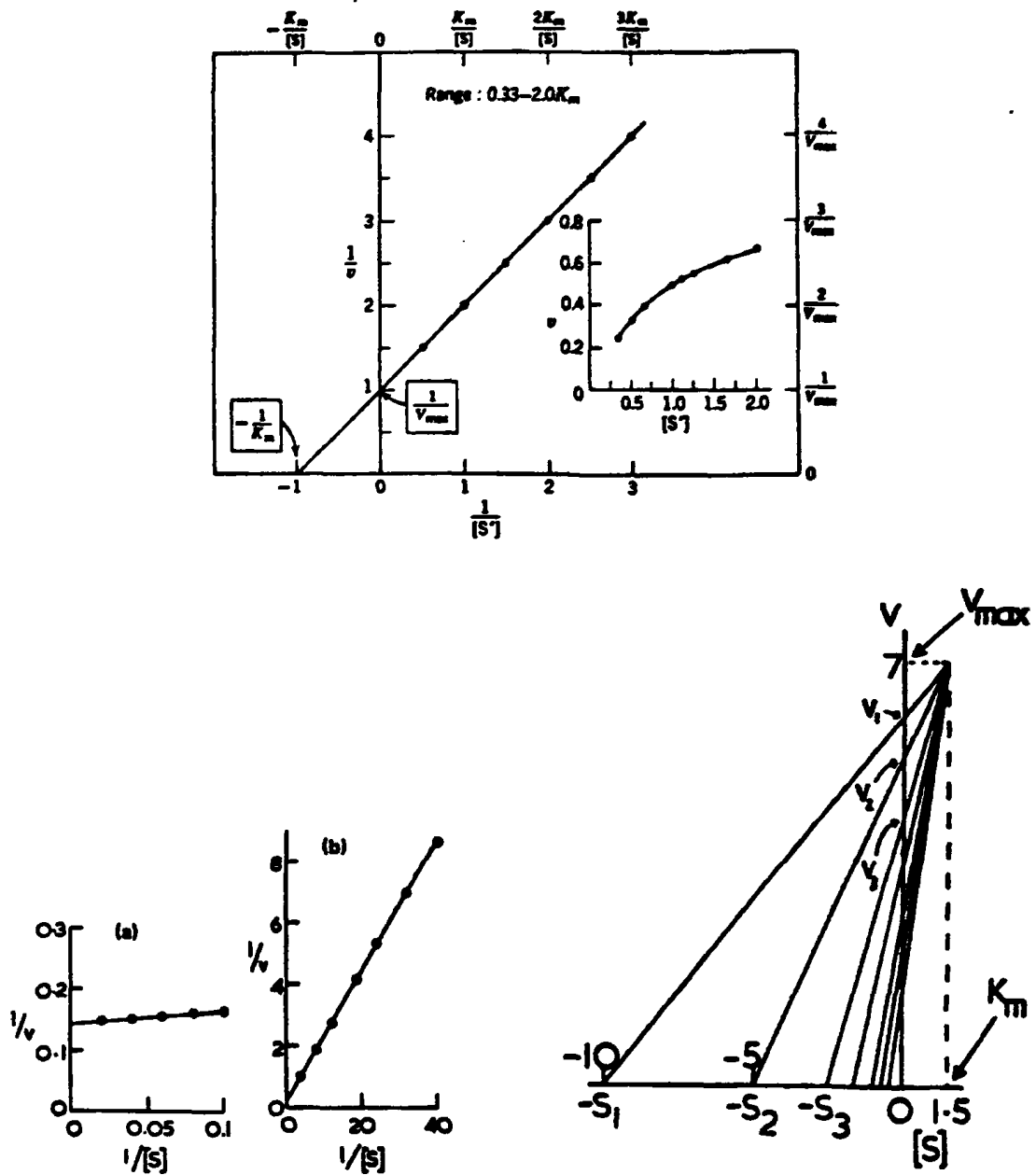
$$v_o/[S] = - (1/K_m) v_o + (V_{max}/K_m) \quad (\text{Eadie-Scatchard})$$

Εκτός των ανωτέρω, μία πρακτική μέθοδος άμεσου γραφικού προσδιορισμού των τιμών  $K_m$  και  $V_{max}$  είναι αυτή των Eisenthal και Cornish-Bowden (1974), η οποία αποφεύγει σε μεγάλο βαθμό τυχαία πειραματικά σφάλματα (Εικόνα 3.3). Ο μετασχηματισμός Cornish-Bowden, στον οποίο στηρίζεται η άμεση γραφική μέθοδος, είναι ο εξής:

$$(V_{max}/v_o) - (K_m/[S]) = 1$$

[Για κάθε ζεύγος πειραματικών τιμών  $[S]$  και  $v_o$ , η συνάρτηση μεταξύ των πιθανών τιμών  $K_m$  και των αντίστοιχων πιθανών τιμών  $V_{max}$  θα είναι γραμμική και, μάλιστα, θα ορίζεται από τα σημεία  $(-[S], 0)$  και  $(0, v_o)$ . Αν σχεδιασθεί το σμήνος των ευθειών αυτών για όλα τα ζεύγη τιμών  $[S]$  και  $v_o$  επί ενός

διαγράμματος, οι ευθείες θα πρέπει να συγκλίνουν προς ένα τελικό σημείο με συντεταγμένες τις πραγματικές ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) (Εικόνα 3.3)].



Εικόνα 3.3. (α) Εφαρμόσιμη περιοχή μετρήσεων, (β) πιθανά προβλήματα μέτρησης από το διάγραμμα του διπλού αντιστρόφου. (γ) Αμεση γραφική μέθοδος κατά Cornish-Bowden [από Segel, *Biochemical Calculations*, Wiley & Sons, New York, 1976, Engel, *Enzyme Kinetics*, Chapman & Hall, London, 1981]

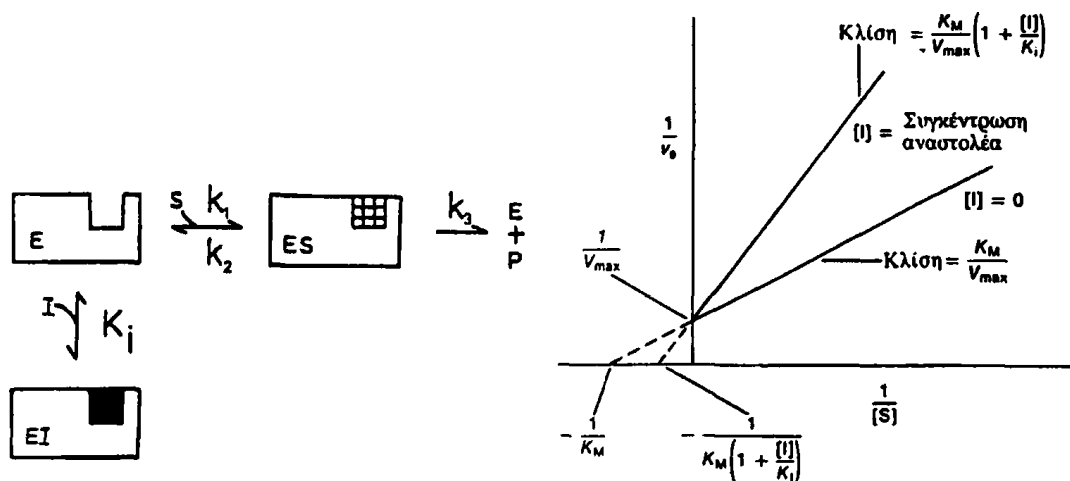
### Γ. Ενζυμικοί αναστολείς

Το σύστημα κινητικής ανάλυσης των σταθερών  $K_m$  και  $V_{max}$  που αναπτύχθηκε ανωτέρω δίδει επίσης την δυνατότητα να προσδιορισθεί η επίδραση και άλλων μορίων, εκτός του υποστρώματος, που συνδέονται με το ένζυμο κατά



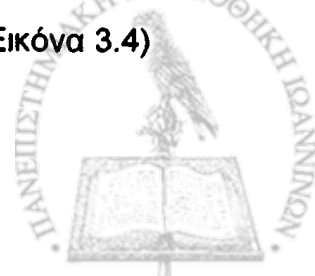
την κατάλυση (ligands), π.χ. ενεργοποιητών (activators) ή αναστολέων (inhibitors). Στην Άσκηση 3 θα εξετασθεί η επίδραση της L-φαινυλαλανίνης, η οποία είναι αναστολέας της αντίδρασης αλκαλικής φωσφατάσης. Οι πιθανότερες περιπτώσεις (κινητικής) αναστολής της ενζυμικής αντίδρασης εμπίπτουν στις εξής δύο κατηγορίες:

(α) Συναγωνιστική (ανταγωνιστική) αναστολή (competitive inhibition) (Εικόνα 3.4)

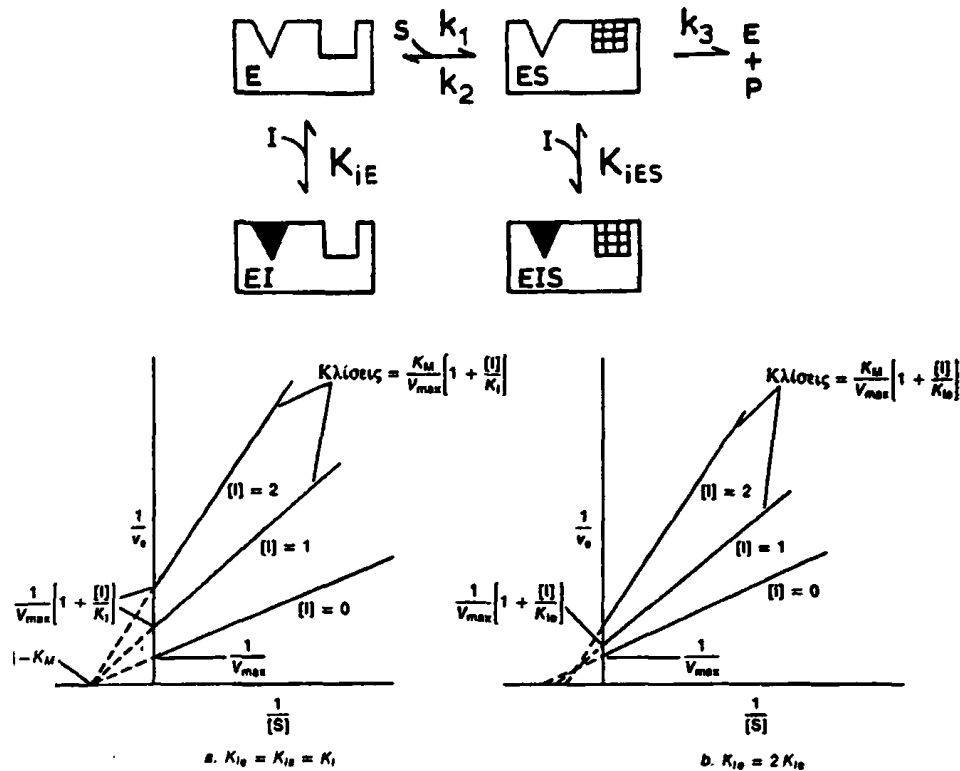


Εικόνα 3.4. Αρχή συναγωνιστικής αναστολής [από Engel, Enzyme Kinetics, Chapman & Hall, London, 1981, Clark and Switzer, Πειραματική Βιοχημεία, Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992]

Ο αναστολέας (I) και το υπόστρωμα (S) ανταγωνίζονται για κατάληψη της ίδιας θέσης δέσμευσης πάνω στο μόριο του ενζύμου (ενεργό κέντρο). Επομένως, το μόριο του αναστολέα μπορεί να δεσμευθεί μόνο από το ελεύθερο μόριο ενζύμου (E) και όχι από το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES) όπου έχει ήδη καταληφθεί το ενεργό κέντρο. Ο συναγωνιστικός (ανταγωνιστικός) αναστολέας προκαλεί αύξηση της  $K_m$  (δηλ. μείωση της "συγγένειας" δέσμευσης του υποστρώματος προς το ένζυμο) εφόσον αποκλείει το υπόστρωμα από τις θέσεις (ενεργού κέντρου) τις οποίες καταλαμβάνει. Συγχρόνως, όμως, δεν επηρεάζει την  $V_{max}$  (μέγιστη αρχική ταχύτητα που προσεγγίζεται σε συνθήκες κορεσμού υποστρώματος) εφόσον μεγάλη περίσσεια μορίων υποστρώματος είναι δυνατόν να αποκλείσουν, με τη σειρά τους, τα μόρια του αναστολέα από τις θέσεις ενεργού κέντρου. Στην κινητική ανάλυση, προστίθεται η κινητική σταθερά  $K_i$  (σταθερά αναστολής) και η σταθερά Michaelis-Menten ( $K_m$ ) πολλαπλασιάζεται επί  $1 + ([I]/K_i)$  (Εικόνα 3.4)



(β) Μη συναγωνιστική (μη ανταγωνιστική) αναστολή (non-competitive inhibition) (Εικόνα 3.5)



Εικόνα 3.5. (α) Αρχή και (β) ειδικές περιπτώσεις μη συναγωνιστικής αναστολής [από Engel, Enzyme Kinetics, Chapman & Hall, London, 1981, Clark and Switzer, Πειραματική Βιοχημεία, Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992]

Ο αναστολέας δεσμεύεται σε διαφορετική θέση δέσμευσης από αυτήν του ενεργού κέντρου και, επομένως, είναι δυνατόν να δεσμευθεί όχι μόνον από το ελεύθερο μόριο ενζύμου (E) αλλά και από το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES). Ο μη συναγωνιστικός (μη ανταγωνιστικός) αναστολέας προκαλεί πάντοτε **μείωση της V<sub>max</sub>** εφόσον οι ενζυμικές θέσεις που καταλαμβάνονται από μόρια του αναστολέα δεν είναι δυνατόν να αποκλεισθούν με περίσσεια μορίων υποστρώματος. Στην κινητική ανάλυση, προστίθενται δύο σταθερές αναστολής,  $K_{iE}$  και  $K_{iES}$  (Εικόνα 3.5), και η  $V_{max}$  υποπολλαπλασιάζεται κατά τον παράγοντα  $1 + ([I]/K_{iES})$ , ενώ η  $K_m$  πολλαπλασιάζεται επί  $[1 + ([I]/K_{iE})] / [1 + ([I]/K_{iES})]$ . Συνεπώς, η  $K_m$  είναι **δυνατόν να αυξάνεται** (όταν  $K_{iE} < K_{iES}$ ) **να μειώνεται** (όταν  $K_{iE} > K_{iES}$ ) ή **να παραμένει σταθερή** (όταν  $K_{iE} = K_{iES}$ ), ανάλογα με τη σχετική συγγένεια



δέσμευσης του αναστολέα προς τα μόρια E και ES (Εικόνα 3.5). Η περίπτωση κατά την οποία  $K_{iE} = K_{iES}$  είναι επίσης γνωστή ως καθαρά μη συναγωνιστική αναστολή (pure non-competitive), ενώ οι υπόλοιπες περιπτώσεις αναφέρονται συχνά και ως αναστολή μικτού τύπου (mixed type inhibition).

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A. Καμπύλη κορεσμού υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης

Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο

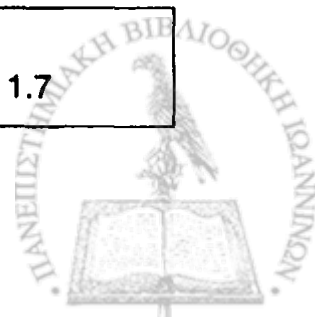
	(όγκοι σε ml)								
ρυθμιστικό	2.6	2.66	2.62	2.6	2.55	2.5	2.3	2.1	1.9
υπόστρ/μα	0.1	0.04	0.08	0.1	0.15	0.2	0.4	0.6	0.8
ddH <sub>2</sub> O	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0
EC 3.1.3.1	0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
επώαση, θερμοκρασία δωματίου									
Η χρονική διάρκεια επώασης θα επιλεγεί από τα δεδομένα της Άσκησης 2Α									
NaOH, 1 N	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
A <sub>405 nm</sub>									

Υπόστρωμα = φωσφορική π-νιτροφαινόλη (PNPP), 0.03 M, Ρυθμιστικό = ρυθμιστικό διάλυμα διαιθανολαμίνης, 1 M, MgCl<sub>2</sub>, 1 mM, pH 9.6, EC 3.1.3.1 = Διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης (4.8 mg/ml), αραιωθέν 1:40000 (v/v), σε ρυθμιστικό διάλυμα διαιθανολαμίνης, 1 M, MgCl<sub>2</sub>, 1 mM, pH 9.6

### B. Επίδραση αναστολέα (L-φαινυλαλανίνη) στην καμπύλη κορεσμού υποστρώματος

Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο

	(όγκοι σε ml)								
ρυθμιστικό	2.4	2.46	2.42	2.4	2.35	2.3	2.1	1.9	1.7



υπόστρ/μα	0.1	0.04	0.08	0.1	0.15	0.2	0.4	0.6	0.8
ddH <sub>2</sub> O	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Phe	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
EC 3.1.3.1	0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
<b>επώαση, θερμοκρασία δωματίου</b>									
<i>Η χρονική διάρκεια επώασης θα επιλεγεί από τα δεδομένα της Ασκήσης 2Α</i>									
NaOH, 1 N	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
A <sub>405 nm</sub>									

Υπόστρωμα = φωσφορική π-νιτροφαινόλη (PNPP), 0.03 M, L-Phe = L-φαινυλαλανίνη, 0.3 M, Ρυθμιστικό = ρυθμιστικό διάλυμα διαιθανολαμίνης, 1 M, MgCl<sub>2</sub>, 1 mM, pH 9.6, EC 3.1.3.1 = Διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης (4.8 mg/ml), αραιωθέν 1:40000 (v/v), σε ρυθμιστικό διάλυμα διαιθανολαμίνης, 1 M, MgCl<sub>2</sub>, 1 mM, pH 9.6

### Γ. Γραφικές παραστάσεις

Από τα δεδομένα θα υπολογισθούν καταρχήν οι τιμές μmoles παραγόμενου προϊόντος (PNP) ανά min (δηλ. τιμές αρχικής ταχύτητας), με βάση τις τιμές A<sub>405 nm</sub> και τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης του π-νιτροφαινοξειδίου (Άσκηση 2, Εισαγωγή Α). Για τον προσδιορισμό των τιμών αυτών θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ο τύπος Lambert-Beer (Άσκηση 1, Εισαγωγή Β1). Στη συνέχεια, από τους πίνακες τιμών [S] (σε M) και v<sub>o</sub> (σε μmol/min), απουσία και παρουσία αναστολέα, μπορούν να κατασκευασθούν τα εξής διαγράμματα:

#### Γ1. Καμπύλη κορεσμού (Michaelis-Menten)

Γραφική παράσταση της v<sub>o</sub> συναρτήσει της [S]

#### Γ2. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (Lineweaver-Burk)

Γραφική παράσταση της 1/v<sub>o</sub> συναρτήσει της 1/[S]

#### Γ3. Άμεση γραφική μέθοδος (Eisenthal και Cornish-Bowden)

Σμήνη ευθειών που ορίζονται από τα σημεία (-[S], 0) και (0, v<sub>o</sub>) κάθε μέτρησης



Στα πλαίσια της Ασκήσης 3, θα ζητηθούν από τους φοιτητές μόνο τα διαγράμματα Γ3 (σμήνη ευθειών των πειραματικών σημείων, απουσία και παρουσία αναστολέα).

#### **Δ. Προσδιορισμοί $K_m$ και $V_{max}$**

Από τις συντεταγμένες του σημείου τομής των ευθειών της γραφικής παράστασης Γ3 (απουσία αναστολέα) θα προσδιορισθούν οι τιμές  $K_m$  (σε M) και  $V_{max}$  (σε  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) (πρβλ. Εικόνα 3.3).

Ομοίως, από τις συντεταγμένες του σημείου τομής των ευθειών της γραφικής παράστασης Γ3 (παρουσία αναστολέα) θα προσδιορισθούν οι τιμές  $K_m$  (σε M) και  $V_{max}$  (σε  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ), παρουσία αναστολέα.

#### **Ε. Είδος αναστολής**

Το είδος της αναστολής που δίδει η L-Phe (συναγωνιστική, καθαρά μη συναγωνιστική, ή μη συναγωνιστική μικτού τύπου) θα κριθεί με βάση τις τιμές που προέκυψαν (Πειραματικό μέρος Δ) και τα θεωρητικά αναμενόμενα (Εισαγωγή Γ).





## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ

### Πειραματικό μέρος Α (απουσία αναστολέα)

Υπόστρωμα (ml)    [S] (M)     $A_{405 \text{ nm}}$

0.04

0.08

0.1

0.15

0.2

0.4

0.6

0.8

### Πειραματικό μέρος Β (παρουσία αναστολέα)

Υπόστρωμα (ml)    [S] (M)     $A_{405 \text{ nm}}$

0.04

0.08

0.1

0.15

0.2

0.4

0.6

0.8

### Πειραματικό μέρος Α-Γ3 (απουσία αναστολέα)

[S] (M)     $A_{405 \text{ nm}}$     Προϊόν ( $\mu\text{mol/ml}$ )     $v_0$  ( $\mu\text{mol/min}$ )

-

-

-

-

-

-

-

-



## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ (συνέχεια)

Πειραματικό μέρος Β-Γ3 (παρουσία αναστολέα)

[S] (M)       $A_{405 \text{ nm}}$       Προϊόν ( $\mu\text{mol/ml}$ )       $v_o$  ( $\mu\text{mol/min}$ )

-  
-  
-  
-  
-  
-  
-  
-

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Πειραματικό μέρος Α-Γ3-Δ:

Σμήνος ευθειών που ορίζονται από τα σημεία  $(-[S], 0)$  και  $(0, v_o)$  κάθε μέτρησης (απουσία αναστολέα)

Πειραματικό μέρος Α-Γ3-Δ:

Σμήνος ευθειών που ορίζονται από τα σημεία  $(-[S], 0)$  και  $(0, v_o)$  κάθε μέτρησης (παρουσία αναστολέα)

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Πειραματικό μέρος Α-Γ3-Δ-Ε:

Απουσία αναστολέα

Παρουσία αναστολέα

$K_m$  (σε M),

$V_{\text{max}}$  (σε  $\mu\text{mol/min}$ ),



## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΠΕΔΩΣΗΣ

Πειραματικό μέρος Α:

1. Ποια χρησιμότητα έχει ο προσδιορισμός της τιμής  $K_m$  και τι μπορεί να υποδείξει η τιμή αυτή για τη φυσιολογική λειτουργία ενός ενζύμου;
2. Πώς επιλέγεται η χρονική διάρκεια επώασης για τα πειράματα που εξετάζονται στην Άσκηση 3; Γιατί οι τιμές ενζυμικής ενεργότητας, στην περίπτωση αυτή, αναφέρονται ως αρχική ταχύτητα αντίδρασης ( $v_0$ );
3. Τι θα συνέβαινε αν το διάλυμα του ενζύμου είχε χρησιμοποιηθεί σε μικρότερη αραίωση (π.χ. 1:1000, v/v); Θα προέκυπτε μεταβολή στην τιμή  $K_m$  και/ή στην τιμή  $V_{max}$ , και γιατί;

Πειραματικό μέρος Β:

4. Με βάση τους υπολογισμούς  $K_m$  και  $V_{max}$  που προκύπτουν από τα δεδομένα σας (Πειραματικό μέρος Ε), ποιά είναι το είδος αναστολής που δίδει η L-φαινυλαλανίνη για την αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης;
5. Τι θα συνέβαινε αν είχαμε χρησιμοποιήσει την L-φαινυλαλανίνη σε μικρότερη συγκέντρωση (π.χ. από αρχικό διάλυμα 0.1 M αντί του διαλύματος 0.3 M που χρησιμοποιήθηκε); Θα ήταν διαφορετικές οι τιμές  $K_m$  (παρουσία αναστολέα) και/ή  $V_{max}$  (παρουσία αναστολέα);



## **Φωσφολιπίδια κυτταρικών μεμβρανών**

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ**

Εκτός από τον ρόλο τους στην οριοθέτηση του ενδοκυτταρικού χώρου και διαμερισματοποίηση των κυτταρικών λειτουργιών, οι κυτταρικές μεμβράνες διαθέτουν ένα δυναμικό πρωτεϊνικό μηχανοστάσιο για τη διαμεμβρανική μεταφορά μορίων, για σημαντικές μεταβολικές δραστηριότητες (π.χ. αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων) και για αντιδράσεις μοριακής αναγνώρισης (κυττάρου-κυττάρου, οργανιδίου-κυττάρου, ορμόνης-κυττάρου, αντιγόνου-αντισώματος, νευροδιαβιβαστών-υποδοχέων, κλπ.). Ως ένα παράδειγμα ιδιαίτερης σημασίας για τον συντονισμό των κυτταρικών λειτουργιών στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να αναφερθεί η αναγνώριση *εξωκυτταρικών σηματοδοτικών μορίων* από ειδικές μεμβρανικές πρωτεΐνες (υποδοχείς): η αναγνώριση αυτή οδηγεί σε ειδικές αποκρίσεις των κυττάρων-στόχων μέσω μηχανισμών μεταγωγής σήματος (**signal transduction**). Συνολικά, είναι γνωστοί 5 μηχανισμοί μεταγωγής σήματος, εκ των οποίων οι 4 χρησιμοποιούν μεμβρανικούς υποδοχείς [διόδια ιόντων (gated ion channels) όπως είναι ο υποδοχέας ακετυλχολίνης των νευρομυϊκών συνάψεων, υποδοχείς με ενζυμική ενεργότητα που επάγεται από τη σύνδεση του σηματοδοτικού μορίου (receptor enzymes) όπως είναι ο υποδοχέας της ινσουλίνης, υποδοχείς που συνδέονται με ενεργοποίηση τυροσινο-κινάσων (tyrosine kinase - linked receptors) όπως είναι οι υποδοχείς της ιντερφερόνης και της αυξητικής ορμόνης, υποδοχείς που συνδέονται με πρωτεΐνες δέσμευσης GTP (G-protein coupled receptors) όπως οι υποδοχείς της επινεφρίνης και της γλυκαγόνης]. Στον 5<sup>ο</sup> μηχανισμό, χρησιμοποιούνται ενδοκυτταρικοί υποδοχείς [πυρηνικοί υποδοχείς (nuclear receptors)] που αναγνωρίζουν ως σήματα υδρόφοβες ορμόνες.

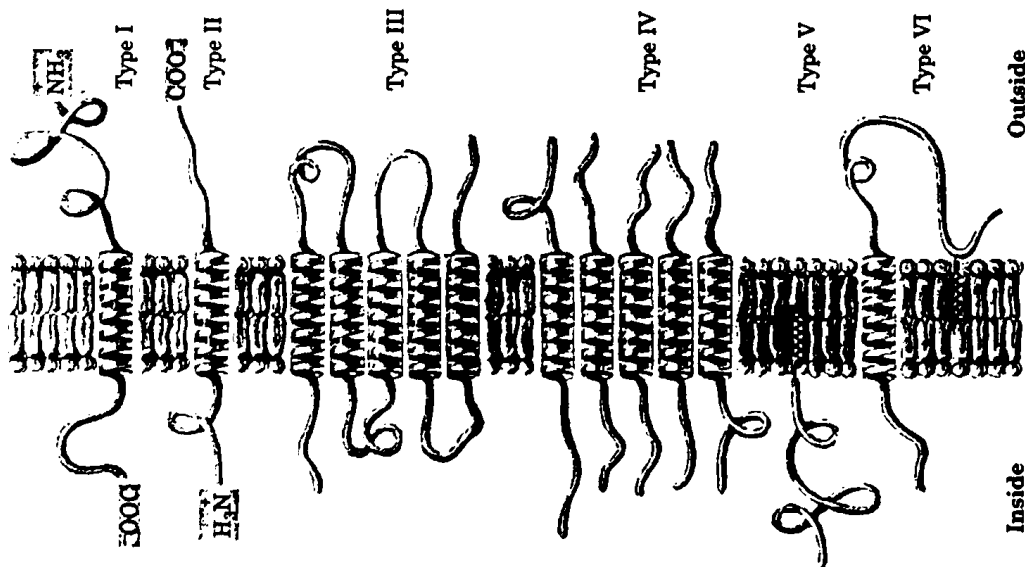
Κεντρικό ρόλο στη δομή και λειτουργία των μεμβρανικών πρωτεϊνών έχει το υδρόφοβο περιβάλλον της διπλοστιβάδας φωσφολιπιδίων. Εκτός από βασικό δομικό συστατικό της μεμβράνης, τα **φωσφολιπίδια** μπορεί να συμμετέχουν (α) σε καθοριστικής σημασίας αλληλεπιδράσεις με πλευρικές ομάδες αμινοξέων σε μηχανισμούς όπως διαμεμβρανικής μεταφοράς



μικρομορίων-ιόντων, (β) σε μηχανισμούς μεταγωγής σήματος (φωσφατιδυλο-  
ινοσιτόλες).

### A. Μεμβρανικές πρωτεΐνες

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες διακρίνονται σε *ενσωματωμένες* ή *ενδομεμβρανικές* (integral, intrinsic) και *περιφερικές* ή *εξωμεμβρανικές* (peripheral, extrinsic). Εντονα υδρόφοβο χαρακτήρα εμφανίζουν οι *ενσωματωμένες* μεμβρανικές πρωτεΐνες, των οποίων ένα ή περισσότερα τμήματα *εισχωρούν* εντός της μεμβράνης και οι οποίες συγκρατούνται εντός της μεμβράνης με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Αντίθετα, οι περιφερικές πρωτεΐνες δεν εισχωρούν στο υδρόφοβο περιβάλλον της μεμβράνης αλλά αλληλεπιδρούν *έμμεσα*, είτε με τα υδρόφιλα τμήματα των ενδομεμβρανικών πρωτεϊνών είτε με τις υδρόφιλες κεφαλές των φωσφολιπιδίων (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1. Δομικοί τύποι ενσωματωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών [από Nelson and Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, Academic Press, New York, 2000]

Οι ενδομεμβρανικές πρωτεΐνες έχουν πολύ σημαντικούς ρόλους στην επικοινωνία κυτάρου-κυτάρου, στον συντονισμό κυτταρικών λειτουργιών ενός πολυκύτταρου οργανισμού και στη δυναμική προσαρμογή των κυττάρων στις μεταβαλλόμενες συνθήκες περιβάλλοντος. Περιλαμβάνουν μεμβρανικούς υποδοχείς και διόδους ιόντων (μηχανισμοί μεταγωγής σήματος), μεταφορείς ιόντων (ρύθμιση ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $HCO_3^-$ ,  $I^-$ ,  $Cl^-$ ), μεταφορείς μικρομορίων (ρύθμιση μεταβολισμού), οξειδοαναγωγικά



ένζυμα (αναπνευστική αλυσίδα), ATP-συνθάση (οξειδωτική φωσφορυλίωση), αλλά και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (cell adhesion molecules, CAMs) στα οποία συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων και οι ανοσοσφαιρίνες (Ig). Μια ενδομεμβρανική πρωτεΐνη είναι δυνατόν να διατρέχει (span) τη διπλοστοιβάδα μία ή περισσότερες φορές ή να είναι απλώς "αγκυροβολημένη" στη μεμβράνη μέσω ομοιοπολικά συνδεδεμένων λιπιδίων. Για την απελευθέρωση της από τη μεμβράνη απαιτείται επώαση με κατάλληλα διαλύματα απορρυπαντικών (βλ. κατωτέρω). Αντίθετα, μία περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη συνδέεται μόνο με την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης και μπορεί να απελευθερωθεί από αυτήν με σχετικά ήπιους πειραματικούς χειρισμούς, όπως επώαση με διαλύματα αλάτων.

Από την εξελισσόμενη καταγραφή και ανάλυση αλληλουχίας πολλών γονιδιωμάτων, διαφαίνεται ότι οι μεμβρανικές πρωτεΐνες (κατά μεγαλύτερο μέρος, πρωτεΐνες μεταφοράς μικρομορίων-ιόντων) αποτελούν σημαντικό ποσοστό του ολικού αριθμού γονιδιακών προϊόντων. Για τις μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς (**transport proteins**) έχει ήδη καθιερωθεί ένα διεθνές σύστημα φυλογενετικής-λειτουργικής ταξινόμησης και ονοματολογίας, ανάλογο με αυτό που ισχύει για τα ένζυμα (Transport Commission, TC system, Νοέμβριος 1999) (<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/>).

Πολλές μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς είναι σημαντικές από κλινική άποψη [π.χ. μία μεμβρανική πρωτεΐνη που λειτουργεί ως διάυλος ιόντων χλωρίου (CFTR) συνδέεται με την ασθένεια της κυστικής ίνωσης (CF), η πρωτεΐνη μεταφοράς νατρίου/ιωδίου του θυρεοειδούς (NIS) συνδέεται με ορισμένες μορφές θυρεοειδίτιδας, μεταφορείς γλυκόζης/νατρίου (SGLT1-2) του εντερικού επιθηλίου συνδέονται με διαταραχές στην απορρόφηση γλυκόζης και γαλακτόζης, πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς τοξικών ουσιών (MDR1-2) συνδέονται με φαινόμενα ανθεκτικότητας έναντι χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (multidrug resistance) κλπ.]. Σε πολλές περιπτώσεις, τα γονίδια και τα αντίστοιχα γονιδιακά προϊόντα έχουν μελετηθεί με μοριακές βιολογικές, βιοχημικές και βιοφυσικές τεχνικές. Ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα στο επίπεδο της αναλυτικής δομής και μηχανισμού λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών (π.χ. για ενδομεμβρανικές πρωτεΐνες έχουν αναφερθεί περί τις 20 μόνον κρυσταλλικές δομές διακριτικής ικανότητας ατόμου, ενώ για διαλυτές πρωτεΐνες έχουν περιγραφεί άνω των



12000 ανάλογων δομών). Αυτό οφείλεται σε τεχνικά προβλήματα προερχόμενα από τον υδρόφοβο χαρακτήρα (hydrophobicity) και τη λειτουργική σημασία της ευελιξίας στερεοδιάταξης (conformational flexibility) των πρωτεϊνών αυτών. Ως συνέπεια, η απομόνωση από το μεμβρανικό περιβάλλον και ανάκτηση των πρωτεϊνικών μορίων σε μορφή λειτουργική και συγχρόνως κατάλληλη για αναλυτικές βιοφυσικές μελέτες εμφανίζει δυσχέρειες. Τα προβλήματα αντιμετωπίζονται εν μέρει με τεχνικές ανασύστασης (reconstitution) των μεμβρανικών πρωτεϊνών είτε σε διαλύματα κατάλληλων απορρυπαντικών είτε σε πρωτεολιποσώματα.

## B. Μεμβρανικό περιβάλλον

Κύρια συστατικά των μεμβρανών είναι τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες (με μικρά ποσά ομοιοπολικά συνδεδεμένων πολυσακχαριτών σε ορισμένα από τα ανωτέρω μόρια). Τα σχετικά ποσά πρωτεϊνών-λιπιδίων καθώς και τα είδη μεμβρανικών λιπιδίων (Εικόνα 4.2) διαφέρουν ανάλογα με το είδος οργανισμού. Συνοπτικά, ενώ κατά μέσο όρο η αναλογία πρωτεϊνών-λιπιδίων είναι 60:40, είναι δυνατόν να κυμανθεί από 20:80 (έλυτρα μυελίνης των νευρώνων των θηλαστικών) έως 75:25 (μεμβράνη Gram-θετικών βακτηρίων).

Λιπιδιακή σύσταση μεμβράνης από διάφορες πηγές

Λιπίδια (σαν επί τοις εκατό των ολικών λιπιδίων)	Ζωικά κύτταρα				Βακτήρια	
	Μυελίνη	Ερυθρο- κύτταρο	Μιτοχόνδρια	Μικροσωμάτια	E.coli	Bacillus megaterium
Χοληστερόλη	25	25	5	6	0	0
Φωσφατίδια	14	20	28	17	100	45
Φωσφατιδυλική αιθανολαμίνη	7	11	0	0	0	0
Φωσφατιδυλική σερίνη	17	23	48	64	0	0
Φωσφατιδυλική χολίνη	0	2	8	11	0	0
Φωσφατιδυλική ινοσιτόλη	0	0	1	2	0	45
Φωσφατιδυλική γλυκερόλη	0	0	11	0	0	0
Καρδιολιπίνη	6	18	0	0	0	0
Σφινγολιπίδια						
Σφινγομυελίνη						
Κεραμίδιο	1	0	0	0	0	0
Εγκεφαλίδιο	25	0	0	0	0	0
Άλλα	11	1	0	0	0	10

Εικόνα 4.2. Διαφορές στη σύνθεση λιπιδίων διαφορετικών κυτταρικών μεμβρανών [από Clark and Switzer, Πειραματική Βιοχημεία, Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992]

Αντίστοιχα, τα λιπίδια των προκαρυωτικών μεμβρανών είναι κυρίως φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια ενώ τα λιπίδια των ευκαρυωτικών μεμβρανών



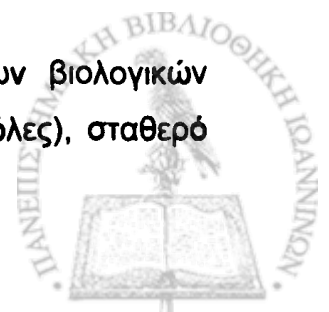
περιλαμβάνουν φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, στερόλες (χοληστερόλη) και σφιγγολιπίδια.

Βασικό δομικό στοιχείο όλων των βιολογικών μεμβρανών αποτελεί η διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων (phospholipid bilayer) εντός της οποίας εντοπίζονται ως "επιπλέουσες νησίδες" πρωτεΐνες και πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα (fluid mosaic model, Singer and Nicolson, 1972). Το υδρόφοβο ενδομεμβρανικό περιβάλλον (πάχους  $> 3.5$  nm) που δημιουργούν οι μη πολικές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων εμποδίζει την ελεύθερη διακίνηση πολικών μορίων, ενώ συγχρόνως σταθεροποιεί τις μη πολικές πλευρικές ομάδες των μεμβρανικών πρωτεϊνών και επιτρέπει σε υδρόφιλες πρωτεϊνικές επιφάνειες να σχηματίζουν ειδικές θέσεις μοριακής αναγνώρισης στην εξωτερική ή εσωτερική πλευρά της μεμβράνης. Η κατανομή των πρωτεϊνών και λιπιδίων κατά μήκος της μεμβράνης δεν είναι ομοιογενής, αλλά εμφανίζει ασυμμετρία, τόσο μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής πλευράς, όσο και από περιοχή σε περιοχή της ίδιας πλευράς της μεμβράνης (με εξειδικευμένες δομές, όπως βοθρία κλαθρίνης, συνάψεις νευρικών κυττάρων, μικρολάχνες, δεσμοσώματα, κλπ., που εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες).

Στο λιπιδικό μεμβρανικό περιβάλλον, οι (ενσωματωμένες) μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι προσαρμοσμένες κατά τον άριστο τρόπο για την διεκπεραίωση της λειτουργίας τους. Για την διάσπαση των εγγενών (native) αλληλεπιδράσεων κατά την απομόνωση των πρωτεϊνών αυτών απαιτούνται ειδικά πειραματικά εργαλεία (οργανικοί διαλύτες, χαοτροπικά μέσα, απορρυπαντικά), ενώ για την αναγέννηση της πρωτεϊνικής λειτουργίας *in vitro* απαιτούνται κατά κανόνα ευαίσθητες τεχνικές ανασύστασης με χρήση κατάλληλων μεμβρανικών λιπιδίων, ανάλογα με το είδος οργανισμού (κατασκευή τεχνητών λιπιδικών μεμβρανών). Τόσο οι τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες (πρωτεολιποσώματα) όσο και τα απομονωμένα κλάσματα μεμβρανών και μεμβρανικά κυστίδια (vesicles) αποτελούν ενδεδειγμένα συστήματα μελέτης της μεμβρανικής δομής και μεμβρανικών λειτουργιών όπως μεταφορά μικρομορίων ή μεμβρανο-σύνδετες ενζυμικές αντιδράσεις.

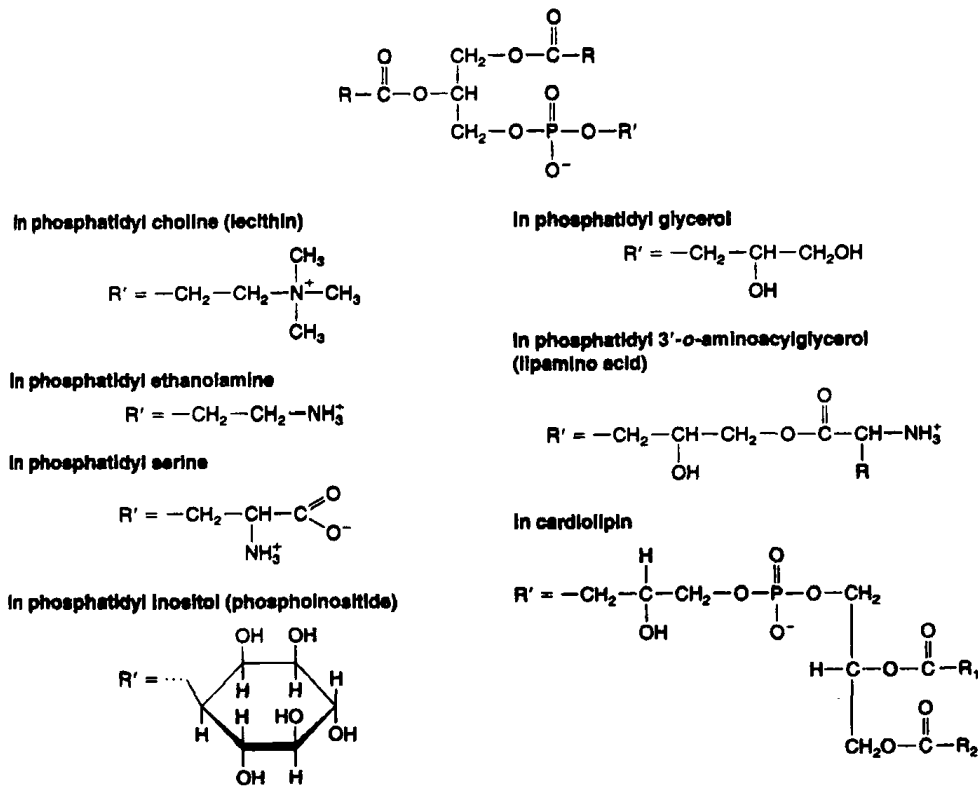
### Γ. Φωσφολιπίδια μεμβρανών

Από τα λιπίδια που χρησιμεύουν ως δομικά συστατικά των βιολογικών μεμβρανών (φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια, στερόλες), σταθερό





συστατικό είναι τα φωσφολιπίδια, που απαντώνται σε όλα τα είδη οργανισμών και δημιουργούν τη δομή της διπλοστιβάδας. Πρόκειται για παράγωγα του φωσφατιδικού οξέος (PA) (δι-ακυλο-γλυκερινο-φωσφορικού οξέος) όπου η φωσφορική ομάδα εστεροποιείται με γλυκερόλη (φωσφατιδυλο-γλυκερόλη, PG), ινοσιτόλη (φωσφατιδυλο-ινοσιτόλες, PI), σερίνη (φωσφατιδυλο-σερίνη, PS) ή παράγωγα σερίνης (φωσφατιδυλο-χολίνη, PC, και φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη, PE) (Εικόνα 4.3).



**Εικόνα 4.3.** Γενική χημική δομή και τύποι φωσφολιπιδίων [από Switzer and Garrity, *Experimental Biochemistry*, Freeman & Co., New York, 1999]

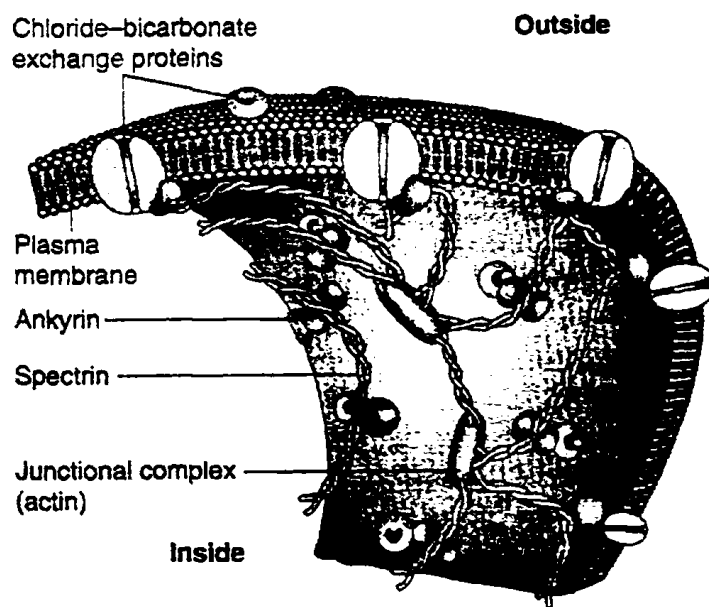
Η σύνθεση φωσφολιπιδίων της μεμβράνης διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό και από το ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα στο άλλο, ενώ κατά περιπτώσεις απαντώνται ειδικοί τύποι φωσφολιπιδίων όπως είναι η καρδιολιπίνη (δι-φωσφατιδυλο-γλυκερόλη) των μιτοχονδριακών μεμβρανών (Εικόνα 4.2). Ορισμένοι τύποι φωσφολιπιδίων, ιδιαίτερα φωσφατιδυλο-ινοσιτόλες (4-φωσφο-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη, PIP, και 4,5-διφωσφο-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη, PIP<sub>2</sub>), εμπλέκονται σε μηχανισμούς μεταγωγής σήματος. Εξάλλου, η αλληλεπίδραση των φωσφολιπιδίων με πλευρικές ομάδες αμινοξέων ενδομεμβρανικών πρωτεϊνών είναι σημαντική, όπως έχει δείχθει σε πολλές περιπτώσεις, για τον μηχανισμό λειτουργίας τους.



Κατά γενικό κανόνα, τα λιπίδια εκχυλίζονται βάσει της διαλυτότητας τους σε οργανικούς διαλύτες, κυρίως σε μίγματα χλωροφορμίου-μεθανόλης. Τα φωσφολιπίδια, ιδιαίτερα, είναι ευδιάλυτα σε χλωροφόρμιο και (σε αντίθεση με τριγλυκερίδια και άλλα ουδέτερα λιπίδια) αδιάλυτα σε ακετόνη.

#### Δ. Μεμβρανικές πρωτεΐνες και λιπίδια ερυθροκυττάρων

Γιατί ερυθροκύτταρα; Τα ερυθροκύτταρα (θηλαστικών) αφθονούν στο αίμα, δεν περιέχουν υποκυτταρικά οργανίδια, οι μεταβολικές τους διεργασίες είναι περιορισμένες, και δίδουν ομοιογενή παρασκευάσματα μεμβρανών, οι οποίες απομονώνονται με ευχέρεια. Αρκεί μία απλή διαδικασία τριών σταδίων, δηλ. (α) φυγοκέντρηση, (β) υποσμωτική λύση και (γ) έκπλυση της αιμοσφαιρίνης και των άλλων κυτταροπλασματικών συστατικών. Επομένως, είναι ιδεώδη συστήματα μελέτης των μεμβρανών στο φοιτητικό εργαστήριο.



**Εικόνα 4.4.** Ενδομεμβρανικές και περιφερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες των ερυθροκυττάρων [από Switzer and Garrity, *Experimental Biochemistry*, Freeman & Co., New York, 1999]

Οι κύριες πρωτεΐνες των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών είναι περί τις 20, εκ των οποίων 30% καλύπτεται από τον αντιμεταφορέα  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  και μικρότερο ποσοστό από την αντλία  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , την γλυκοφορίνη (glycophorin), και την περμεάση γλυκόζης (GLUT1,3), ενώ από τις περιφερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες κυριότερες είναι η σπεκτρίνη, η ακτίνη, και η αγκυρίνη που δημιουργούν ένα είδος μεμβρανικού σκελετού (Εικόνα 4.4). Από τα λιπίδια



(40% της μάζας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης), μεγαλύτερο ποσοστό καταλαμβάνουν η χοληστερόλη, η σφιγγομυελίνη, η φωσφατιδυλο-χολίνη, η φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλο-σερίνη και, κατά 2%, η φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (Εικόνα 4.2).

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A. Απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών

Βιολογική πηγή των ερυθροκυττάρων θα είναι δείγματα αίματος φυσιολογικών ανθρώπων (περί τα 120 ml) συλλεγόμενα σε σωληνάρια με αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό νάτριο ως αντιπηκτικό (EDTA tubes). Σε αρχικό στάδιο (A1), παραλαμβάνονται τα κυτταρικά συστατικά του αίματος με φυγοκέντρηση σε "χαμηλό" πεδίο βαρύτητας (1000Xg) και ισοσμωτικό περιβάλλον και, στη συνέχεια (A2), διενεργείται υποσμωτική λύση των ερυθροκυττάρων και φυγοκεντρική καταβύθιση των μεμβρανών σε "υψηλό" πεδίο βαρύτητας (20000Xg).

#### A1. Συλλογή κυττάρων

Σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης προστίθενται 22 ml διαλύματος φωσφορικού νατρίου ( $\text{NaP}_i$ , δηλ. μίγματος  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  και  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), pH 7.0, 0.3 M, και 120 ml αίματος και, μετά από ήπια ανάδευση, το μίγμα φυγοκεντρείται σε 2500 rpm, 5 min. Το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε  $\text{NaP}_i$ , 0.3 M, 100 ml, και φυγοκεντρείται και πάλι, όπως προηγουμένως. Το τελικό ίζημα αναδιαλύεται σε  $\text{NaP}_i$ , 0.3 M, 20 ml.

#### A2. Λύση ερυθροκυττάρων και συγκομιδή μεμβρανών

Το κυτταρικό εναιώρημα (20 ml) προστίθεται σε 100 ml διαλύματος  $\text{NaP}_i$ , 0.02 M (υποσμωτικό διάλυμα) και, μετά από ήπια ανάδευση, το μίγμα φυγοκεντρείται σε 15000 rpm, 30 min (φυγόκεντρος Sorvall RC-5B, κεφαλή SS-34). Απομακρύνεται **με προσοχή** το υπερκείμενο και το (μη συμπαγές) ίζημα μεμβρανών αναδιαλύεται σε  $\text{NaP}_i$ , 0.02 M, 100 ml. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση (15000 rpm, 10 min), της οποίας το ίζημα αναδιαλύεται και



φυγοκεντρείται, όπως προηγούμενως. Το τελικό ίζημα (το οποίο θα πρέπει να είναι γαλακτώδες και ελεύθερο αιμοσφαιρίνης) εναιωρείται σε ολικό όγκο 10 ml. Το κλάσμα απομονωμένων μεμβρανών φυλάσσεται στους 4 °C.  
(Το μέρος αυτό της Ασκήσης προετοιμάζεται από τους επιβλέποντες)

### **B. Εκχύλιση των λιπιδίων**

Στο στάδιο αυτό, χρησιμοποιούνται υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες, κατά προτίμηση κωνικής βάσης, με βιδωτό πώμα επενδεδυμένο με teflon. Ογκος 0.8 ml εκ του απομονωμένου κλάσματος μεμβρανών (A2) διανέμεται σε 2 σωλήνες. Σε κάθε δείγμα (των 0.4 ml) προστίθενται διαδοχικά, 3 ml μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:2, v/v), 1 ml χλωροφορμίου και 1 ml διαπεσταγμένου ύδατος: μετά από κάθε προσθήκη μεσολαβεί έντονη ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα (vortex). Το μίγμα φυγοκεντρείται σε 1500 rpm [περί τα 500Xg], 5 min, για τον διαχωρισμό της υδατικής (υδατο-μεθανολικής) και της οργανικής (χλωροφορμικής) φάσης.

Σε κάθε σωλήνα, απομακρύνεται το μεγαλύτερο μέρος της υδατικής (άνω) φάσης και παραλαμβάνεται η οργανική (κάτω) φάση, με προσοχή ώστε να αποφευχθεί πρόσμιξη από το λευκό ίζημα (μετουσιωμένων πρωτεϊνών) που σχηματίζεται στη μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο στιβάδων.

Η οργανική φάση (που περιέχει τα λιπίδια) μεταφέρεται σε νέο σωλήνα, γνωστής μάζας (απαιτείται προζύγιση). Ο διαλύτης απομακρύνεται (μέχρι ξηρού) σε ρεύμα αζώτου και το ξηραμένο δείγμα ζυγίζεται για προσδιορισμό της ολικής μάζας λιπιδίων, από τη διαφορά μεταξύ προζύγισης και τελικής ζύγισης. Το παρασκεύασμα αναδιαλύεται σε 1 ml χλωροφορμίου και φυλάσσεται, υπό ατμόσφαιρα αζώτου (θερμοκρασία δωματίου).

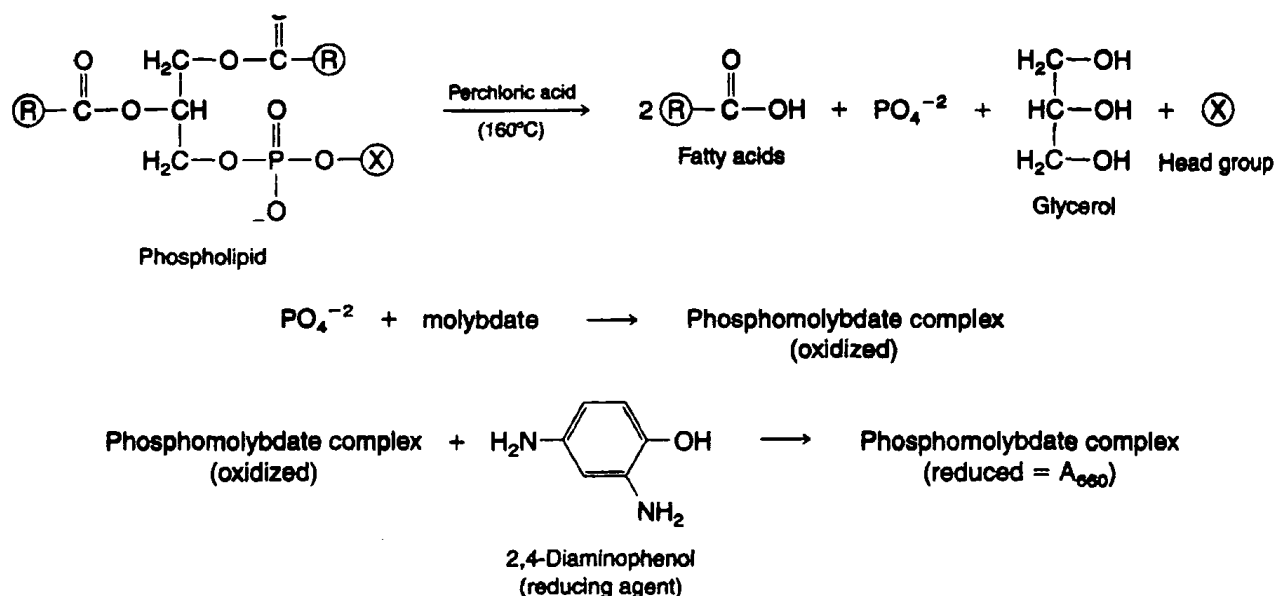
### **Γ. Προσδιορισμός ολικών φωσφολιπιδίων**

Χρησιμοποιούνται και πάλι υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες, με βιδωτό πώμα επενδεδυμένο με teflon, όπως στο στάδιο B. Για την αποφυγή προσμίξεων από φωσφορικά άλατα προερχόμενα από απορρυπαντικά, οι σωλήνες αυτοί θα πρέπει να πλένονται με αραιό διάλυμα δωδεκυλθειϊκού νατρίου (SDS) (0.5% w/v).

Η διαδικασία ακολουθεί δύο στάδια, απελευθέρωση των φωσφορικών ομάδων των φωσφολιπιδίων με υπερχλωρικό οξύ (Γ1) και δοκιμασία



προσδιορισμού των φωσφορικών με μολυβδαινικό αντιδραστήριο (Γ2), όπως παρουσιάζεται περιληπτικά στην Εικόνα 4.5.



**Εικόνα 4.5.** Αρχή προσδιορισμού φωσφολιπιδίων μέσω (α) λύσης των φωσφορικών δεσμών και (β) δοκιμασίας προσδιορισμού των φωσφορικών ιόντων [από Switzer and Garrity, Experimental Biochemistry, Freeman & Co., New York, 1999]

### Γ1. Φωσφορόλυση

Δείγματα όγκου 50 και 100 μl από το παρασκεύασμα λιπιδίων (B, διάλυμα χλωροφορμίου) μεταφέρονται σε νέους σωλήνες, ξηραίνονται υπό ρεύμα αζώτου (στην απαγωγό εστία) και αναδιαλύονται, με ήπια ανάδευση, σε 0.5 ml υπερχλωρικού οξέος (70% w/v). Ακολουθεί επώαση σε κλίβανο ή αμμόλουτρο (160 °C), επί 12-15 h.

### Γ2. Προσδιορισμός φωσφορικών

Τα δείγματα επαναφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου και, μαζί με πρότυπα δείγματα φωσφορικών (phosphate standards, NaP<sub>i</sub>), υποβάλλονται στη δοκιμασία μέτρησης φωσφορικών, ως εξής:

	(όγκοι σε ml)						
HClO <sub>4</sub> (70% w/v)	0.5	0.48	0.45	0.4	0.3	0	0
δείγμα-1 (από 50 μl) (Γ1)	0	0	0	0	0	0.5	0
δείγμα-2 (από 100 μl) (Γ1)	0	0	0	0	0	0	0.5
NaP <sub>i</sub> (1 mM)	0	0.02	0.05	0.1	0.2	0	0
[όγκος σε HClO <sub>4</sub> (70%), 0.5 ml]							
ddH <sub>2</sub> O	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4

μολυβδαινικό αμμώνιο (5% w/v)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2,4-διαμινοφαινόλη [αναγωγικό]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
[όγκος σε ddH <sub>2</sub> O, 2.6 ml]							
<b>επώαση, 30 min, 110 °C</b>							
<i>[επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου]</i>							
<hr/>							
$A_{660\text{nm}}$							

Θα κατασκευασθεί καμπύλη αναφοράς ( $A_{660\text{nm}}$  έναντι  $\mu\text{mol Pi}$ ), με βάση την οποία προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε φωσφορικά των δειγμάτων-1 και -2. Από τις τιμές αυτές, θα υπολογισθεί η συγκέντρωση φωσφολιπιδίων (σε  $\mu\text{mol/ml}$ ) καθώς και το ποσοστό φωσφολιπιδίων επί του συνόλου των λιπιδίων των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών (κατά μάζα), λαμβάνοντας ως δεδομένα ότι

(α) η αναλογία φωσφορικών προς φωσφολιπίδια, σε γραμμομοριακή βάση, είναι 1:1 (Εικόνα 4.5),

(β) το μέσο μοριακό βάρος των φωσφολιπιδίων είναι 780 Da.

**Σημείωση:** Κάθε ομάδα φοιτητών θα εκτελέσει δύο *παράλληλες* εργασίες: (α) εκχύλιση λιπιδίων και απελευθέρωση των φωσφορικών ομάδων (B-Γ1), σε παρασκεύασμα μεμβρανών που θα δοθεί από τους επιβλέποντες, και (β) προσδιορισμό φωσφορικών (Γ2), σε δείγματα φωσφορολυθέντων φωσφολιπιδίων που θα δοθούν επίσης από τους επιβλέποντες.



**Πίνακας 4.1.** Διάγραμμα ροής της μεθόδου απομόνωσης μεμβρανών και λιπιδίων ερυθροκυττάρων και προσδιορισμού φωσφολιπιδίων

NaP <sub>i</sub> , 0.3 M (22 ml)	<b>Αίμα</b> (120 ml)	2500 rpm, 5 min (25 °C)
NaP <sub>i</sub> , 0.3 M (100 ml)	Ιζημα	2500 rpm, 5 min (25 °C)
NaP <sub>i</sub> , 0.3 M (20 ml)	Κύτταρα	
NaP <sub>i</sub> , 0.02 M (100 ml)	Κύτταρα (20 ml)	15000 rpm, 30 min (25 °C)
NaP <sub>i</sub> , 0.02 M (100 ml)	Ιζημα	15000 rpm, 10 min (25 °C)
NaP <sub>i</sub> , 0.02 M (100 ml)	Ιζημα	15000 rpm, 10 min (25 °C)
NaP <sub>i</sub> , 0.02 M (20 ml)	Ιζημα	15000 rpm, 10 min (25 °C)
CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH (1:2) (3 ml) CHCl <sub>3</sub> (1 ml) ddH <sub>2</sub> O (1 ml)	<b>Μεμβράνες</b> [φυλάσσονται στους 4 °C] 0.4 ml X2	vortex vortex vortex 1500 rpm, 5 min (25 °C)
CHCl <sub>3</sub> (1 ml)	Οργανική φάση X2 (χλωροφορμίου)	προζύγιση ξηράνση (N <sub>2</sub> ) ζύγιση
HClO <sub>4</sub> (70% w/v), 0.5 ml	<b>Λιπίδια</b> [25 °C] 50 µl, 100µl	ξηράνση (N <sub>2</sub> ) 12-15 h (160 °C)
<b>Προσδιορισμός φωσφορικών (φωσφολιπιδίων) Γ2</b>		



## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ

Πειραματικό μέρος Γ2:

Φωσφορικά (μμοΙ  $P_i$ )

$A_{660nm}$

0

0.02

0.05

0.1

0.2

δείγμα-1

δείγμα-2

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Πειραματικό μέρος Γ2:

Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό φωσφορικών ( $A_{660}$  έναντι μμοΙ  $P_i$ )

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Πειραματικό μέρος Β-Γ2:

Συγκέντρωση φωσφολιπιδίων μεμβρανικού παρασκευάσματος (σε μμοΙ/ml)

Ποσοστό φωσφολιπιδίων επί του συνόλου των μεμβρανικών λιπιδίων (w/w)





## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΠΕΔΩΣΗΣ

Πειραματικό μέρος Α:

1. Για ποιο λόγο χρησιμοποιείται το διάλυμα  $\text{NaP}_i$ , 0.3 M (στάδιο A1) και για ποιο λόγο το διάλυμα  $\text{NaP}_i$ , 0.02 M (στάδιο A2);
2. Γιατί θεωρούμε ότι το παρασκεύασμα μεμβρανών που λαμβάνεται αντιπροσωπεύει μόνο μεμβράνες ερυθροκυττάρων και όχι μεμβράνες άλλων κυτταρικών συστατικών του αίματος π.χ. λεμφοκυττάρων;

Πειραματικό μέρος Β:

3. Ποιος ο ρόλος του χλωροφορμίου στη διαδικασία εκχύλισης; Τι θα συνέβαινε αν στην οργανική φάση, μετά τη ξήρανση, προσθέταμε ακετόνη;

Πειραματικό μέρος Γ:

4. Είναι αναμενόμενη η τιμή που υπολογίσατε από τα πειραματικά σας δεδομένα για το ποσοστό φωσφολιπιδίων επί του συνόλου μεμβρανικών λιπιδίων; Συγκρίνατε με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Εικόνα 4.2).



# ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

## ΑΣΚΗΣΗ 5

### Απομόνωση και φάσματα απορρόφησης DNA

1. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από ήπαρ επίμυος
2. Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA ( $A_{260 \text{ nm}}$ )
3. Φάσματα απορρόφησης νουκλεϊκών οξέων στο υπεριώδες

Όνοματεπώνυμο φοιτητή

Υπογραφή επιβλέποντα



## **Απομόνωση και φάσματα απορρόφησης DNA**

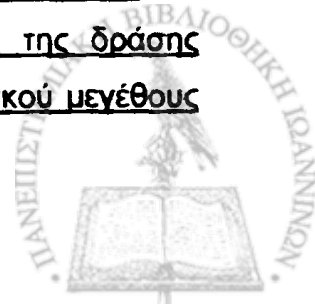
### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ**

Στόχος της Άσκησης 5 είναι να εξοικειωθούν οι φοιτητές με τη μεθοδολογία απομόνωσης και με τις φωτομετρικές ιδιότητες του DNA, μακρομορίου αναφοράς στη σύγχρονη Βιοχημεία και Μοριακή Βιολογία. Θα απομονωθεί γονιδιωματικό (genomic) DNA από ήπαρ επίμυος, με την κλασική μέθοδο χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης, και θα ληφθούν φάσματα απορρόφησης του απομονωθέντος DNA στο υπεριώδες (220-300 nm).

Η καλή πειραματική γνώση των μεθοδολογιών απομόνωσης του γονιδιωματικού (χρωμοσωμικού) DNA αποτελεί πρωταρχικό μέλημα στη Μοριακή Βιολογία και Βιοχημεία. Ένας από τους κυριότερους λόγους είναι ότι πολλές εργαστηριακές τεχνικές, μεταξύ των οποίων η κατασκευή βιβλιοθηκών γονιδιωμάτων και η κλωνοποίηση γονιδίων, στηρίζονται στην παρασκευή γονιδιωματικού DNA μεγάλου μοριακού μεγέθους και υψηλής καθαρότητας. Εκτός από το χρωμοσωμικό (γονιδιωματικό), συχνότατα χρησιμοποιείται και το πλασμιδιακό DNA, καθώς τα πλασμίδια (μικρά κυκλικά, ομοιοπολικά κλειστά, αυτόνομα αντιγραφόμενα δίκλινα μόρια "εξωχρωμοσωμικού" DNA που απαντούν κυρίως σε βακτήρια) αξιοποιούνται στο ερευνητικό εργαστήριο ως φορείς ανασυνδυασμένου DNA (cloning vectors). Στις εφαρμογές όπου απαιτείται απομόνωση πλασμιδιακού DNA, η μεθοδολογία που ακολουθείται (π.χ. αποδιάταξη σε ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον, φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση συγκέντρωσης χλωριούχου καισίου -βρωμιούχου αιθιδίου κλπ.) στηρίζεται στο σχετικά μικρό μέγεθος και στον μεγαλύτερο βαθμό υπερσπείρωσης (supercoiling) των πλασμιδίων έναντι του χρωμοσωμικού DNA. Μέθοδοι απομόνωσης πλασμιδιακού DNA δεν θα εξετασθούν στην παρούσα Άσκηση.

#### **A. Πρωτόκολλα απομόνωσης γονιδιωματικού DNA**

Κατά την εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου απομόνωσης γονιδιωματικού DNA ζητούμενα είναι αφενός η ικανοποιητικά μεγάλη απόδοση και καθαρότητα του μακρομοριακού παρασκευάσματος και αφετέρου η αποφυγή της δράσης DNAασών και η διατήρηση όσο το δυνατόν μεγαλύτερου μοριακού μεγέθους



των ινών DNA. Για την επίτευξη των στόχων αυτών, λαμβάνονται υπόψη πολλές από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μακρομορίου, όπως είναι το μεγάλο ιξώδες διαλυμάτων DNA, η ευχέρεια σχηματισμού ινών αλλά και η ευαισθησία σε μηχανική (ή ενζυμική) θραύση, η ευχέρεια διαλυτοποίησης σε υδατικό διαλύτη αλλά και καταβύθισης του μορίου με αλκοόλες (αιθανόλη, ισοπροπυλική αλκοόλη) κλπ. Επίσης, η ιδιότητα των μορίων DNA να απορροφούν σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος στο υπεριώδες χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της απόδοσης της μεθόδου και την εκτίμηση της καθαρότητας του παρασκευάσματος.

Αν και οι μέθοδοι που είναι δυνατόν να εφαρμοσθούν για την απομόνωση και καθαρισμό του γονιδιωματικού (genomic) DNA είναι σήμερα πολλές, όλα τα πρωτόκολλα απομόνωσης απαιτούν δύο κυρίως ομάδες ενεργειών:

(α) λύση των κυττάρων και διαλυτοποίηση του DNA

(β) απομάκρυνση των προσμίξεων (πρωτεϊνών, RNA, ολιγονουκλεοτιδίων).

Η βασική μεθοδολογία που ακολουθείται για το μέρος (β) (δηλ. ουσιαστικά η επιλεγόμενη μέθοδος καθαρισμού του DNA) δίδει συνήθως και το όνομα στην όλη διαδικασία (μέθοδος χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης, φαινόλης, φορμαμιδίου, υδροχλωρικού γουανιδινίου, μαγνητικών σφαιριδίων, κλπ.). Για παράδειγμα, χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη επιδρούν μετουσιώνοντας τα πρωτεϊνικά συστατικά τα οποία στη συνέχεια καταβυθίζονται, η φαινόλη εκχυλίζει το DNA και συγχρόνως μετουσιώνει τις πρωτεΐνες ενώ αφήνει το RNA στην υδατική φάση, το φορμαμίδιο απελευθερώνει το DNA από τα συμπλέγματα των νουκλεοπρωτεϊνών, κ.ο.κ. Παράλληλα, το DNA προφυλάσσεται από την ανεπιθύμητη δράση DNAσών με δέσμευση των δισθενών κατιόντων σε χηλικά σύμπλοκα (παρουσία EDTA, κιτρικών ανιόντων κλπ.) ενώ σε ορισμένα πρωτόκολλα προστίθενται εξωγενώς άλλα ένζυμα που υποβοηθούν τον καθαρισμό αποικοδομώντας τα ανεπιθύμητα μακρομόρια (πρωτεϊνάση K, RNAάση ελεύθερη-DNAσών). Έχουν επίσης αναπτυχθεί μέθοδοι που εξασφαλίζουν ταυτόχρονη απομόνωση και των τριών ειδών πληροφοριακών μακρομορίων (DNA, RNA, πρωτεΐνες) στηριζόμενες στην ανάπτυξη νέων χημικών αντιδραστηρίων, όπως π.χ. του αντιδραστηρίου



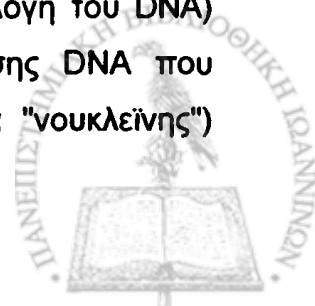
TR1zoi που συνδυάζει τις δράσεις φαινόλης, θειοκυανικού γουανιδινίου και χλωροφορμίου (Piotr Chomczynski, 1993).

Πώς όμως μπορεί να επιλεγεί η καταλληλότερη μέθοδος απομόνωσης; Η επιλογή θα πρέπει να γίνεται όχι μόνο με βάση την τεχνική απλοποίηση ή ευχέρεια της διαδικασίας, αλλά κυρίως με βάση την ιδιαίτερη ανάγκη εφαρμογής, δηλ. ανάλογα με την ερευνητική εργασία για την οποία θα χρησιμοποιηθεί το απομονωθέν DNA. Είναι γνωστό, για παράδειγμα, ότι ορισμένες μέθοδοι, όπως η μέθοδος φαινόλης και η μέθοδος φορμαμιδίου, αποδίδουν μεγάλου μοριακού μεγέθους DNA (200 kb και άνω), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης και της κατασκευής βιβλιοθηκών γονιδιώματος, που αποτελεί αρχικό στάδιο για την κλωνοποίηση νέων γονιδίων και την ανάλυση αλληλουχίας γονιδιωμάτων. Άλλες μέθοδοι, όπως αυτή του υδροχλωρικού γουανιδινίου (με δύο ουσιαστικά βήματα, κυτταρική λύση παρουσία του υδροχλωρικού γουανιδινίου και καταβύθιση του DNA με αιθανόλη), είναι ταχύτερες αλλά αποδίδουν DNA σχετικά μικρού μοριακού μεγέθους (περί τις 80 kb), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή ο υβριδισμός κατά Southern, αλλά όχι σε εφαρμογές όπως η κατασκευή βιβλιοθηκών DNA.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι ίδιες γενικές μεθοδολογίες απομόνωσης γονιδιωματικού DNA μπορούν να εφαρμοσθούν σε μεγάλο εύρος βιολογικών υλικών, όπως βακτήρια, φυτικά κύτταρα, κύτταρα θηλαστικών (από ιστούς, κυτταρικές σειρές, αίμα, μονιμοποιημένα ιστικά παρασκευάσματα, βιολογικά υγρά, κλπ.). Στην παρούσα Άσκηση, θα απομονωθεί γονιδιωματικό DNA από ήπαρ επίμυος με την μέθοδο χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης.

## **B. Η μέθοδος χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης**

Πρόκειται για μία κλασική μέθοδο απομόνωσης, από τις πρώτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή γονιδιωματικού DNA. Ορισμένες από τις τεχνικές λεπτομέρειες της μεθόδου (π.χ. εκχύλιση του DNA παρουσία υψηλής συγκέντρωσης άλατος ή χρήση της υάλινης ράβδου για συλλογή του DNA) υπενθυμίζουν τις πρώτες μεθοδολογίες μερικής απομόνωσης DNA που εφαρμόστηκαν από τον Friedrich Miescher (παρασκευάσμα "νουκλεΐνης")



(1868-1869). Η μέθοδος, μάλιστα, στην αρχική της μορφή, δεν επιτυγχάνει πλήρη απομάκρυνση του RNA (J. Marburg, 1961), μειονέκτημα το οποίο αντιμετωπίζεται με χρήση φαινόλης σε συνδυασμό με το μίγμα χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης, οπότε το DNA εκχυλίζεται στη φαινολική φάση ενώ το RNA απομακρύνεται με την υδατική φάση (P. Chambon, 1972).

Συνοπτικά, μετά την λύση των κυττάρων, χρησιμοποιείται δωδεκυλθειϊκό νάτριο (SDS) για την ολοκλήρωση της διάσπασης των μεμβρανικών στοιχείων και υψηλή ιοντική ισχύς (με προσθήκη ιόντων  $\text{Cl}^-$  ή  $\text{ClO}_4^-$ ) για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών από τα νουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα, ενώ οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται με τη δράση του μίγματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης που μειώνει τη διηλεκτρική σταθερά του υδατικού μέσου. Οι αποδιατασσόμενες πρωτεΐνες απομακρύνονται ως συσσωμάτωμα που καθιζάνει στην μεσεπιφάνεια των δύο φάσεων, οργανικής και υδατικής, μετά από ανάμιξη και φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, το DNA απομονώνεται από την υδατική φάση. Οι ίνες του DNA καθιζάνουν με προσθήκη αιθανόλης και συλλέγονται γύρω από μία υάλινη ράβδο (Πειραματικό μέρος Δ), ενώ τα υπολείμματα πρωτεϊνών, το RNA και άλλα μακρομόρια που τυχόν έχουν παραμείνει δεν σχηματίζουν ίνες ώστε να συλλεχθούν στη ράβδο και απομακρύνονται.

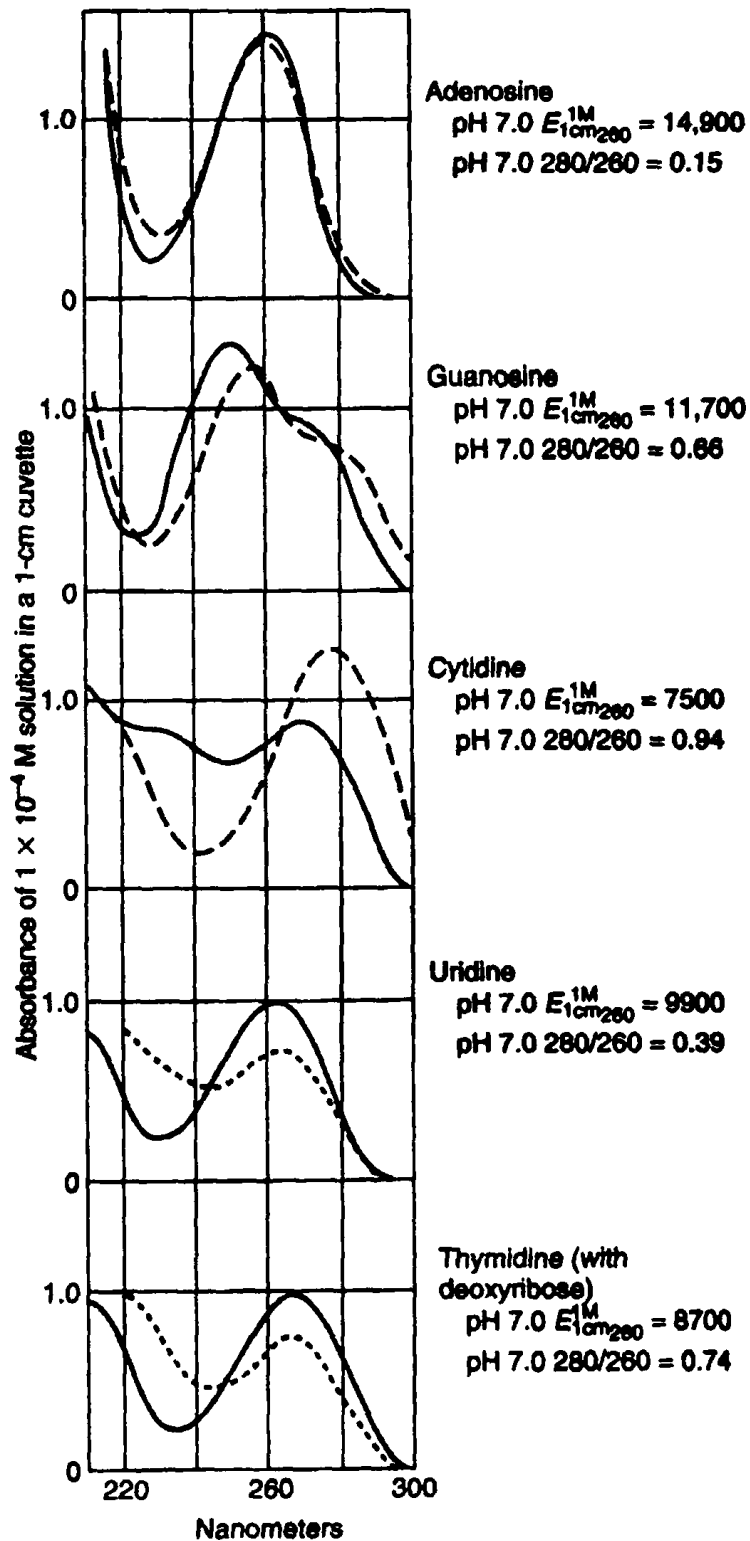
Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, η αποφυγή της ενεργοποίησης DNAσών εξασφαλίζεται με την προσθήκη χηλικών παραγόντων (όπως είναι το κιτρικό και το EDTA) αλλά και από τους αποδιατακτικούς παράγοντες που συμμετέχουν κατά το στάδιο Γ της απομόνωσης (π.χ. SDS, χλωροφόρμιο κλπ.)

### **Γ. Φάσματα νουκλεϊκών οξέων στο υπεριώδες**

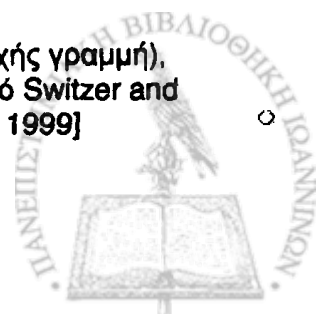
Όλα τα νουκλεϊκά οξέα, ολιγονουκλεοτίδια, μονονουκλεοτίδια, νουκλεοσίδια (Εικόνα 5.1) και οι αντίστοιχες αζωτούχες βάσεις απορροφούν ισχυρά στο υπεριώδες (ultraviolet). Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στους αρωματικούς δακτυλίους των αζωτούχων βάσεων (αδενίνης, θυμίνης/ουρακίλης, γουανίνης, κυτοσίνης) και, επομένως, το ολικό φάσμα υπεριώδους ενός μορίου DNA ή RNA προκύπτει από το συνδυασμό των φασμάτων απορρόφησης των



βάσεων αυτών. Ένα τυπικό φάσμα απορρόφησης του (δίκλωνου) DNA (dsDNA, double-stranded DNA) στην περιοχή του υπεριώδους, 220-300 nm, δίδεται στην Εικόνα 5.2. Επίσης δίδεται, προς αντιπαραβολή, το τυπικό φάσμα απορρόφησης ενός διαλύματος RNA, ίσης συγκέντρωσης.



Εικόνα 5.1. Φάσματα απορρόφησης νουκλεοσιδίων σε pH 7.0 (συνεχής γραμμή), pH 1.0 (διακεκομμένη) ή pH 13.0 (διακεκομμένη με μικρές παύλες) (από Switzer and Garrity, Experimental Biochemistry, Freeman & Co., New York, 1999)

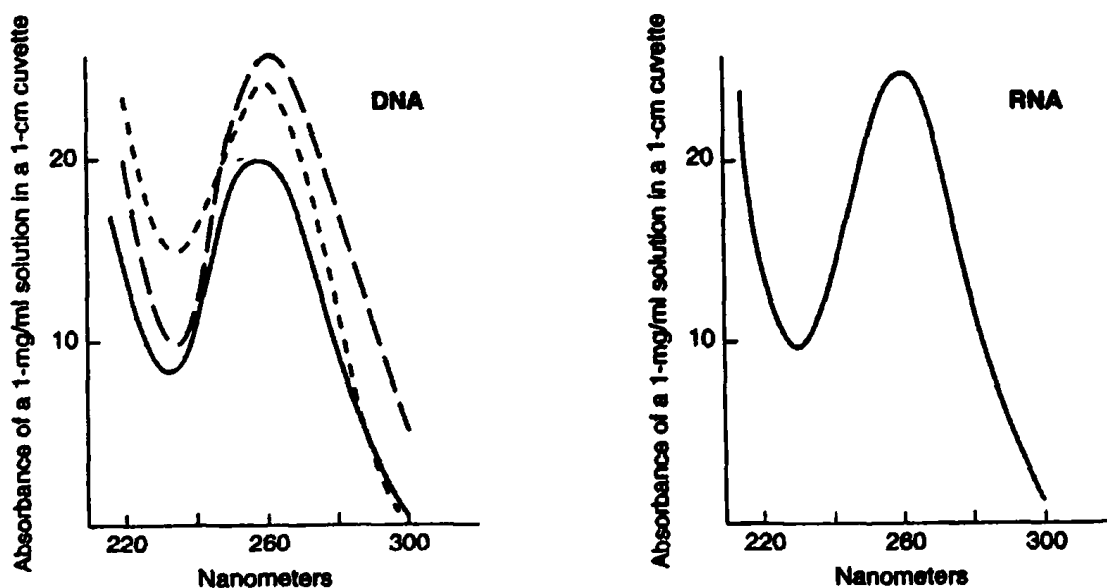


Τα δεδομένα του φάσματος απορρόφησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση, τον ποσοτικό προσδιορισμό και τον έλεγχο καθαρότητας του DNA ενός μακρομοριακού δείγματος:

Η ανίχνευση στηρίζεται στο ότι το DNA (dsDNA) εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό μέγιστο απορροφητικότητας στα 260 nm και μία χαρακτηριστική τιμή του λόγου συντελεστών απόσβεσης  $\epsilon_{260\text{nm}}/\epsilon_{280\text{nm}}$  ίση με 1.8.

Ο έλεγχος καθαρότητας στηρίζεται στο ότι η τιμή του λόγου  $\epsilon_{260\text{nm}}/\epsilon_{280\text{nm}}$  διαφέρει χαρακτηριστικά ανάλογα με το είδος μακρομορίου (για το RNA είναι 2.0, για το dsDNA είναι 1.8, για τις πρωτεΐνες είναι στην περιοχή του 0.5).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός, τέλος, βασίζεται στην τιμή του συντελεστή απόσβεσης του dsDNA (260 nm) που είναι:  $\epsilon^{1\text{ mg/ml}}_{260\text{nm}} = 20\text{ mg}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{ml}$ . Ο αντίστοιχος συντελεστής για το RNA καθώς και για το πλήρως αποδιαταγμένο, μονόκλωνο DNA (single-stranded DNA, ssDNA) είναι ελαφρά μεγαλύτερος ( $\epsilon^{1\text{ mg/ml}}_{260\text{nm}} = [\text{κατά προσέγγιση}] 25\text{ mg}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{ml}$ ), γεγονός το οποίο οφείλεται στο φαινόμενο του υπερχρωτισμού (hyperchromicity).



Εικόνα 5.2. Φάσματα απορρόφησης DNA [δίκλωνου, σε pH 7.0 (συνεχής γραμμή), pH 1.0 (διακεκομμένη) και pH 13.0 (διακεκομμένη με μικρές παύλες)] και RNA [από Switzer and Garrity, Experimental Biochemistry, Freeman & Co., New York, 1999]





**Σημείωση:** Για τις έννοιες των όρων "συντελεστής απόσβεσης" (extinction coefficient) και "απορροφητικότητα" (absorbance) ή "οπτική πυκνότητα" (optical density), βλ. Άσκηση 1, Εισαγωγή Β1.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A. Προετοιμασία του βιολογικού υλικού (ήπαρ επίμυος)

Παραλαμβάνονται δείγματα ήπατος από 2-3 αρσενικούς επίμυς (ποικιλίας Wistar), ηλικίας 120 ημερών. Το ήπαρ τεμαχίζεται, εκπλένεται σε ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου (0.01 M) που περιέχει NaCl, 0.9%, w/v, pH 7.0, και αποθηκεύεται (υπό υγρό άζωτο) σε δείγματα των 2 g.

(Το μέρος αυτό της Άσκησης θα προετοιμασθεί από τους επιβλέποντες)

Πριν προχωρήσετε στα επόμενα στάδια του Πειραματικού μέρους, διαβάστε προσεκτικά τον πίνακα που ακολουθεί:

#### Προφυλάξεις κατά τη διαδικασία απομόνωσης

Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, χρησιμοποιούνται διαλύματα αποστειρωμένα ή διηθημένα από στείρους ηθμούς, αποστειρωμένα πλαστικά και υάλινα υλικά και γάντια ώστε να αποφεύγονται προσμίξεις DNAάσης. Προς αποφυγή ενεργοποίησης ενδογενών DNAάσεων κατά τη διαδικασία ομοιογενοποίησης (στάδιο Β), οι εργασίες εκτελούνται κατά το δυνατόν υπό θερμοκρασία υγρού πάγου (0-4 °C), ενώ η χρήση της συσκευής Polytron γίνεται διακεκομμένα, με ενδιάμεση παραμονή του δείγματος σε παγόλουτρο, υπό τις οδηγίες του επιβλέποντα.

Κατά την διαδικασία απομόνωσης του DNA (στάδια Γ και Δ), τα υαλικά αποστειρώνονται ή προεκπλένονται με αραιό διάλυμα αιθυλενο-διαμνο-τετραοξικού νατρίου (EDTA, 1 mM). Επίσης, στο τελικό διάλυμα αναδιάλυσης (και αποθήκευσης) του DNA (TE buffer, βλ. κατωτέρω), εμπεριέχεται EDTA (1 mM). Λόγω της ιδιότητας του να δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα με δισθενή κατόντα, το EDTA δεσμεύει ιόντα  $Mg^{2+}$  (συμπαράγοντα των DNAάσεων) και αποτρέπει αποικοδόμηση του DNA κατά την παρασκευή και συντήρηση του μακρομοριακού δείγματος.



Θα πρέπει επίσης να αποφεύγεται σε όλα τα στάδια η έντονη ανατάραξη των δειγμάτων και, ιδιαίτερα, ο χειρισμός της υάλινης ράβδου κατά την συλλογή του DNA (στάδιο Δ) θα πρέπει να γίνεται προσεκτικά ώστε να αποφευχθεί μηχανική θραύση του DNA (shearing).

Ένα σχηματικό διάγραμμα της πορείας που ακολουθείται (Πειρ. μέρος Β-Δ) δίδεται στον Πίνακα 5.1.

## **Β. Ομοιογενοποίηση του ήπατος**

Το ήπαρ (2 g) εναιωρείται σε 6 ml ψυχρού ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού νατρίου (0.01 M), pH 7.0, NaCl (0.9%, w/v) και ακολουθεί υγρή ομοιογενοποίηση σε συσκευή Polytron PT1200 (Kinematica AG). Το ομοιογενοποίημα διηθείται από τετραπλή γάζα, τα δείγματα ισοζυγίζονται (υπό τις οδηγίες του επιβλέποντα) και φυγοκεντρώνονται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Sorvall RC-5B (κεφαλή SS-34), 6500 rpm, 15 min (4 °C). Αφαιρείται το υγρό υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης μαζί με το υπερκείμενο στρώμα λίπους. Το ίζημα (κλάσμα πυρήνων) χρησιμοποιείται για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA.

## **Γ. Απομόνωση ολικού DNA γονιδιώματος (genomic DNA) του επίμουσ**

Το ίζημα του σταδίου Β αναδιαλύεται σε 11 ml ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού νατρίου (0.15 M), pH 7.0. Μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως και προστίθεται στάγδην (dropwise) 1 ml διαλύματος δωδεκυλ-θειϊκού νατρίου (SDS), 20% , w/v, υπό αργή μαγνητική ανάδευση, επί 1-2 min. Μετά την προσθήκη, η ανάδευση συνεχίζεται επί 5 min. Το εναιώρημα επωάζεται σε υδατόλουτρο, 55 °C, επί 15 min, υπό περιοδική ανάδευση. Στη συνέχεια, προστίθεται 1 g στερεού NaCl και η επώαση (55 °C) συνεχίζεται υπό ανάδευση επί 10 min.

Ακολουθεί ψύξη του παρασκευάσματος σε παγόλουτρο και μεταφορά σε διαχωριστική χοάνη των 50 ml. Στη χοάνη προστίθενται 12.5 ml μίγματος χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1, v/v), το οποίο αναμιγνύεται με το παρασκεύασμα υπό συνεχή ανάδευση (10 min). Κρατείται η άνω φάση (υδατική) και απομακρύνεται η κάτω φάση (οργανική). Για καλύτερο διαχωρισμό, τα δείγματα που περιέχουν το μίγμα των δύο φάσεων



ισοζυγίζονται και φυγοκεντρώνονται σε φυγόκεντρο Sorvall RC-5B (κεφαλή SS-34), 10000 rpm, 15 min (θερμοκρασία δωματίου). Το διαυγές τμήμα της υδατικής φάσης (άνω φάση) μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα. Απορρίπτονται η κάτω (οργανική) φάση, το κατώτερο (διαταραχθέν) τμήμα της άνω φάσης, καθώς και το λευκό πρωτεϊνικό ίζημα που σχηματίζεται στην μεσεπιφάνεια μεταξύ υδατικής και οργανικής φάσης.

#### **Δ. Συλλογή του DNA**

Στην υδατική φάση (που περιέχει το απομονωθέν DNA) εμβαπτίζεται **υάλινη ράβδος** (που το άκρο της έχει αποστειρωθεί από φλόγα Bunsen και έχει εκπλυθεί με αραιό διάλυμα EDTA για δέσμευση ιόντων  $Mg^{2+}$  και αδρανοποίηση τυχόν ιχνών DNAάσης) και προστίθενται αργά 25 ml αιθανόλης (95%, v/v) υπό προσεκτική ανάδευση. Με πολύ αργή περιστροφή της υάλινης ράβδου, η αιθανόλη αναμιγνύεται σταδιακά με την υδατική φάση ώστε το DNA να σχηματίσει λευκές ζελατινώδεις ίνες στην μεσεπιφάνεια ύδατος-αιθανόλης και να τυλιχθεί γύρω από την υάλινη ράβδο. Όταν όλο το δείγμα του DNA συλλεγεί γύρω από την υάλινη ράβδο, η περίσσεια υγρού αποστραγγίζεται με πίεση της ράβδου στα τοιχώματα του δοχείου. Το συλλεγόν DNA εκπλένεται μία φορά με αιθανόλη (95%, v/v), στη συνέχεια με ακετόνη και αφήνεται να ξηρανθεί στον αέρα. Εναλλακτικά, το DNA αποσπάται από τη ράβδο και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα για πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης (με ξήρανση σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού, SpeedVac). Τέλος, το DNA διαλυτοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα **TE** (Tris-HCl, 10 mM, EDTA, 1 mM), pH 7.5 (1 ml).

#### **Ε. Φωτομέτρηση του DNA**

Ο προσδιορισμός συγκέντρωσης του απομονωθέντος DNA καθώς και ο έλεγχος καθαρότητας του παρασκευάσματος θα γίνει φασματοφωτομετρικά με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (μετά από αραιώση του τελικού παρασκευάσματος 1:200, δηλ. 5 μl σε 1 ml TE) στην περιοχή 220 - 300 nm.

##### **Ε1. Συγκέντρωση DNA**

Δείγματα από το παρασκεύασμα θα μετρηθούν στα **260 nm**, μετά από κατάλληλη αραιώση ώστε η τελική ένδειξη του οργάνου να είναι στην περιοχή



0.5-1.0. Η εναρκτήρια αραίωση του δείγματος θα είναι 1:50 (δηλ. 20 μl σε 1 ml TE). Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης, λαμβάνεται ως δεδομένο ότι διάλυμα οπτικής πυκνότητας  $A_{260nm} = 1.0$  περιέχει 0.05 mg DNA ανά ml. Εκτός από την τιμή της συγκέντρωσης (σε mg DNA/ml) θα δοθεί και η τιμή της **απόδοσης** (yield) της μεθόδου (σε mg DNA/g ήπατος), με την υπόμνηση ότι η διαδικασία αναφέρεται σε 2 g ιστού.

*Για να υπάρχει ένα μέτρο σύγκρισης, δίδονται οι αναγραφόμενες (δηλ. θεωρητικά αναμενόμενες) τιμές απόδοσης ανά g ιστού (ήπατος) ορισμένων σύγχρονων μεθόδων απομόνωσης DNA, που κυκλοφορούν στο εμπόριο:*

*TriPure [Boehringer], 2-3 mg DNA/g*

*Nucleon ST [Amersham], 0.3-1.2 mg DNA/g*

## **E2. Καθαρότητα του DNA**

Για την αραίωση δείγματος που επιλέχθηκε στο Πειρ. μέρος E1, λαμβάνονται οι τιμές οπτικής πυκνότητας στα **260 nm** και στα **280 nm**. Για την εκτίμηση της καθαρότητας του παρασκευάσματος, λαμβάνεται ως δεδομένο ότι ο λόγος  $A_{260nm}/A_{280nm}$  για το καθαρό DNA (dsDNA) είναι 1.8. Μία τιμή λόγου  $A_{260nm}/A_{280nm} < 1.75$  υποδεικνύει προσμίξεις πρωτεΐνης, ενώ τιμή  $> 1.85$  υποδεικνύει πρόσμιξη RNA.

## **E3. Φάσμα υπεριώδους**

Στη συνέχεια, θα εξετασθεί το φάσμα απορρόφησης του ανωτέρω δείγματος στην περιοχή του υπεριώδους από **220 nm** έως **300 nm**, με φωτομετρήσεις στα 220, 230, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295 και 300 nm. Σε κάθε διαφορετικό μήκος κύματος, θα προηγείται μηδενισμός της ένδειξης του οργάνου με το "τυφλό" δείγμα (blank, 1 ml TE). Από τα δεδομένα των φωτομετρήσεων, θα κατασκευασθεί διάγραμμα του φάσματος υπεριώδους για το δείγμα DNA που παρασκευάσατε.

## **E4. Ηλεκτροφόρηση του DNA επί πήγματος αγαρόζης**

Ως ασθενές οξύ, το DNA σε ουδέτερο pH έχει *αρνητικό* ηλεκτρικό φορτίο και θα κινηθεί προς την άνοδο ενός ηλεκτρικού πεδίου, με ταχύτητα που εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος και τη μορφή του μορίου (π.χ. βαθμός



υπερσπείρωσης, κυκλικό ή γραμμικό DNA). Στην αρχή αυτή βασίζεται η ηλεκτροφορητική μέθοδος για τον διαχωρισμό, ταυτοποίηση και ανάλυση των μορίων DNA, η οποία χρησιμοποιείται σήμερα σε όλες σχεδόν τις εφαρμογές της Μοριακής Βιολογίας. Η ανίχνευση των ζωνών DNA μπορεί να γίνει με απλούς τρόπους, όπως με άμεση φωτογράφιση υπεριώδους (rolaoid) μετά από χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).

Ηλεκτροφόρηση DNA γίνεται είτε επί πηγματος πολυακρυλαμιδίου, το οποίο εμφανίζει μεγάλη αναλυτική ικανότητα για μικρά τμήματα DNA (5 bp - 0.5 kb), είτε επί πηγματος αγαρόζης, το οποίο εμφανίζει μεγάλη αναλυτική ικανότητα για σχετικά μεγάλα τμήματα DNA (200 bp - 50 kb). Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης σε ασυνεχές ηλεκτρικό πεδίο (π.χ. παροδικών ηλεκτρικών ώσεων ή περιοδικά αντιστρεφόμενης πολικότητας) (pulse-field electrophoresis) επιτρέπει διαχωρισμό ακόμη μεγαλύτερων τμημάτων DNA (της τάξης των  $10^3$  -  $10^6$  kb) και χρησιμοποιείται συχνά σε αναλύσεις γονιδιώματος.

Στην παρούσα Άσκηση, θα ηλεκτροφορηθεί το παρασκευασθέν χρωμοσωμικό DNA επί πηγματος αγαρόζης, σε συνεχές ηλεκτρικό πεδίο, ώστε να εξετασθεί το κατά προσέγγιση μοριακό μέγεθος (όσο μεγαλύτερο το μοριακό βάρος του παρασκευασθέντος DNA, τόσο επιτυχέστερη μπορεί να θεωρηθεί τεχνικά η διαδικασία της απομόνωσης, βλ. ανωτέρω, *Προφυλάξεις κατά τη διαδικασία απομόνωσης*).

Η προετοιμασία του πηγματος ηλεκτροφόρησης θα έχει γίνει από τους επιβλέποντες, ως εξής: Χρησιμοποιείται οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα αγαρόζης, 0.8% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-acetate, 40 mM, Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM, pH 8.0), που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), 0.5 μg/ml, προετοιμάζεται σε πινάκιο χωρητικότητας 50 ml: Ανά 100 ml TAE, προστίθενται 0.8 g αγαρόζης. Το εναιώρημα αγαρόζης διαλυτοποιείται με *σύντομο* βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων. Μετά από μείωση της θερμοκρασίας σε ανεκτά επίπεδα, προστίθενται, ανά 100 ml, 5 μl από διάλυμα EtBr, 10 mg/ml, και το υγρό αποχέεται με προσοχή στο πινάκιο όπου έχει τοποθετηθεί εκ των προτέρων κτένι για δημιουργία οδόντωσης φρεατίων. Μετά την στερεοποίηση του πηγματος, το κτένι αφαιρείται προσεκτικά υπό προσθήκη μικρού όγκου TAE στον κενό χώρο των φρεατίων και το πινάκιο με το πηγμα τοποθετείται επί της συσκευής ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται με TAE. [Σημείωση: Ο χειρισμός του EtBr γίνεται με μεγάλη προσοχή, διότι έχει πιθανή καρκινογόνο δράση: ενσωματώνεται μεταξύ των βάσεων του DNA



(*intercalating agent*) και προκαλεί μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης (*frameshift mutagen*)]

Για την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, 10 μl από κάθε δείγμα DNA αναμιγνύονται με 2.5 μl διαλύματος "φόρτωσης" [DNA gel loading buffer, 5X, που περιέχει bromophenol blue, 0.25% (w/v), xylene cyanol, 0.25% (w/v), και γλυκερόλη, 30% (v/v)] και προστίθενται στα φρεάτια του πήγματος. Παράλληλα, σε γεινιάζοντα φρεάτια, προστίθενται ως μάρτυρες δείγματα που περιέχουν τμήματα DNA γνωστών μοριακών μεγεθών (**1 kb DNA ladder**) (0.1 mg/ml, 5 μl). Μετά τη φόρτωση των δειγμάτων, εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού με σταθερή τάση 80 V, επί 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την διακοπή της ηλεκτροφόρησης η πρώτη χρωστική (bromophenol blue) θα πρέπει να έχει καλύψει περί τα 2/3 της απόστασης έως την άκρη του πήγματος.

Εμφάνιση των ζωνών DNA γίνεται με έκθεση του πήγματος σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV-transilluminator). Για καταχώρηση και επεξεργασία του αποτελέσματος, μπορεί να γίνει φωτογράφιση υπεριώδους και μεταφορά της εικόνας σε ηλεκτρονικό επεξεργαστή [*Electrophoresis Documentation and Analysis System, Kodak Digital Science*]. Κατά την επεξεργασία, τα πρότυπα δείγματα (**1 kb DNA ladder**) χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μοριακού μεγέθους των DNA, υπό τις οδηγίες του επιβλέποντα.



**Πίνακας 5.1. Διάγραμμα ροής της μεθόδου χλωροφορμίου - ισοαμλικής αλκοόλης για απομόνωση γονιδιωματικού DNA**

	<b>Ήπαρ</b> (2 g)	
citrate saline (6 ml)		Ομοιογενοποίηση (0-4 °C)
		6500 rpm, 15 min (0-4 °C)
	<b>Ιζημα</b>	
citrate, 0.15 M, pH 7.0 (11 ml)		15 min (55 °C)
SDS, 20% (1 ml)		10 min (55 °C)
NaCl (1 g)		(0-4 °C)
χλωροφόρμιο - ισοαμλική αλκοόλη (24:1) (12.5 ml)		10000 rpm, 15 min (25 °C)
	<b>Υδατική φάση</b>	
αιθανόλη, 95% (25 ml)		υάλινη ράβδος
	<b>DNA</b>	SpeedVac
TE, pH 7.5 (1 ml)		

*Citrate saline* = κιτρικό νάτριο (0.01M), NaCl (0.9% w/v), pH 7.0

*SDS* = sodium dodecyl sulfate (δωδεκυλθειϊκό νάτριο)

*TE* = Tris-HCl, 10 mM, EDTA, 1 mM



## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ

Πειραματικό μέρος Ε1:

Αραίωση παρασκευάσματος (v/v)  $A_{260nm}$

1:50

-  
-  
-  
-

Πειραματικό μέρος Ε2:

Αραίωση (v/v)  $A_{260nm}$   $A_{280nm}$   $A_{260nm}/A_{280nm}$

-

Πειραματικό μέρος Ε3:

Μήκος κύματος (nm) Οπτική πυκνότητα

220

230

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300





## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Πειραματικό μέρος Ε3:

Φάσμα απορρόφησης του παρασκευασθέντος DNA (Οπτική πυκνότητα συναρτήσει του μήκους κύματος, μεταξύ 220 nm και 300 nm).

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Πειραματικό μέρος Ε1:

Συγκέντρωση DNA στο παρασκεύασμα (σε mg/ml)

Απόδοση DNA ανά μάζα ιστού (σε mg/g ήπατος)

Πειραματικό μέρος Ε2:

Τιμή του λόγου  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$



## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΠΕΔΩΣΗΣ

Πειραματικό μέρος Α-Δ:

1. Υποθέσατε ότι το μέσο μοριακό μέγεθος του DNA που παρασκευάσατε είναι 100 kb (δηλ.  $100 \times 10^3$  ζεύγη βάσεων). Θα ήταν δυνατόν αυτό το παρασκεύασμα να χρησιμοποιηθεί (α) για κατασκευή βιβλιοθήκης DNA, (β) για PCR, (γ) για ανίχνευση γονιδίων με υβριδισμό κατά Southern;
2. Ποιος είναι ο ρόλος του ρυθμιστικού διαλύματος TE;

Πειραματικό μέρος Ε:

3. Από την τιμή του λόγου  $A_{260nm}/A_{280nm}$  που προσδιορίσατε, τι συμπέρασμα προκύπτει για το παρασκεύασμα DNA;
4. Θα άλλαζε το φάσμα απορρόφησης υπεριώδους (220-300 nm) (α) εάν οι φωτομετρήσεις είχαν γίνει σε διάλυμα NaOH, 0.2 N, (β) εάν είχαν γίνει μετά από θερμική αποδιάταξη του DNA στους 94 °C, (γ) μετά από πλήρη διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών από νουκλεάσες;



# ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

## ΑΣΚΗΣΗ 6

### Γλυκόλυση: Μεταβολική τύχη πυροσταφυλικού

1. Ανίχνευση μεταβολικού ενδιάμεσου (πυροσταφυλικού) με αναστολή του ενζύμου πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση [σε κύτταρα ζυμομύκητα]
2. Προσδιορισμός ενεργότητας πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης με συζευγμένη αντίδραση αλκοολικής αφυδρογονάσης [σε κυτταρικό εκχύλισμα ζυμομονάδων]

Όνοματεπώνυμο φοιτητή

Υπογραφή επιβλέποντα



## **Γλυκόλυση - Μεταβολική τύχη πυροσταφυλικού**

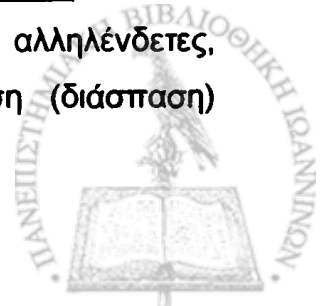
### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ**

Τα ένζυμα (οι βιολογικοί καταλύτες) ευνοούν τις ενζυμικές αντιδράσεις *κινητικά*, αλλά όχι *θερμοδυναμικά*. Για τον λόγο αυτό, αν και η δράση των ενζύμων επιτρέπει την διεξαγωγή πολλών αντιδράσεων στις σχετικά ήπιες συνθήκες περιβάλλοντος του ανθρώπινου οργανισμού και των άλλων βιολογικών συστημάτων, απομένουν πολλές ακόμη βιοχημικές αντιδράσεις που δεν θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν ως *θερμοδυναμικά* ασύμβατες. Για τις αντιδράσεις αυτές, απαιτείται συνεχής παροχή ενέργειας και συντονισμένη δράση πολλών ενζύμων ώστε να λειτουργεί ένα ολοκληρωμένο δίκτυο αντιδράσεων δέσμωσης, μετατροπής και αξιοποίησης ενέργειας (**μεταβολισμός**). Για παράδειγμα, ακόμη και σε ένα σχετικά απλό κύτταρο εντεροβακτηρίου λειτουργούν άνω των χιλίων ενζυμικών αντιδράσεων. Ο μηχανισμός με τον οποίο θερμοδυναμικά ασύμβατες αντιδράσεις γίνονται πραγματοποιήσιμες είναι η **σύζευξη αντιδράσεων** μέσω κοινών ενδιάμεσων μορίων ή μεταφερόμενων ομάδων (*coupled reactions*). Με τον τρόπο αυτό, θερμοδυναμικά ευνοούμενες "ωθούν" θερμοδυναμικά μη ευνοούμενες αντιδράσεις, ώστε η συνολική πορεία μιας συγκεκριμένης σειράς βιοχημικών αντιδράσεων να είναι πραγματοποιήσιμη, δηλ. η αθροιστική διαφορά ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G$ ) να έχει αρνητική τιμή.

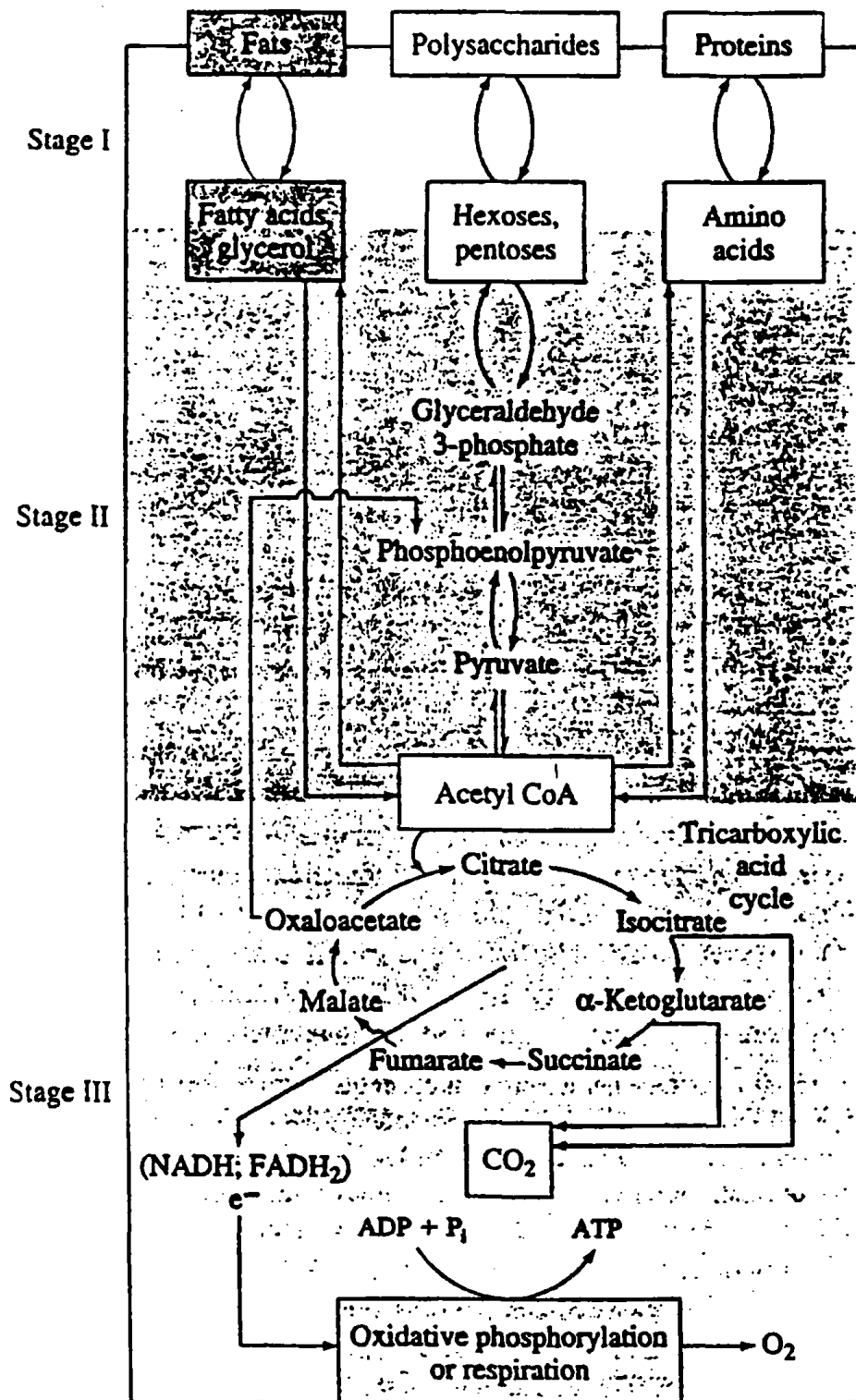
Οι γενικές μεταβολικές πορείες δέσμωσης και αξιοποίησης ενέργειας για τους περισσότερους έμβιους οργανισμούς είναι **όμοιες**. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πορεία της γλυκόλυσης. Επίσης χαρακτηριστική είναι η χρησιμοποίηση των "ενεργειακών ενδιάμεσων" ATP και NAD(P)H, από όλους τους οργανισμούς στον μηχανισμό της σύζευξης βιοχημικών αντιδράσεων (βλ. κατωτέρω).

#### **A. Μεταβολισμός**

Για διδακτικούς κυρίως λόγους, το σύνολο των μεταβολικών πορειών ομαδοποιούνται σε δύο κατηγορίες, καταβολισμό και αναβολισμό. Αν και καταβολισμός και αναβολισμός στο κύτταρο είναι διεργασίες αλληλένδετες, μία καταβολική πορεία οδηγεί συνολικά σε αποικοδόμηση (διάσπαση)



βιομορίων προς απλούστερα μόρια, με οξείδωση μεταβολιτών, σχηματισμό ανηγμένων συμπαραγόντων (NADH, NADPH, FADH<sub>2</sub>) και απόδοση ελεύθερης ενέργειας που χρησιμοποιείται για φωσφορυλίωση του ADP προς



Εικόνα 6.1. Τα τρία στάδια καταβολισμού κατά Η. Krebs [από R. Boyer, Concepts in Biochemistry, Brooks/Cole Publishing, New York, 1999]



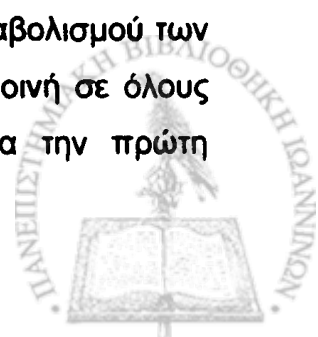
ATP. Μια αναβολική πορεία, αντίθετα, οδηγεί σε σύνθεση βιομορίων, με αναγωγή μεταβολιτών, σχηματισμό οξειδωμένων συμπαραγόντων ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}$ ) και *κατανάλωση* ελεύθερης ενέργειας προερχόμενης από διάσπαση (αποφωσφορυλίωση) του ATP. Δεν είναι βέβαια όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής ή αντιδράσεις μεταφοράς φωσφορικών ομάδων (βλ. Άσκηση 2, Εισαγωγή στα ένζυμα). Επομένως, αναβολικές ή καταβολικές δεν μπορούν να χαρακτηρισθούν μεμονωμένες αντιδράσεις αλλά μόνον συγκεκριμένες σειρές (*πορείες*) αντιδράσεων που έχουν τα αντίστοιχα γνωρίσματα.

Από θερμοδυναμική σκοπιά, ο μεταβολισμός αποτελεί διεργασία ενεργειακών μετατροπών όπου οι καταβολικές πορείες συνεχώς παράγουν ενέργεια που χρησιμοποιείται στις αναβολικές πορείες. Αυτή η μεταφορά ενέργειας, δηλ. σύζευξη μεταξύ καταβολικών και αναβολικών πορειών, επιτυγχάνεται μέσω της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μορίου που είναι γνωστό και ως "ενεργειακό νόμισμα" του κυττάρου (energy currency).

Συμβατικά, εξάλλου, διακρίνουμε το σύνολο των αντιδράσεων του καταβολισμού (και, αντίστοιχα, του αναβολισμού) σε τρία στάδια (Εικόνα 6.1). Στο πρώτο στάδιο καταβολισμού (υδρολυτική διάσπαση μακρομορίων σε μικρομόρια, όπως γλυκόζη) δεν παράγονται "χρήσιμα" ενεργειακά ενδιάμεσα, όπως  $\text{NADH}$  και ATP. Στο δεύτερο στάδιο, τα μικρομόρια (όπως γλυκόζη) οξειδώνονται προς απλούστερους μεταβολίτες (όπως, κυρίως, το ακετυλο-συνένζυμο A) με ταυτόχρονη μικρή παραγωγή  $\text{NADH}$  και ATP. Στο τρίτο στάδιο, το οποίο απαιτεί αερόβιες συνθήκες, το ακετυλο-συνένζυμο A μεταφέρει ακετυλομάδες στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλο Krebs) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται πλήρης οξείδωση προς  $\text{CO}_2$ . Συγχρόνως, παράγεται αναγωγικό δυναμικό ( $\text{NADH}$  και  $\text{FADH}_2$ ) που χρησιμοποιείται μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας (Άσκηση 6) για παραγωγή ATP.

## **B. Γλυκόλυση**

Η καταβολική πορεία της γλυκόλυσης (σειρά αντιδράσεων που μετατρέπει την γλυκόζη σε πυροσταφυλικό) είναι η σημαντικότερη πορεία καταβολισμού των υδατανθράκων (δεύτερο στάδιο στην Εικόνα 6.1), εξελικτικά κοινή σε όλους σχεδόν τους έμβιους οργανισμούς. Πρόκειται ιστορικά για την πρώτη



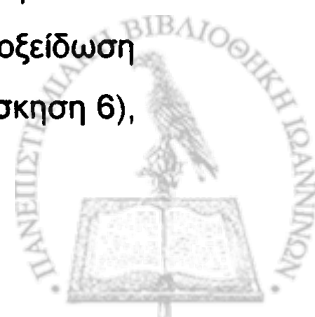
βιοχημική πορεία αντιδράσεων που διερευνήθηκε, εκκινώντας από τις παρατηρήσεις των Buchner και Buchner (1892) και των Harden και Young (1905) σε κυτταρικά εκχυλίσματα ζυμομυκήτων και την ανάλυση των χημικών αντιδράσεων της γλυκολυτικής πορείας κατά Embden και Meyerhof σε εκχυλίσματα μυϊκού ιστού θηλαστικών (δεκαετία 1930-1940). Ενεργειακό κέρδος για το κύτταρο από την βιοχημική πορεία της γλυκόλυσης είναι η ταχεία παραγωγή ATP για την κάλυψη των άμεσων αναγκών σε ενέργεια (υπό αναερόβιες συνθήκες), καθώς και η παραγωγή αναγωγικού δυναμικού με τη μορφή NADH, το οποίο επίσης μπορεί να αξιοποιηθεί ενεργειακά για παραγωγή ATP (υπό αερόβιες συνθήκες) μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας.

Για διδακτικούς λόγους, η πορεία της γλυκόλυσης (Embden-Meyerhof) διακρίνεται σε 2 στάδια των 5 αντιδράσεων, το στάδιο "επένδυσης σε ενέργεια" (κατά το οποίο δεν αποδίδονται αλλά καταναλώνονται 2 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης) και το στάδιο "ενεργειακού κέρδους" (κατά το οποίο παράγονται 2 μόρια NADH και 4 μόρια ATP ανά αρχικό μόριο γλυκόζης) (Εικόνα 6.2). Η καθαρή απόδοση είναι 2 μόρια **ATP** (από φωσφορυλίωση ADP), 2 μόρια **NADH** (από αναγωγή  $\text{NAD}^+$ ) και 2 μόρια **πυροσταφυλικού**, ανά μόριο γλυκόζης.

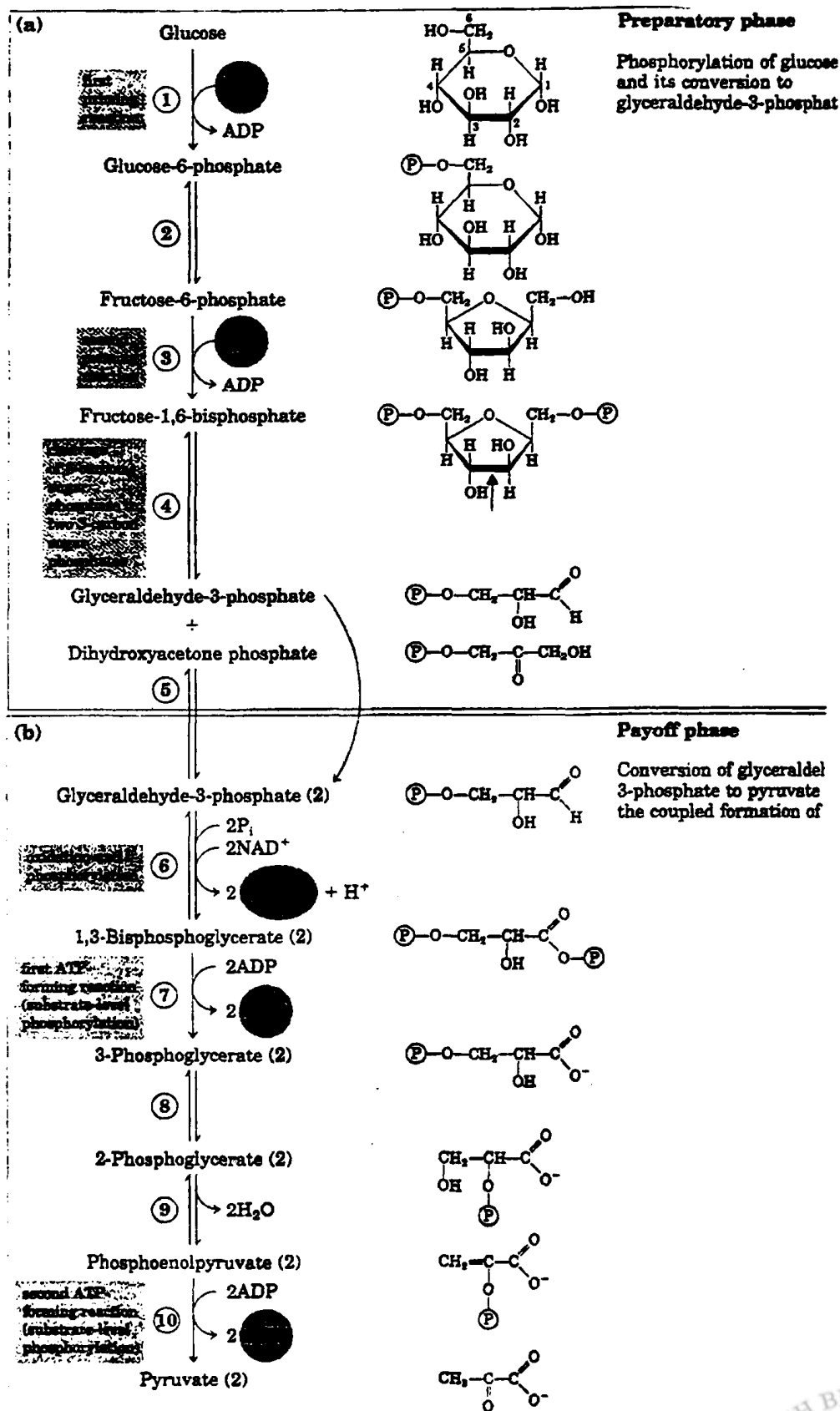
### Γ. Μεταβολική τύχη πυροσταφυλικού (pyruvate)

Αν και η καταβολική πορεία μετατροπής της γλυκόζης προς πυροσταφυλικό είναι εξελικτικά συντηρημένη, η μεταβολική τύχη του πυροσταφυλικού διαφέρει ανάλογα με τον τύπο οργανισμού και την διαθεσιμότητα οξυγόνου. Ουσιαστικά, η τύχη του πυροσταφυλικού, συνδέεται με τον μηχανισμό επανοξειδωσης του NADH (δηλ. ανακύκλισης των μορίων  $\text{NAD}^+$  για την επαναλειτουργία της γλυκόλυσης), ο οποίος διαφέρει σε κάθε μία από τις αντίστοιχες περιπτώσεις.

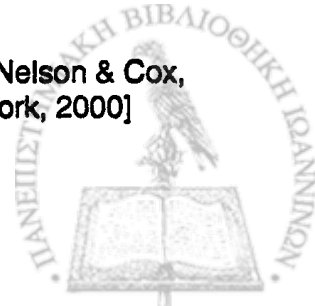
Υπό **αερόβιες συνθήκες**, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται με οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση προς ακετυλο-συνένζυμο Α και εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (*κύκλο του Krebs*). Η αντίδραση καταλύεται από το πολυενζυμικό σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, η οποία ανάγει  $\text{NAD}^+$  και παράγει επιπρόσθετα μόρια NADH. Τελικά, η επανοξειδωση των μορίων NADH γίνεται μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας (βλ. Άσκηση 6),



δηλ. μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων προς το μοριακό οξυγόνο η οποία συζεύγνυται με επιπρόσθετη παραγωγή ενεργειακού δυναμικού (ATP).

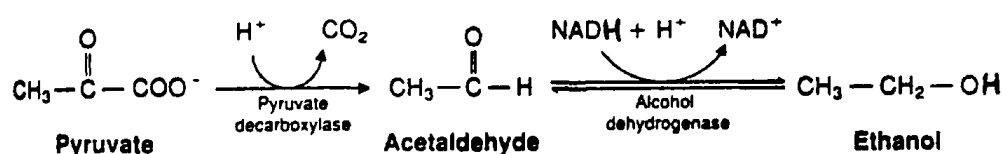


Εικόνα 6.2. Αντιδράσεις της γλυκόλυσης Embden-Meyerhof [από Nelson & Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, Worth Publishers, New York, 2000]





Υπό αναερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό είναι δυνατόν να μετατρέπεται (α) με αναγωγή προς γαλακτικό (γαλακτική ζύμωση), από την γαλακτική αφυδρογονάση (π.χ. στα μυϊκά κύτταρα των θηλαστικών, ή στα λακτοβακτήρια) ή (β) με αποκαρβοξυλίωση και, στη συνέχεια, αναγωγή προς αιθανόλη (αλκοολική ζύμωση), από τη συζευγμένη δράση πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης και αλκοολικής αφυδρογονάσης (π.χ. στους ζυμομύκητες και άλλους προαιρετικά- ή και υποχρεωτικά-αναερόβιους μικροοργανισμούς) (Εικόνα 6.3). Και στις δύο περιπτώσεις, η αντίστοιχη αντίδραση αναγωγής είναι συζευγμένη με επανοξείδωση του NADH η οποία αποδίδει NAD<sup>+</sup> για την άμεση επαναλειτουργία της γλυκόλυσης.



Εικόνα 6.3. Μεταβολική τύχη του πυροσταφυλικού κατά την αλκοολική ζύμωση

#### Δ. Παραδείγματα πειραματικής μελέτης μιας μεταβολικής πορείας

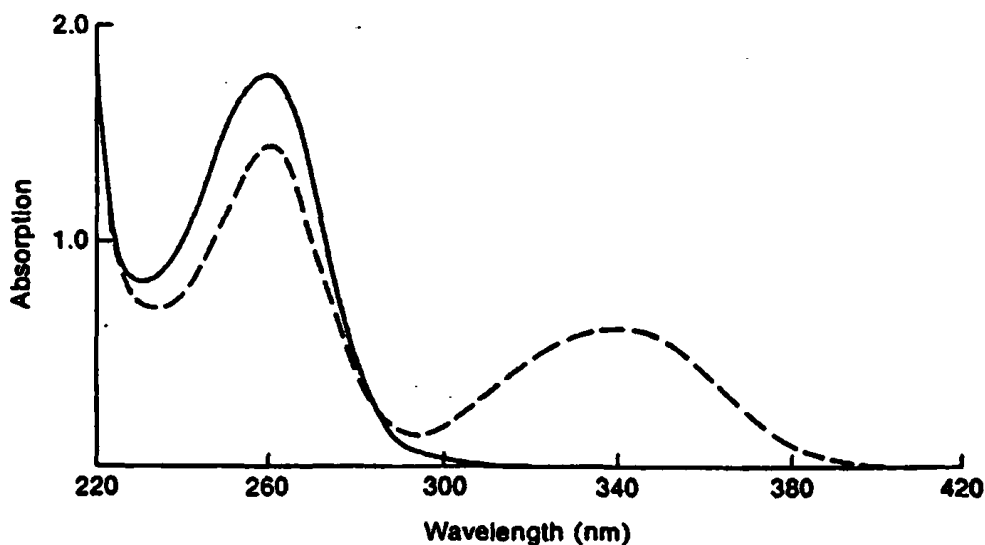
Στο Πειραματικό μέρος που ακολουθεί, θα αναφερθούμε σε ανίχνευση ενός μεταβολικού ενδιαμέσου (πυροσταφυλικό) και ενός ενζύμου του μεταβολισμού (πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση). Ως οργανισμοί μελέτης θα χρησιμοποιηθούν ο σακχαρομύκητας (μέρος Α) και η ζυμομονάδα (ένα αναερόβιο αιθανολοπαραγωγό βακτήριο) (μέρος Β).

Στο μέρος Α, θα γίνει ανίχνευση πυροσταφυλικού με αναστολή του ενζύμου πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (Εικόνα 6.3) in vino, σε αλκαλικό pH. Η ενζυμική αναστολή οδηγεί σε **συσσώρευση του μεταβολικού ενδιαμέσου** (πυροσταφυλικού) το οποίο ανιχνεύεται με αναλυτική χημική αντίδραση (αντίδραση νιτροπρωσσικού νατρίου).

Στο μέρος Β, θα γίνει προσδιορισμός της ενεργότητας πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης με **συνεχή απομάκρυνση του ενδιαμέσου προϊόντος** (ακεταλδεύδης). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της συζευγμένης αντίδρασης αλκοολικής αφυδρογονάσης (Εικόνα 6.3) η οποία καταλήγει στο τελικό προϊόν



(αιθανόλη). Η πειραματική αυτή δοκιμασία γίνεται σε κυτταρικό εκχύλισμα, με προσθήκη πυροσταφυλικού, NADH και (περίσσειας) αλκοολικής αφυδρογονάσης. Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθείται φωτομετρικά από την μείωση της απορρόφησης στα 340 nm που αντιστοιχεί στην έκταση οξειδωσης του NADH (Εικόνα 6.4).



**Εικόνα 6.4.** Φάσματα απορρόφησης των NAD<sup>+</sup> (συνεχής γραμμή) και NADH (διακεκομμένη) [από Switzer and Garrity, *Experimental Biochemistry*, Freeman & Co., New York, 1999]

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A. Ανίχνευση πυροσταφυλικού σε κύτταρα ζυμομύκητα

1. Σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται, αντίστοιχα, 5 ml διαλύματος 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.5 (αλκαλικό περιβάλλον) (σωλήνας A) και 5 ml διαλύματος 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.5 (όξινο περιβάλλον) (σωλήνας B). Στον κάθε σωλήνα προστίθενται υπό ανάδευση 5 g ζύμης (μαγιάς αρτοποιείας) (δηλ. κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*, ζυμομύκητα) και, στη συνέχεια, 5 ml υδατικού διαλύματος 1% γλυκόζης (δηλ. θρεπτικού υλικού). Ακολουθεί επώαση της κυτταρικής καλλιέργειας στον θερμό θάλαμο (37 °C), 1h.

[Το μέρος αυτό της Άσκησης προετοιμάζεται από τους επιβλέποντες]

2. Προστίθενται 1 ml τριχλωροξικού οξέος (TCA) (20% v/v) και, μετά από έντονη ανάδευση, ακολουθεί φυγοκέντρηση (2500 rpm, 10 min). Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης για την ανίχνευση του πυροσταφυλικού.

3. Σε δύο νέους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν στερεό θειϊκό αμμώνιο (στιβάδα πάχους > 1 cm) προστίθενται 2 ml των υπερκειμένων του σταδίου 2.

[Τα επόμενα στάδια εκτελούνται στον απαγωγό]

4. Προστίθενται 5 σταγόνες (πρόσφατου) διαλύματος νιτροπρωσσικού νατρίου (5% w/v). Έντονη ανάδευση.

5. Προστίθενται (με προσοχή) 2 ml πυκνής αμμωνίας. Ηπια ανάδευση. Κατά την προσθήκη αμμωνίας, ο σωλήνας κρατείται υπό κλίση ώστε να σχηματισθούν δύο στιβάδες. Παρουσία πυροσταφυλικού, εμφανίζεται δακτύλιος κυανού-πρασίνου χρώματος στη μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο στιβάδων (μετά πάροδο χρόνου 10-15 min).

#### **B: Ανίχνευση ενεργότητας πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης σε κυτταρικό εκχύλισμα ζυμομονάδων**

1. Κυτταροκαλλιέργεια (50 ml) του βακτηρίου *Zygomonas mobilis* (ζυμομονάδα) επωάζεται υπό αναερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες στους 30 °C, σε υγρό θρεπτικό υλικό (Zymo Broth) που περιέχει 0.5% (w/v) εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract), 0.1% (w/v) θειϊκού αμμωνίου, 0.1% (w/v) δισόξινου φωσφορικού καλίου, 0.05% (w/v) θειϊκού μαγνησίου και 2% (w/v) γλυκόζης. Τα κύτταρα συλλέγονται κατά το μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (σε οπτική πυκνότητα καλλιέργειας 0.3-0.4, στα 600 nm), με φυγοκέντρηση. Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, 0.02 M, pH 7.5 (1 ml).

2. Ομοιογενοποίηση σε σφαιρόμυλο (Mini-BeadBeater, Biospec Products) με υάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 0.15 mm. Αραίωση σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος, φυγοκέντρηση για απομάκρυνση των κυτταρικών



καταλοίπων (14000 rpm, 5 min) και παραλαβή του υπερκειμένου, το οποίο θα αναφέρεται ως "κυτταρικό εκχύλισμα"

[Τα δύο ανωτέρω στάδια προετοιμάζονται από τους επιβλέποντες]

3. Για τη μέτρηση της ενεργότητας πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

	(όγκοι σε ml)		
ρυθμιστικό διάλυμα	1.87	1.67	1.64
NADH	0	0.2	0.2
πυροσταφυλικό	0.5	0.5	0.5
χλωριούχο μαγνήσιο	0.1	0.1	0.1
EC 1.1.1.1	0.025	0.025	0.025
κυτταρικό εκχύλισμα	0	0	0.03

**επώαση, 30 min, θερμοκρασία δωματίου**

[Το τρίτο δείγμα φωτομετρείται μετά πάροδο 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30 min]

$A_{340 \text{ nm}}$

Ρυθμιστικό διάλυμα = διάλυμα  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , 0.02 M, pH 7.5, NADH = (πρόσφατο) διάλυμα NADH, 1.28 mM, σε ρυθμιστικό διάλυμα (ως άνω), πυροσταφυλικό = διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου, 0.025 M, σε ρυθμιστικό διάλυμα (ως άνω), χλωριούχο μαγνήσιο = διάλυμα  $MgCl_2$ , 0.125 M, σε ρυθμιστικό διάλυμα (ως άνω), EC 1.1.1.1 = αλκοολική αφυδρογονάση, 400 U / ml, σε ρυθμιστικό διάλυμα (ως άνω), κυτταρικό εκχύλισμα = εκχύλισμα κυττάρων ζυμομονάδας (σταδίου 2, ανωτέρω) μετά από κατάλληλη αραίωση στο ρυθμιστικό διάλυμα [αραίωση από 1:1 (v/v) ως 1:10 (v/v)], όπως καθορίζεται προκαταρκτικά από τους επιβλέποντες]

Σημείωση: Στο πρώτο κατά σειρά δείγμα, θα ληφθεί η "μηδενική" μέτρηση (τυφλό) που αντιστοιχεί σε μηδενική συγκέντρωση NADH. Στο δεύτερο κατά σειρά δείγμα (χωρίς προσθήκη κυτταρικού εκχυλίσματος) θα ληφθεί η "μέγιστη" μέτρηση, που αντιστοιχεί σε 0.15 mM NADH (ολική συγκέντρωση προστιθέμενου NADH). Για το τρίτο κατά σειρά δείγμα λαμβάνονται διαδοχικές μετρήσεις σε συγκεκριμένους χρόνους επώασης, όπως περιγράφεται στον πίνακα του πρωτοκόλλου.



4. Από τα δεδομένα θα κατασκευασθεί

(α) διάγραμμα της οπτικής πυκνότητας ( $A_{340 \text{ nm}}$ ) συναρτήσει του χρόνου

(β) διάγραμμα του οξειδούμενου NADH (ή παραγόμενου  $\text{NAD}^+$ ) (σε  $\mu\text{mol}$ ) συναρτήσει του χρόνου

5. Από το (αρχικό) γραμμικό τμήμα της γραφικής παράστασης (β) θα υπολογισθεί η ενεργότητα πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης σε  $\mu\text{mol}$  οξειδούμενου NADH (ή παραγόμενου  $\text{NAD}^+$ ) ανά  $\text{min}$ .



## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ

Πειραματικό μέρος Β:

Χρόνος επώασης (min)	$A_{340\text{ nm}}$	[NADH] (mM)
0 (μέγιστη συγκέντρωση NADH)		0.15
0.5		
1		
2		
3		
5		
10		
15		
20		
30		

(οι τιμές της τρίτης στήλης, [NADH] (mM), θα υπολογισθούν βάσει της τιμής  $A_{340\text{ nm}}$  χρόνου 0, που αντιστοιχεί στη μέγιστη συγκέντρωση, 0.15 mM)

Πειραματικό μέρος Β-Β4:

Χρόνος (min)	[NADH] (mM)	NADH ( $\mu\text{mol}$ )	NAD <sup>+</sup> ( $\mu\text{mol}$ )
0	0.15	0.375	0
0.5			
1			
2			
3			
5			
10			
15			
20			
30			

(οι τιμές του παραγόμενου NAD<sup>+</sup> ( $\mu\text{mol}$ ), υπολογίζονται βάσει της απόκλισης της εκάστοτε τιμής NADH ( $\mu\text{mol}$ ) από την μέγιστη, δηλ. την 0.375  $\mu\text{mol}$ )



## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Πειραματικό μέρος Β-Β3-Β4:

Διάγραμμα προόδου της αντίδρασης πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης, από τη μείωση της οπτικής πυκνότητας στα 340 nm ( $A_{340 \text{ nm}}$  συναρτήσει του χρόνου)

Διάγραμμα προόδου της αντίδρασης πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης, από την αύξηση της ποσότητας προϊόντος ( $\mu\text{mol NAD}^+$  συναρτήσει του χρόνου)

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Πειραματικό μέρος Β-Β5:

Ενεργότητα πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (σε  $\mu\text{mol NAD}^+$  ανά min, U)

Ενεργότητα πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης στο κυτταρικό εκχύλισμα (σε U ανά ml εκχυλίσματος)



## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΠΕΔΩΣΗΣ

Πειραματικό μέρος Α:

1. Πώς εμπλέκεται το ένζυμο πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση στην διαδικασία ανίχνευσης πυροσταφυλικού στον ζυμομύκητα; Σε ποιόν από τους δύο σωλήνες ανιχνεύθηκε συσσώρευση πυροσταφυλικού και γιατί;
2. Θα μπορούσε η ανίχνευση της συσσώρευσης πυροσταφυλικού να στηριχθεί σε θερμική απενεργοποίηση του αντίστοιχου ενζύμου, και γιατί;

Πειραματικό μέρος Β:

3. Θα ήταν δυνατόν τα πειράματα που εξετάζονται στην Άσκηση 6 να είχαν γίνει με κύτταρα μυϊκού ιστού; Αιτιολογείστε.
4. Κατά την εξέλιξη της μέτρησης πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης, η τιμή  $A_{340}$  μειώνεται αρχικά με ταχύ ρυθμό, στη συνέχεια μειώνεται με μικρότερη ταχύτητα και τελικά σταθεροποιείται σε χαμηλά επίπεδα, χωρίς να καταλήγει στο μηδέν. Επιβεβαιώνεται το σενάριο αυτό από τα πειραματικά σας αποτελέσματα; Για ποιο λόγο η τιμή απορρόφησης δεν καταλήγει στο μηδέν;





# ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

## ΑΣΚΗΣΗ 7

### Αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων: Αναπνευστική αλυσίδα

1. Ανίχνευση μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας με δείκτες οξειδοαναγωγής (σε παρασκεύασμα ήπατος επίμυος)
2. Υποστρώματα και αναστολείς της αναπνευστικής αλυσίδας

Όνοματεπώνυμο φοιτητή

Υπογραφή επιβλέποντα



## **Αναπνευστική αλυσίδα**

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ**

Όπως αναφέρθηκε στην Άσκηση 6, η πορεία της γλυκόλυσης οδηγεί σε πυροσταφυλικό, το οποίο υπό αερόβιες συνθήκες οξειδώνεται πλήρως προς  $\text{CO}_2$  μέσω του κύκλου του Krebs. Ωστόσο, ένα μεγάλο μέρος της δυνητικά αξιοποιήσιμης από το κύτταρο χημικής ενέργειας παραμένει "εγκλωβισμένο" στη μορφή των  $\text{NADH}$  και  $\text{FADH}_2$  (αναγωγικού δυναμικού) (electron-transfer potential). Η ενέργεια αυτή αξιοποιείται πλήρως μόνο με την μεταφορά της στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (respiratory chain), μέσω της οποίας παράγεται η ενεργειακά "εύχρηστη" μορφή του ATP (φωσφορυλιωτικού δυναμικού) (phosphate-transfer potential).

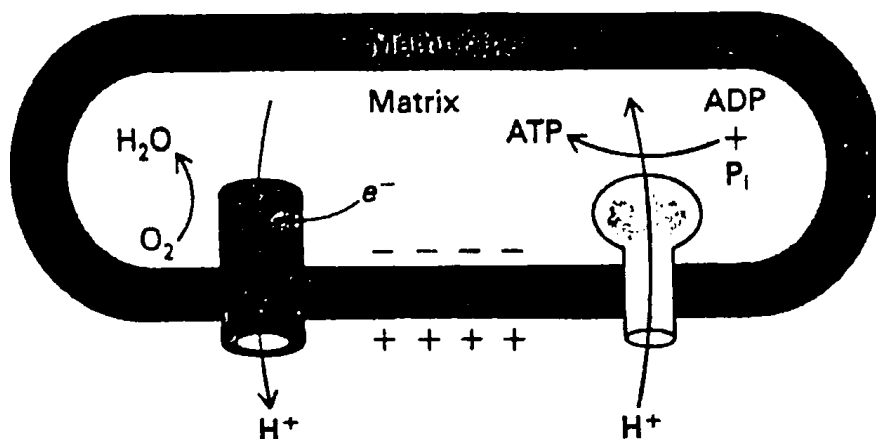
Συγκεκριμένα, το αναγωγικό δυναμικό που παράγεται από την πορεία της γλυκόλυσης (2 μόρια  $\text{NADH}$  ανά αρχικό μόριο γλυκόζης), από την μετατροπή του πυροσταφυλικού προς ακετυλο-συνένζυμο Α (2 μόρια  $\text{NADH}$  ανά αρχικό μόριο γλυκόζης), από τον κύκλο του Krebs (6 μόρια  $\text{NADH}$  και 2 μόρια  $\text{FADH}_2$  ανά αρχικό μόριο γλυκόζης), αλλά και από την β-οξείδωση των λιπαρών οξέων ( $n-1$  μόρια  $\text{NADH}$  και  $n-1$  μόρια  $\text{FADH}_2$  ανά μόριο λιπαρού οξέος με 2n άτομα άνθρακα) αξιοποιείται ενεργειακά μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας (μιας αλυσίδας οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων με τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων το μοριακό οξυγόνο) για παραγωγή ATP. Η οξείδωση των μορίων  $\text{NADH}$  και  $\text{FADH}_2$  μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας είναι πάντοτε συζευγμένη με την φωσφορυλίωση του ADP προς ATP (οξειδωτική φωσφορυλίωση): αποδίδονται 2.5 μόρια ATP ανά μόριο επανοξειδούμενου  $\text{NADH}$ , και 1.5 μόρια ATP ανά μόριο επανοξειδούμενου  $\text{FADH}_2$ .

#### **A. Οξειδωτική φωσφορυλίωση**

Πώς γίνεται η σύζευξη μεταξύ οξείδωσης (του  $\text{NADH}$  ή του  $\text{FADH}_2$ ) και φωσφορυλίωσης (του ADP προς ATP) στην αναπνευστική αλυσίδα; Η ικανοποιητικότερη απάντηση έχει δοθεί από τον Peter Mitchell (χημειοσμωτική υπόθεση, 1961): Θεωρείται ότι κατά την πορεία των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (α) υπάρχουν θέσεις μορίων της αναπνευστικής αλυσίδας όπου



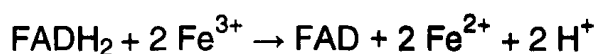
πρωτόνια εξωθούνται προς τον χώρο μεταξύ των δύο μιτοχονδριακών μεμβρανών, δημιουργώντας μία **διαβάθμιση πρωτονίων** εκατέρωθεν της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (proton electrochemical gradient) και **(β)** η διαβάθμιση πρωτονίων λειτουργεί ως "κινητήριος δύναμη" για τη σύνθεση ATP από μία μιτοχονδριακή μεμβρανική πρωτεΐνη, την  $H^+$ -ATPάση (ή ATP συνθάση, γνωστή σήμερα και ως  **$F_0F_1$ -ATPάση**). Η ανωτέρω χημειοσμωτική θεωρία του P. Mitchell (Εικόνα 7.1) υποστηρίζεται από πολλά ερευνητικά δεδομένα. Για παράδειγμα, ιονοφόρα μόρια που λειτουργούν ως μεταφορείς πρωτονίων εκατέρωθεν της μεμβράνης (δηλ. *δεν επιτρέπουν* την δημιουργία της διαβάθμισης πρωτονίων) έχει δειχθεί ότι προκαλούν αποσύζευξη μεταξύ οξειδοαναγωγικής αλυσίδας και σύνθεσης ATP, ενώ, αντίστροφα, η σύνθεση ATP μπορεί να επιτευχθεί σε απομονωμένα μιτοχόνδρια με εφαρμογή εναλλακτικών τρόπων δημιουργίας της διαβάθμισης πρωτονίων *χωρίς να λειτουργεί η αναπνευστική αλυσίδα*. Εξάλλου, η πρωτεΐνη  $F_0F_1$ -ATPάση που είναι υπεύθυνη για την χημειοσμωτική σύζευξη έχει μελετηθεί διεξοδικά με κρυσταλλογραφική ανάλυση (John Walker, Nobel Prize 1997). Η χημειοσμωτική σύζευξη μέσω της  $F_0F_1$ -ATPάσης γνωρίζουμε σήμερα ότι αντιπροσωπεύει έναν γενικότερο μηχανισμό μετατροπής ενέργειας που είναι εξελικτικά συντηρημένος στα περισσότερα βιολογικά συστήματα και δεν λειτουργεί μόνο στα μιτοχόνδρια, αλλά και στους χλωροπλάστες και στις βακτηριακές κυτταροπλασματικές μεμβράνες.



**Εικόνα 7.1.** Χημειοσμωτική σύζευξη μεταξύ οξειδοαναγωγικής αλυσίδας και σύνθεσης ATP (οξειδωτική φωσφορυλίωση) (matrix, μιτοχονδριακή ουσία) [από L. Stryer, Biochemistry, Freeman & Co., San Francisco, CA, 1988]

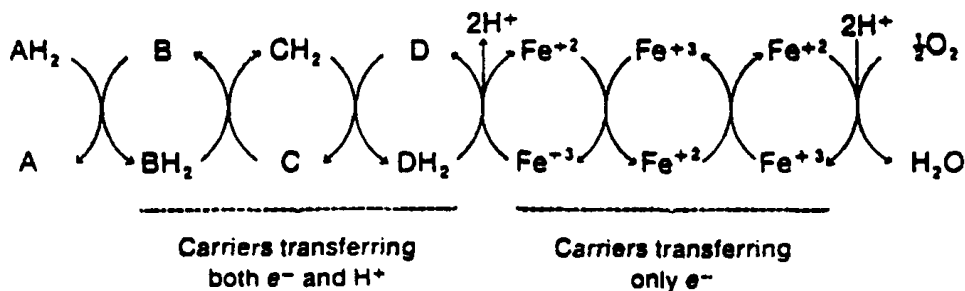


Στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, εξώθηση πρωτονίων που συνεισφέρει στην δημιουργία της ηλεκτροχημικής διαβάθμισης έχει δειχθεί ότι γίνεται σε τρεις συγκεκριμένες μοριακές θέσεις (NADH-αναγωγάσης του συνενζύμου Q, κυτοχρωμικής αναγωγάσης, και κυτοχρωμικής οξειδάσης). Στις θέσεις αυτές (Εικόνα 7.1), η λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων θεωρείται ότι προκαλεί αλλαγή διαμόρφωσης των αντίστοιχων μεμβρανικών πρωτεϊνών ώστε ζεύγη πρωτονίων προερχόμενα από το μόριο-δότη (π.χ.  $\text{FADH}_2$ ) να εξωθούνται προς το εξωτερικό της μεμβράνης. Τα αντίστοιχα ζεύγη ηλεκτρονίων που αποδίδονται κατά την οξείδωση  $\text{FADH}_2 \rightarrow \text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$  χρησιμοποιούνται για την αναγωγή ενός μορίου-δέκτη που λειτουργεί ως αμιγής μεταφορέας ηλεκτρονίων (π.χ.  $\text{Fe}^{3+}\text{-S}$ ), με τελική αντίδραση οξειδοαναγωγής την



## B. Αναπνευστική αλυσίδα

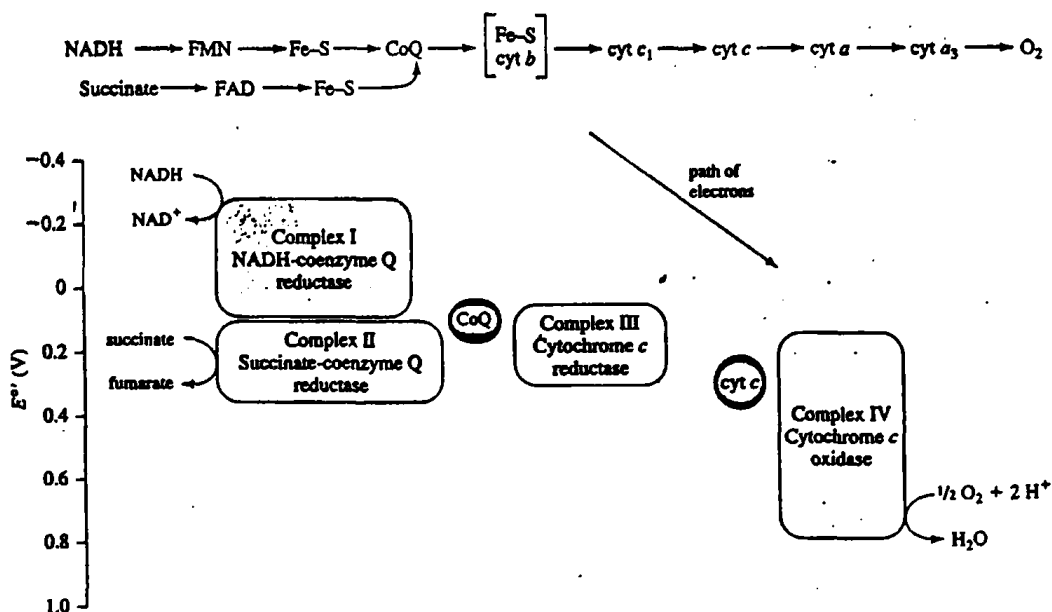
Η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα περιλαμβάνει την **μεταφορά ηλεκτρονίων** με διαδοχική αναγωγή μιας σειράς μορίων που μπορεί να είναι είτε μεταφορείς πρωτονίων-ηλεκτρονίων (π.χ.  $\text{FAD}$ ) είτε αμιγείς μεταφορείς ηλεκτρονίων (π.χ.  $\text{Fe-S}$ ) (Εικόνα 7.2). Υπόστρωμα της αναπνευστικής αλυσίδας, η οξείδωση του οποίου εισάγει ηλεκτρόνια (ή και πρωτόνια) σε ένα αρχικό μόριο της αλυσίδας, μπορεί να είναι ένα ενδιάμεσο του κύκλου του Krebs (π.χ. το ηλεκτρικό, που οξειδούμενο μεταφέρει ηλεκτρόνια στο  $\text{FAD}$ ) ή ανηγμένα μόρια (π.χ.  $\text{NADH}$ ) που παράγονται κατά τις μεταβολικές οξειδώσεις. Τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων είναι το **μοριακό οξυγόνο**.



Εικόνα 7.2. Απλοποιημένο σχεδιάγραμμα οξειδοαναγωγικής αλυσίδας [από Switzer and Garrity, Experimental Biochemistry, Freeman & Co., New York, 1999]



Η αλυσίδα αποτελείται από 4 πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα, NADH-αναγωγάση του συνενζύμου Q (με φορείς ηλεκτρονίων: FMN και Fe-S) (**σύμπλοκο I**), ηλεκτρικο-αναγωγάση του συνενζύμου Q (με φορείς ηλεκτρονίων: FAD και Fe-S) (**σύμπλοκο II**), αναγωγάση του κυτοχρώματος c (με φορείς ηλεκτρονίων: Fe-κυτοχρώματος b, Fe-S και Fe-κυτοχρώματος c<sub>1</sub>) (**σύμπλοκο III**), οξειδάση του κυτοχρώματος c (με φορείς ηλεκτρονίων: Cu<sub>A</sub>, Fe-κυτοχρώματος a, Cu<sub>B</sub> και Fe-κυτοχρώματος a<sub>3</sub>) (**σύμπλοκο IV**). Ως ενδιάμεσοι μεταφορείς ηλεκτρονίων λειτουργούν το **συνένζυμο Q** (ουμπικινόνη), μεταξύ των συμπλόκων I και III (ή συμπλόκων II και III), και το **κυτόχρωμα c**, μεταξύ των συμπλόκων III και IV (Εικόνα 7.3). Όταν ως υπόστρωμα της αλυσίδας χρησιμοποιείται το ηλεκτρικό (ή το FADH<sub>2</sub>), το σύμπλοκο I (μία από τις τρεις θέσεις σύζευξης που οδηγούν σε οξειδωτική φωσφορυλίωση) παρακάμπτεται [τελική απόδοση: 1.5 μόρια ATP ανά μόριο FADH<sub>2</sub>]. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιείται το NADH, παρακάμπτεται το σύμπλοκο II που δεν αποτελεί θέση χημειοσμητικής σύζευξης [τελική απόδοση: 2.5 μόρια ATP ανά μόριο NADH].



**Εικόνα 7.3.** Πρωτεϊνικά συμπλοκα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα [από R. Boyer, Concepts in Biochemistry, Brooks/Cole Publishing, New York, 1999]

Κεντρικό ρόλο στην αναπνευστική αλυσίδα (σύμπλοκα III και IV) έχουν τα κυτοχρώματα, δηλ. πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων που φέρουν μία προσθετική ομάδα αίμης (Fe<sup>3+/2+</sup>-πρωτοπορφυρίνης). Πρόκειται για τις



πρώτες πρωτεΐνες των οποίων έγινε αντιληπτός ο "αναπνευστικός" ρόλος (David Keilin, 1925). Η διάκριση των διαφορετικών κυτοχρωμάτων γίνεται με βάση το φάσμα απορρόφησης της αίμης, το οποίο διαφοροποιείται ανάλογα με τον τύπο του κυτοχρώματος, π.χ. το (ανηγμένο) κυτόχρωμα c εμφανίζει μέγιστα απορρόφησης στα 550, 520 και 415 nm ενώ το (ανηγμένο) κυτόχρωμα b εμφανίζει μέγιστα στα 564, 530 και 431 nm. Εξάλλου, χαρακτηριστικές είναι και οι διαφοροποιήσεις στα φάσματα απορρόφησης μεταξύ οξειδωμένων και ανηγμένων μορφών του κάθε κυτοχρώματος (ή άλλου μορίου-μεταφορέα ηλεκτρονίων). Με βάση τις διαφοροποιήσεις αυτές, είναι δυνατόν να παρακολουθήσει κανείς την επίδραση και να εντοπίσει τη θέση δράσης **αναστολέων** της αναπνευστικής αλυσίδας με **φασματοφωτομετρία**. Το αντιβιοτικό αντιμυκίνη Α, για παράδειγμα, που αναστέλλει τη ροή ηλεκτρονίων μεταξύ κυτοχρώματος b και ουμπικινόνης (σύμπλοκο III) οδηγεί σε συσσώρευση FMNH<sub>2</sub> (σύμπλοκο I) ή FADH<sub>2</sub> (σύμπλοκο II) και μετατόπιση του αντίστοιχου φάσματος προς την **ανηγμένη μορφή**, ενώ συγχρόνως μετατοπίζει το φάσμα των κυτοχρωμάτων a και a<sub>3</sub> (σύμπλοκο IV) προς την **οξειδωμένη μορφή**.

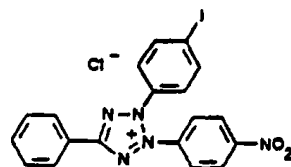
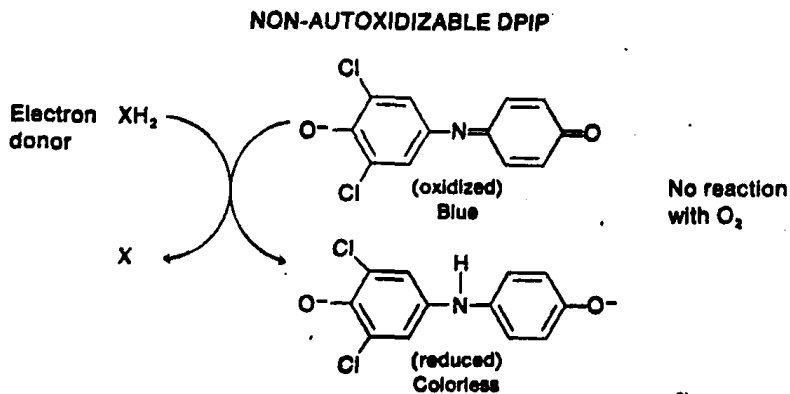
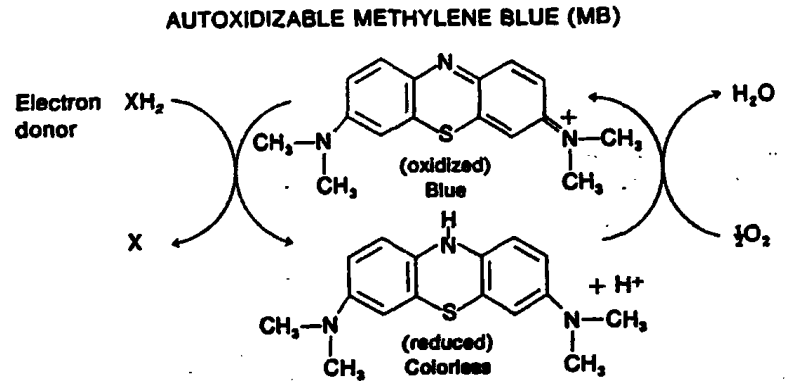
#### Γ. Πειραματική μέτρηση της μεταφοράς ηλεκτρονίων

Το βιολογικό παρασκεύασμα για την μέτρηση της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας μπορεί να είναι (α) ομοιογενοποίηση ιστού (κυτταρικό εκχύλισμα), (β) κλάσμα ακέραιων μιτοχονδρίων που περιλαμβάνει όλα τα ένζυμα του κύκλου του Krebs και της β-οξειδωσης λιπαρών οξέων καθώς και το πλήρες σύστημα της αναπνευστικής αλυσίδας, ή (γ) παρασκεύασμα μιτοχονδριακών **μεμβρανών** (όπως το παρασκεύασμα μυοκαρδίου κατά Keilin και Hartree, 1947), όπου η αναπνευστική αλυσίδα τροφοδοτείται "εξωγενώς" με κατάλληλα υποστρώματα (π.χ. ενδιάμεσα του κύκλου του Krebs, όπως το ηλεκτρικό ή το μηλικό).

Αν και η μέτρηση της μεταφοράς ηλεκτρονίων μπορεί να γίνει απευθείας με μανόμετρο (αναπνευστόμετρο Warburg) που μετρά την κατανάλωση οξυγόνου (τελικού αποδέκτη ηλεκτρονίων της αλυσίδας), ένας απλούστερος τρόπος είναι αυτός που χρησιμοποιεί **οξειδοαναγωγικούς δείκτες**. Πρόκειται για οργανικές χρωστικές ουσίες που μπορούν να



αντικαταστήσουν το μοριακό οξυγόνο ως τελικοί δέκτες ηλεκτρονίων. Κατά την αναγωγή τους παρατηρείται έντονη αλλαγή χρώματος η οποία μπορεί να παρακολουθηθεί φωτομετρικά. Δύο μόρια του τύπου αυτού είναι η 2,6-διχλωρο-φαινυλ-ινδοφαινόλη (κυανού της ινδοφαινόλης) (DPIP) και το 2-(4-ιωδοφαινυλ)-3-(4-νιτροφαινυλ)-5-φαινυλτετραζόλιο (ιώδες του τετραζολίου) (INT). Τα μόρια αυτά δεν είναι "αυτοοξειδούμενα" (δηλ. δεν επανοξειδώνονται

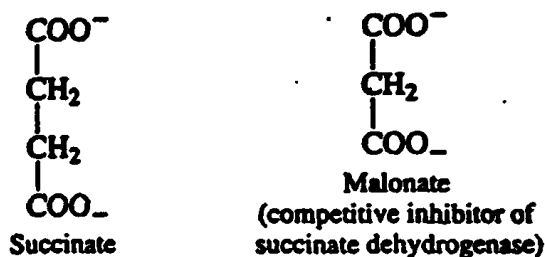
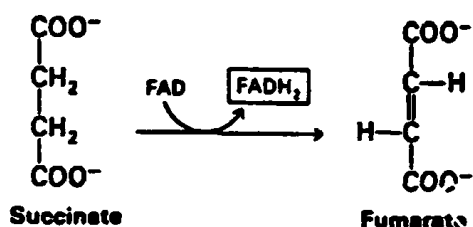


**Εικόνα 7.4.** Κυανού του μεθυλενίου (MB) (άνω), κυανού της ινδοφαινόλης (DPIP) (μέσον) και ιώδες του ιωδονιτροτετραζολίου (οξειδωμένη μορφή) (INT) (κάτω) (autoxidizable, αυτοοξειδούμενο, oxidized, οξειδωμένο, reduced, ανηγμένο, electron donor, ηλεκτρονιοδότης) [από Switzer and Garrity, Experimental Biochemistry, Freeman & Co., New York, 1999, R. P. Haugland, Molecular Probes Handbook, 1998]



από το μοριακό οξυγόνο), και επομένως είναι εύχρηστα ως δείκτες μεταφοράς ηλεκτρονίων σε αερόβιες συνθήκες. Άλλοι δείκτες, που είναι "αυτοοξειδούμενοι", όπως π.χ. το κυανού του μεθυλενίου (MB), δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν υπό αερόβιες συνθήκες. Οι 3 ανωτέρω αναφερόμενοι δείκτες οξειδοαναγωγής θα χρησιμοποιηθούν στο Πειραματικό μέρος της Άσκησης (Εικόνα 7.4).

Για την ανίχνευση της μεταφοράς ηλεκτρονίων στο Πειραματικό μέρος που ακολουθεί, χρησιμοποιούνται (α) ως βιολογικό υλικό ομοιογενοποίηση ήπατος επίμυος, (β) ως υπόστρωμα της αναπνευστικής αλυσίδας το ηλεκτρικό, που αποτελεί υπόστρωμα για το σύμπλοκο II (ηλεκτρική αφυδρογονάση) (Εικόνα 7.3), και (γ) ως αναστολείς της αναπνευστικής αλυσίδας το μηλονικό (σύμπλοκο II) (Εικόνα 7.5), η αντιμυκίνη Α (σύμπλοκο III) ή το κυανιούχο κάλιο (σύμπλοκο IV).



Εικόνα 7.5. Αντίδραση ηλεκτρικής αφυδρογονάσης, ηλεκτρικό (succinate) και μηλονικό (malonate).



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A. Ανίχνευση μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα μέσω της αντίδρασης ηλεκτρικής αφυδρογονάσης

[Το βιολογικό παρασκεύασμα προετοιμάζεται από τους επιβλέποντες]

Παραλαμβάνεται ήπαρ αρσενικού επίμουσ *Rattus norvegicus* (ποικιλίας Wistar), ηλικίας 30-60 ημερών, τεμαχίζεται και εκπλένεται σε ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (0.02 M), pH 7.5, που περιέχει Na<sub>2</sub>EDTA (1 mM). Ακολουθεί εναιώρηση σε 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου (0.2 M), pH 7.5, Na<sub>2</sub>EDTA (1 mM), ανά g ιστού, και υγρή ομοιογενοποίηση σε συσκευή Polytron PT1200 (Kinematica AG). Το ομοιογενοποίημα διηθείται από τετραπλή γάζα και χρησιμοποιείται εντός διημέρου (κατά το οποίο φυλάσσεται σε θερμοκρασία υγρού πάγου).

#### A1. Δείκτης DPIP (κυανού της ινδοφαινόλης)

Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

	(όγκοι σε ml)				
ρυθμιστικό διάλυμα	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
μηλονικό	0	0	0	0.1	0
αντιμυκίνη A	0	0	0	0	0.02
DPIP	0	0.2	0.2	0.2	0.2
απεσταγμένο ύδωρ	2	1.8	1.8	1.7	1.78
ομοιογενοποίημα (1:1)	0.1	0.1	0.1*	0.1	0.1
επώαση, 10 min, θερμοκρασία δωματίου					
ηλεκτρικό	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
επώαση, 30 min, θερμοκρασία δωματίου					
[Τα δείγματα φωτομετρούνται μετά πάροδο 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 min]					
A <sub>600 nm</sub>					

Ρυθμιστικό διάλυμα = φωσφορικό κάλιο, 0.2 M, pH 7.5, Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM,

μηλονικό = υδατικό διάλυμα μηλονικού νατρίου, 0.5 M, αντιμυκίνη A = διάλυμα

αντιμυκίνης A (50 mg/ml) σε αιθανόλη, 95% (φυλάσσεται στους -20 °C), DPIP

= υδατικό διάλυμα 2,6-διχλωρο-φαινυλ-ινδοφαινόλης, 0.27 mg/ml,



ομοιογενοποίηση = δείγμα ομοιογενοποίησης ήπατος (βλ. ανωτέρω), αραιωθέν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών [1:1, τελική αναλογία όγκου δείγματος : μάζας ιστού = 6 ml ανά g], ηλεκτρικό = υδατικό διάλυμα ηλεκτρικού νατρίου, 0.1 M

\*Στον τρίτο κατά σειρά σωλήνα, το ομοιογενοποίηση επωάζεται σε 100 °C, επί 3 min, και στη συνέχεια ψύχεται σε υγρό πάγο, αμέσως πριν από την προσθήκη του στο μίγμα αντίδρασης.

## A2. Δείκτης INT (ιώδες του ιωδονιτροτετραζολίου)

Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

	(όγκοι σε ml)			
ρυθμιστικό διάλυμα	0.06	0.06	0.04	0.055
μηλονικό	0	0	0.02	0
αντιμυκίνη A	0	0	0	0.005
ομοιογενοποίηση (1:1)	0.04	0.04	0.04	0.04
INT	0.9	0	0	0
INT+ηλεκτρικό	0	0.9	0.9	0.9

**επώαση, 30 min, θερμοκρασία δωματίου**

[Η χρωματική εξέλιξη των δειγμάτων παρακολουθείται οπτικά επί 30 min]

Ρυθμιστικό διάλυμα = φωσφορικό κάλιο, 0.2 M, pH 7.5, Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM, μηλονικό = υδατικό διάλυμα μηλονικού νατρίου, 0.5 M, αντιμυκίνη A = διάλυμα αντιμυκίνης A (50 mg/ml) σε αιθανόλη, 95% (φυλάσσεται στους -20 °C), INT = διάλυμα 2-(4-ιωδοφαινυλ)-3-(4-νιτροφαινυλ)-5-φαινυλτετραζολίου, 1.1 mg/ml, σε ρυθμιστικό φωσφορικών [0.05 M φωσφορικού καλίου, pH 7.5] περιέχον σακχαρόζη, 25 mM, INT+ηλεκτρικό = ως άνω διάλυμα 2-(4-ιωδοφαινυλ)-3-(4-νιτροφαινυλ)-5-φαινυλτετραζολίου, 1.1 mg/ml, που περιέχει ηλεκτρικό, 0.05 M, ομοιογενοποίηση = δείγμα ομοιογενοποίησης ήπατος (βλ. A1)

Επειδή η ανηγμένη μορφή του INT είναι δυσδιάλυτη στο υδατικό περιβάλλον, για τον φωτομετρικό προσδιορισμό απαιτείται τερματισμός της αντίδρασης, σε ορισμένους χρόνους, με προσθήκη τριχλωροξικού οξέος (TCA) και εκχύλιση του έγχρωμου προϊόντος με οξικό αιθυλεστέρα. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 490 nm.



	(όγκοι σε ml)				
INT+ηλεκτρικό	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
ρυθμιστικό διάλυμα	0.1	0.06	0.06	0.06	0.06
ομοιογενοποίηση (1:1)	0	0.04	0.04	0.04	0.04
	επώαση, θερμοκρασία δωματίου				
χρόνος (min)	0	1	2	5	10
TCA [10% (w/v)]	1	1	1	1	1
Οξικός αιθυλεστέρας	3	3	3	3	3
	Φυγοκέντρηση (2500 rpm, 10 min), υπερκείμενο				
A <sub>490 nm</sub>					

### A3. Δείκτης MB (κυανού του μεθυλενίου)

Η "αυτοοξειδούμενη" χρωστική κυανού του μεθυλενίου (MB) δεν μπορεί να αποχρωματισθεί υπό αερόβιες συνθήκες γιατί λειτουργεί ως ενδιάμεσος μεταφορέας ηλεκτρονίων προς το μοριακό οξυγόνο (Εικόνα 7.4). Εάν, ωστόσο, η ανταλλαγή μορίων οξυγόνου μεταξύ του μίγματος αντίδρασης και του μίγματος αερίων της ατμόσφαιρας "διακοπεί" με επίστρωση λεπτής στιβάδας μηχανελαίου, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί βραδύς αποχρωματισμός του MB καθώς εξαντλείται σταδιακά το οξυγόνο από το μίγμα επώασης. Επαναερισμός με ανάδευση επαναφέρει την κυανή χρώση. Ως δείγματα επίδειξης, θα προετοιμασθούν από τους επιβλέποντες τα εξής:

	(όγκοι σε ml)	
ρυθμιστικό διάλυμα (βλ. A1)	2.3	2.3
MB (0.4 mg/ml ύδατος)	0	0.1
δισ-απεσταγμένο ύδωρ	2.1	1.9
ομοιογενοποίηση	0.1	0.1
ηλεκτρικό (0.05 M)	0	0.1
επίστρωση μηχανελαίου	1	1
	επώαση, 3 h, θερμοκρασία δωματίου	
	[Παρακολουθείται η εξέλιξη του χρώματος των δειγμάτων, οπτικά]	



## **B. Αναστολή της αναπνευστικής αλυσίδας**

Από το Πειραματικό μέρος Α, υποδεικνύεται η δράση των αναστολέων μηλονικού και αντιμυκίνης Α. Από τα φωτομετρικά δεδομένα (Πειρ, μέρος Α1 και Α2), θα κατασκευασθούν καμπύλες προόδου των αντιδράσεων της αναπνευστικής αλυσίδας μέσω του συμπλόκου ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (σε  $A_{600}$  [αναγόμενο DRIP] ή  $A_{490}$  [αναγόμενο INT] συναρτήσει του χρόνου), στις 3 πειραματικές συνθήκες (απουσία αναστολέων, παρουσία μηλονικού, παρουσία αντιμυκίνης Α).



## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ

Πειραματικό μέρος A1:

Χρόνος (min)	$A_{600 \text{ nm}}$	$A_{600 \text{ nm}}$ (100 °C)	$A_{600 \text{ nm}}$ (μηλονικό)	$A_{600 \text{ nm}}$ (αντιμυκίνη A)
0				
0.5				
1				
2				
5				
10				
15				
20				
30				

Πειραματικό μέρος A2:

Χρόνος (min)	$A_{490 \text{ nm}}$
0	
1	
2	
5	
10	

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Πειραματικό μέρος A1-B:

Καμπύλη προόδου της αναπνευστικής αλυσίδας (σε  $A_{600}$  [αναγόμενο DPIP] συναρτήσει του χρόνου)

Πειραματικό μέρος A2-B:

Καμπύλη προόδου της αναπνευστικής αλυσίδας (σε  $A_{490}$  [αναγόμενο INT] συναρτήσει του χρόνου)



## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΠΕΔΩΣΗΣ

Πειραματικό μέρος A1:

1. Από τα πειραματικά σας δεδομένα, πώς ερμηνεύεται η δράση των αναστολέων σε κάθε περίπτωση που παρατηρείται αναστολή της αναπνευστικής αλυσίδας;

Πειραματικό μέρος A2:

2. Γιατί στην περίπτωση του INT, δεν μπορεί να γίνει απευθείας φωτομέτρηση των δειγμάτων αλλά απαιτείται εκχύλιση;

Πειραματικό μέρος A1-A2-A3:

3. Ποιος από τους οξειδοαναγωγικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι καταλληλότερος για τη φωτομετρική παρακολούθηση της αναπνευστικής αλυσίδας;
4. Πώς ερμηνεύονται οι αλλαγές χρώματος των δεικτών σε κάθε περίπτωση;



# **ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ**

## **ΑΣΚΗΣΗ 8**

### **Προσδιορισμός βιοχημικών και ενζυμικών δεικτών στην Κλινική Βιοχημεία**

1. Προσδιορισμός γλυκόζης ορού
2. Προσδιορισμός α-αμυλάσης ορού
3. Ανίχνευση πρωτεϊνών στα ούρα
4. Ανίχνευση κετονοσωμάτων
5. Ανίχνευση πορφυρινών

**Όνοματεπώνυμο φοιτητή**

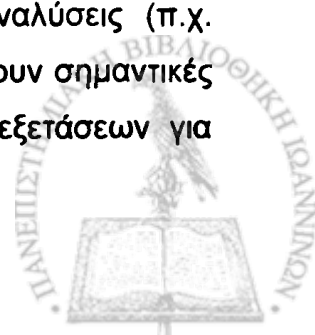
**Υπογραφή επιβλέποντα**



### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ**

Χρησιμοποιώντας απλές βιοχημικές δοκιμασίες σε βιολογικά υγρά όπως αίμα ή ούρα, είμαστε σήμερα σε θέση να διαγνώσουμε ή να βοηθήσουμε αποφασιστικά στη διάγνωση ασθενειών, χωρίς να επεμβούμε στα κύτταρα των αντίστοιχων ιστών-στόχων. Οι καθιερωμένες πλέον αυτές βιοχημικές δοκιμασίες στηρίζονται σε ερευνητικές προόδους που επέτρεψαν αναλυτικότερη γνώση του τρόπου λειτουργίας των κυττάρων των ιστών, σε μοριακό επίπεδο. Συγκεκριμένα, πρόκειται για δοκιμασίες μέτρησης της ενεργότητας συγκεκριμένων ενζύμων ή των επιπέδων υποστρωμάτων ή προϊόντων συγκεκριμένων ενζύμων, τα οποία χαρακτηρίζουν εξειδικευμένους τύπους κυττάρων ενός ιστού και ενδεχόμενη μεταβολή των επιπέδων τους σε περιβάλλοντα βιολογικά υγρά (π.χ. στο αίμα) αποτελεί ένδειξη παθολογίας. Για παράδειγμα, κυτταρικοί θάνατοι συνδεδεμένοι με ιστική βλάβη ή νέκρωση θα οδηγήσουν σε λύση κυττάρων και έκκριση των αντίστοιχων ενζύμων στην κυκλοφορία του αίματος. Η ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός ορισμένων από τις πρωτεΐνες και τα ένζυμα αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης διάγνωσης σε συγκεκριμένες περιπτώσεις διαταραχών και παθήσεων. Ένα παράδειγμα αποτελεί ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης τροπονίνης και του ενζύμου κινάση της κρεατίνης (ισοένζυμο MB) στον ορό αίματος, για την διάγνωση εμφράκτου του μυοκαρδίου (βλ. κατωτέρω, Εισαγωγή, Β).

Τα εξωκυττάρια βιολογικά υγρά καταλαμβάνουν περί το 1/5 της μάζας του ανθρώπινου σώματος: από αυτά, 75% αντιστοιχεί σε διάμεσο υγρό (μεσοκυττάρια ουσία) (interstitial fluid), 25% σε αγγειακό υγρό (αίμα και λέμφο) και ένα μικρό μέρος σε εγκεφαλονωτιαίο και περιαρθρικό υγρό. Λόγω πρακτικότητας, το αίμα (πλάσμα ή ορός) αποτελεί τη συνηθέστερη πηγή υλικού για αναλύσεις κλινικής βιοχημείας (κλινικής χημείας), όπως ονομάζεται σήμερα η επιστήμη που ασχολείται με αυτά τα θέματα. Επίσης, τα ούρα αποτελούν χρήσιμη πηγή υλικού για άμεσες βιοχημικές αναλύσεις (π.χ. γλυκόζης, πρωτεϊνών, κετονοσωμάτων) που μπορούν να δώσουν σημαντικές ενδείξεις είτε για την επιλογή των κατάλληλων περαιτέρω εξετάσεων για

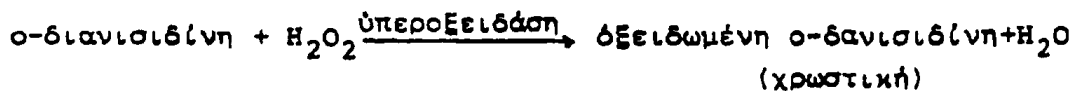
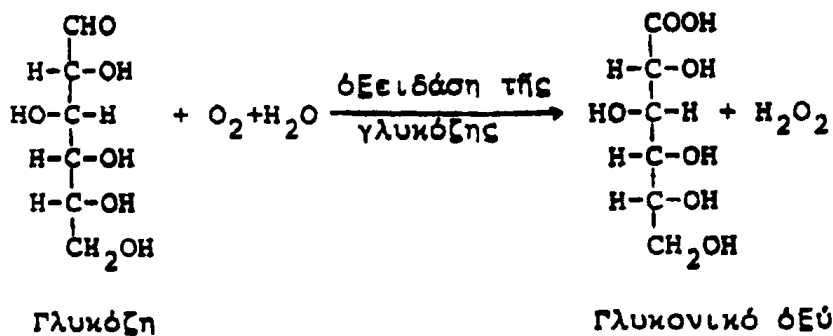




διάγνωση μιας πάθησης, είτε για την ανίχνευση πιθανών επιπλοκών κατά την εξέλιξη μιας ήδη διαγνωσθείσας νόσου. Τέλος, πολλές από τις αναφερόμενες βιοχημικές δοκιμασίες έχουν προτυποποιηθεί και διατίθενται επίσης με τη μορφή τυποποιημένων αντιδραστηρίων (kits), δισκίων ή ταινιών (strips). Σε σχέση με τις δοκιμασίες που εξετάζονται κατωτέρω, γνωστά παραδείγματα τυποποιημένων συσκευασιών μέτρησης είναι π.χ. τα Clinitest (δοκιμασία αναγωγικών ουσιών κατά Benedict), Albustix (πρωτεΐνη ούρων), Ketostix (κετονοσώματα) κλπ.

### A. Γλυκόζη

Αν και τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης ορού (και ούρων) συνδέονται συνήθως με σακχαρώδη διαβήτη, αύξηση των συγκεντρώσεων γλυκόζης μπορεί επίσης να συνδέεται με υπερενεργότητα θυρεοειδούς ή επινεφριδίων. Αντίστροφα, χαμηλά επίπεδα ορού (υπογλυκαιμία) συνδέονται με υπέρμετρη δόση ινσουλίνης, με ενδοκρινική υπολειτουργία ή με ορισμένες μορφές ηπατοπάθειας. Γενικότερα, η γλυκόζη του αίματος αποτελεί κύριο βιοχημικό δείκτη για την συνολική λειτουργικότητα του μεταβολισμού των υδατανθράκων στον οργανισμό.



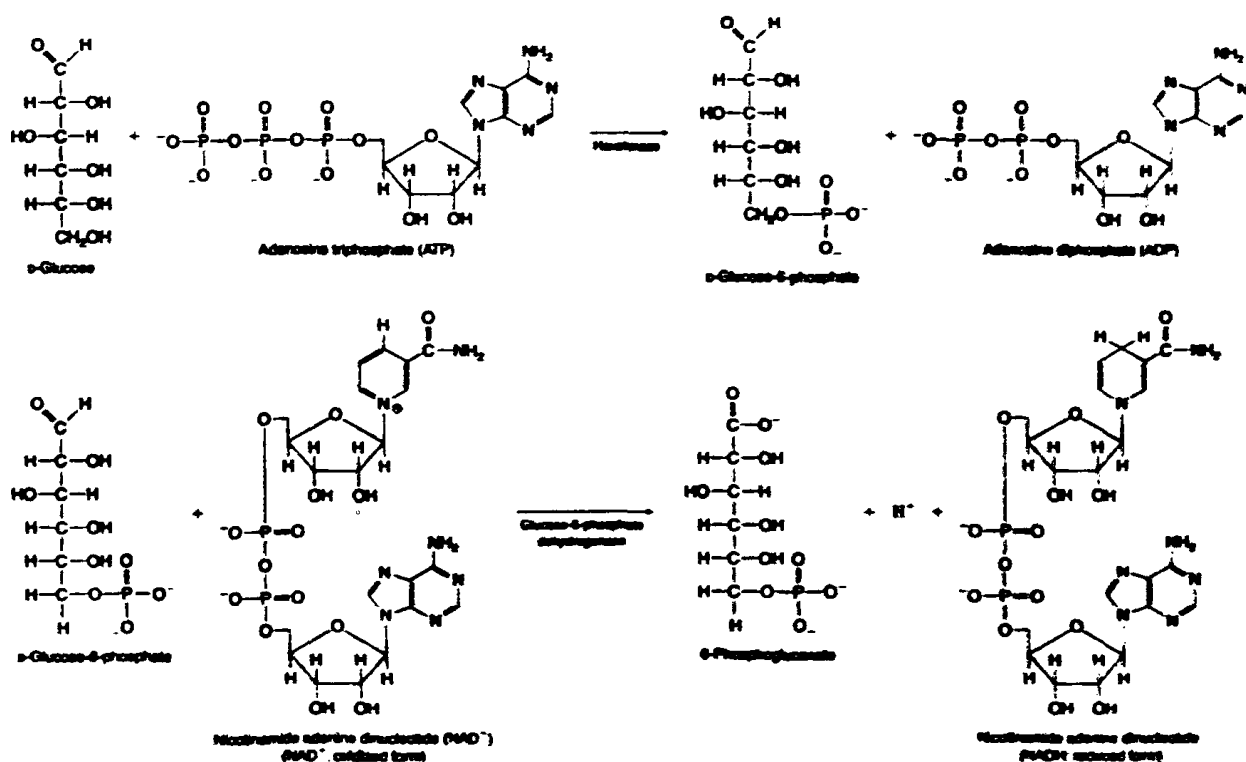
Εικόνα 8.1. Αντιδράσεις ανίχνευσης της γλυκόζης με την μέθοδο οξειδάσης της γλυκόζης (GO)

Για τη μέτρηση της γλυκόζης στα βιολογικά υγρά, χρησιμοποιείται συνήθως ενζυμική μέθοδος π.χ. με χρήση συζευγμένων αντιδράσεων οξειδάσης της γλυκόζης και υπεροξειδάσης (Εικόνα 8.1) ή συζευγμένων αντιδράσεων εξοκινάσης και αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής-γλυκόζης (Εικόνα 8.2).

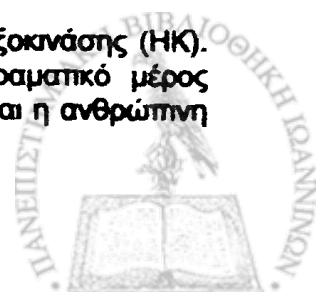


Στην πρώτη περίπτωση (Εικόνα 8.1), παρακολουθείται στην περιοχή του ορατού το έγχρωμο προϊόν της οξειδωσης της ο-διανισιδίνης (χρώματος καφέ) που παράγεται μέσω της αντίδρασης υπεροξειδάσης. Αντίδραση υπεροξειδάσης, εκτός της ο-διανισιδίνης, μπορούν επίσης να δώσουν και άλλες αναγωγικές ενώσεις όπως ουρικό οξύ, ασκορβικό, χολερυθρίνη, γλουταθειόνη, και επομένως απαιτείται κατάλληλη προεργασία των δειγμάτων (π.χ. με τη μέθοδο Somogyi-Nelson, κατά την οποία οι πιθανοί αναγωγικοί παράγοντες καταβυθίζονται ως άλατα δισθενούς ψευδαργύρου ή προσροφώμενοι σε ίζημα θειϊκού βαρίου, και απομακρύνονται).

Στην δεύτερη περίπτωση (Εικόνα 8.2), παρακολουθείται η αύξηση απορρόφησης στα 340 nm που αντιστοιχεί στο παραγόμενο NADH (βλ. και Άσκηση 6). Το NADH παράγεται από την αντίδραση μιας βακτηριακής αφυδρογονάσης 6-φωσφορικής γλυκόζης (G-6-PDH), η οποία είναι εξαρτώμενη από  $\text{NAD}^+$ , και όχι από  $\text{NADP}^+$  όπως οι G-6-PDHs των θηλαστικών (βλ. Stryer, Πορεία φωσφορικών πεντοζών, σελ. 452). Το μίγμα της αντίδρασης (Sigma Glucose Infinity Reagent, Πειραματικό μέρος, B) περιέχει ακόμη ATP και  $\text{Mg}^{2+}$  που απαιτεί η αντίδραση της εξοκινάσης.



Εικόνα 8.2. Αντιδράσεις ανίχνευσης της γλυκόζης με την μέθοδο εξοκινάσης (HK). Στο ανωτέρω πρωτόκολλο που θα χρησιμοποιηθεί και στο Πειραματικό μέρος (Sigma Diagnostics-17, Glucose Infinity Reagent), δεν χρησιμοποιείται η ανθρώπινη



αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G-6-PDH) (εξαρτώμενη από NADP<sup>+</sup>) αλλά μία G-6-PDH βακτηριακής προέλευσης, η οποία είναι εξαρτώμενη από NAD<sup>+</sup>

Εκτός από τις ενζυμικές μεθόδους, έχουν χρησιμοποιηθεί και καθαρά χημικές μέθοδοι προσδιορισμού γλυκόζης, στηριζόμενες σε (χρωμογόνες) αντιδράσεις με αρωματικές αμίνες (όπως ανιλίνη, βενζιδίνη, ο-τολουϊδίνη) ή σε αναγωγή δισθενών ιόντων χαλκού σε μονοσθενή (Cu<sup>1+</sup>) τα οποία είτε συμπλέκονται σε έγχρωμα οξειδία ή υδροξειδία (μέθοδος Benedict) είτε ανάγουν αρσενομολυβδαινικά σύμπλοκα δίδοντας επίσης έγχρωμα προϊόντα (μέθοδος Nelson). Τις ανωτέρω αντιδράσεις, εκτός της γλυκόζης, δίδουν επίσης και άλλα σάκχαρα (αντίδραση αρωματικών αμινών) ή αναγωγικές ενώσεις (αντίδραση Benedict ή Nelson).

## **B. Ενζυμικοί δείκτες**

Συνοπτικά, οι περιπτώσεις χρήσης των ενζύμων στην Ιατρική ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες:

**(α) Εξωγενώς προστιθέμενα αντιδραστήρια**, δηλ. "εργαλεία" ανίχνευσης άλλων δεικτών στα βιολογικά υγρά, π.χ. γλυκόζης (βλ. ανωτέρω), ουρίας (με χρήση συζευγμένων αντιδράσεων ουρεάσης και γλουταμικής αφυδρογονάσης), αιθανόλης (με χρήση αλκοολικής αφυδρογονάσης), κλπ. Επίσης, στην ίδια κατηγορία συμπεριλαμβάνεται η χρήση ενζύμων σε ανοσοενζυμικές τεχνικές προσδιορισμού αντιγόνων-αντισωμάτων (όπως είναι η ELISA, βλ. Άσκηση 8), αλλά και η χρήση τους στον προσδιορισμό των *διαγνωστικών επιπέδων άλλων ενζύμων*, μέσω συζευγμένων αντιδράσεων. Επιγραμματικά, τα ένζυμα ως αντιδραστήρια προσφέρουν ταχύτητα, εξειδίκευση και ικανοποιητικό βαθμό ευαισθησίας στις ανωτέρω διαγνωστικές εφαρμογές.

**(β) Διαγνωστικοί δείκτες**, δηλ. άμεση συσχέτιση συγκεκριμένων παθήσεων με τον προσδιορισμό επιπέδων *συγκεκριμένων ενζύμων* στα σωματικά υγρά. Τα επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας, στις περιπτώσεις αυτές, συνεισφέρουν (μαζί με άλλους, κλινικούς δείκτες) στη διάγνωση της πάθησης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι: αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού (AST) (γνωστή παλαιότερα ως GOT) (EC 2.6.1.1), κινάση της κρεατίνης (EC 2.7.3.2) και γαλακτική αφυδρογονάση (ισοένζυμα LDH-1 και -2) ως δείκτες



εμφράκτου του μυοκαρδίου (myocardial infarction), αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALT) (EC 2.6.1.2) και γαλακτική αφυδρογονάση (ισοενζύμου LDH-5) (EC 1.1.1.27) ως δείκτες ηπατικής πάθησης, α-αμυλάση (EC 3.2.1.1) ως δείκτης οξείας παγκρεατίτιδας, αλκαλική φωσφατάση (EC 3.1.3.1) ως δείκτης οστεοπαθειών, όξινη φωσφατάση (EC 3.1.3.2) ως δείκτης προστατικού καρκινώματος, κλπ.

(γ) **Θεραπευτικοί παράγοντες**, π.χ. χορήγηση θρυψίνης και στρεπτοκινάσης ως αντιθρομβωτικών μέσων, μίγματος λιπάσης, θρυψίνης, χυμοθρυψίνης, α-αμυλάσης και άλλων υδρολυτικών ενζύμων σε περιπτώσεις γαστρεντερικών διαταραχών, παγκρεατεκτομής ή παγκρεατικής ανεπάρκειας, κλπ. Σήμερα, δυνατόν να εφαρμοσθεί θεραπευτική χορήγηση ενζύμων μέσω τεχνικών *γονιδιακής θεραπείας* προς αντιμετώπιση μονογονιδιακών γενετικών παθήσεων, όπως π.χ. η συνδυαστική ανοσοανεπάρκεια (severe combined immunodeficiency, SCID) λόγω έλλειψης απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA), η οποία απετέλεσε και την πρώτη περίπτωση ασθένειας όπου εφαρμόσθηκε γονιδιακή θεραπεία (1989).

Στο Πειραματικό μέρος, θα εξετασθεί ως διαγνωστικός δείκτης το ένζυμο α-αμυλάση. Το ένζυμο αυτό επιλέχθηκε λόγω του ευχερώς κατανοητού φυσιολογικού του ρόλου, της *ειδικής* συσχέτισης του με τον ιστό του παγκρέατος, και της απλότητας των μεθόδων προσδιορισμού του.

### **B1. Το ένζυμο α-αμυλάση**

Η α-αμυλάση (EC 3.2.1.1) (1,4-α-D-glucan glucanohydrolase) απαντάται σε όλα σχεδόν τα είδη οργανισμών, είναι ένζυμο εκκρινόμενο και λειτουργεί ως ενδογλυκοσιδάση, υδρολύοντας α-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς από πολυμερή γλυκόζης (άμυλο, γλυκογόνο, κλπ.) που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν από τα κύτταρα του οργανισμού ως μεταβολικές πηγές άνθρακα. Η α-αμυλολυτική δράση οδηγεί σε αρχική υδρόλυση των πολυμερών αυτών προς μίγμα κυρίως μαλτόζης (διμερούς), μαλτοτριόζης (τριμερούς) και α-δεξτρινών (διακλαδιζόμενων ολιγομερών, κατά μέσο όρο οκταμερών) (βλ. Stryer, σελ. 358). Στη συνέχεια, άλλα εκκρινόμενα ένζυμα (μεταξύ των οποίων η α-1,4-γλυκοσιδάση, και ένζυμα αποκλάδισης με ενεργότητα α-1,6-γλυκοσιδάσης) ολοκληρώνουν τη διάσπαση των μικρότερων πολυμερών προς μονομερή γλυκόζης, η οποία προσλαμβάνεται από τα κύτταρα.



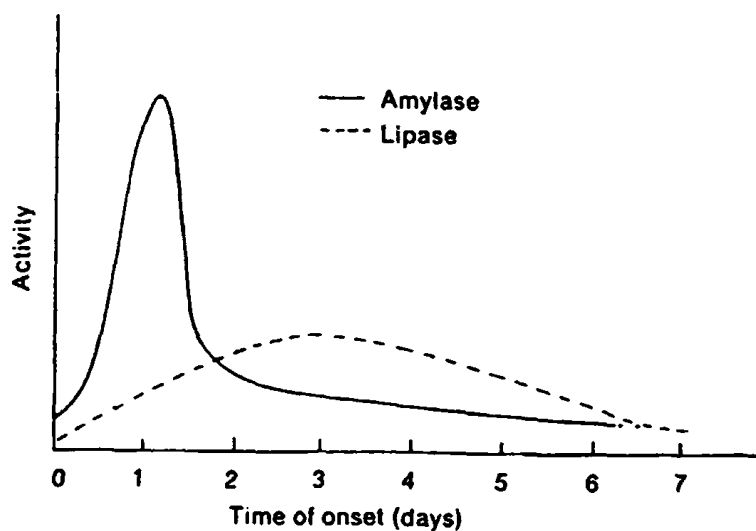
Στον ανθρώπινο οργανισμό, αναφέρονται κυρίως η *σιελική* και η *παγκρεατική α-αμυλάση*. Η *σιελική α-αμυλάση*, εκκρινόμενη κατά κύριο λόγο από τους αδένες της παρωτίδας, υδρολύει περιορισμένο αριθμό α-1,4-γλυκοσιδικών δεσμών στον περιορισμένο χρόνο κατά τον οποίο οι πολυσακχαρίτες της τροφής ευρίσκονται εντός της στοματικής κοιλότητας (κατά την μάσηση). Μικρή ενεργότητα (σιελικής) α-αμυλάσης διατηρείται, επίσης, σε όλο το ανώτερο τμήμα του πεπτικού σωλήνα μέχρι το επίπεδο του στομάχου, όπου η αντίστοιχη ενεργότητα καταστρέφεται λόγω του ισχυρά όξινου pH. Η παγκρεατική, πλέον, α-αμυλάση, εκκρινόμενη από την εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος μαζί με άλλα πεπτικά ένζυμα (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, καρβοξυπεπτιδάση, λιπάση) και παράγοντες εξουδετέρωσης του pH (όξινο ανθρακικό νάτριο), ολοκληρώνει την α-αμυλολυτική δράση στο αρχικό τμήμα του λεπτού εντέρου (δωδεκαδάκτυλο). Συγχρόνως, υδρολάσες εκκρινόμενες από τους αδένες (κρύπτες Lieberkuhn) του λεπτού εντέρου διασπούν πλήρως τη μαλτόζη και τα άλλα α-αμυλολυτικά προϊόντα προς γλυκόζη. Στα επόμενα τμήματα του λεπτού εντέρου (νήστιδα και ειλεό), τα μόρια γλυκόζης "απορροφώνται" δηλ. προσλαμβάνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου, κυρίως με τη δράση του συµμεταφορέα γλυκόζης/νατρίου (SGLT1-2).

## **B2. Κλινική διαγνωστική αξία της α-αμυλάσης**

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας α-αμυλάσης στον ορό ή στα ούρα έχει *διαγνωστική αξία* για την πάθηση της **οξείας παγκρεατίτιδας** (acute pancreatitis). Η εφαρμογή αυτή στηρίζεται στο ότι τα επίπεδα αμυλάσης στο αίμα και/ή στα ούρα αυξάνονται έντονα κατά τα πρώτα 24ωρα εμφάνισης της πάθησης (Εικόνα 8.3), υποδεικνύοντας καταστροφή παγκρεατικού ιστού. Διαπιστώνεται επίσης αύξηση και άλλων παγκρεατικών ενζύμων, όπως λιπάσης ή θρυψίνης. Οι περιπτώσεις "ψευδώς θετικής" διάγνωσης παγκρεατίτιδας λόγω έμμεσης αύξησης των επιπέδων στον ορό οφειλόμενης σε νεφρική ανεπάρκεια ή κοιλιακή πάθηση (εμφάνιση οξείας κοιλίας) είναι περιορισμένες. Ο έλεγχος για ψευδώς θετικές αντιδράσεις γίνεται με προσδιορισμό του επιπέδου α-αμυλάσης στα ούρα καθώς και του ρυθμού κάθαρσης αμυλάσης (αποβολής της από τα ούρα) σε αναφορά προς αυτόν



της κάθαρσης κρεατινίνης (ένος μικρού, αποβλητέου, μορίου, ελάχιστου σε μέγεθος σε σχέση με το ένζυμο α-αμυλάση).



**Εικόνα 8.3.** Μεταβολές των επιπέδων παγκρεατικών ενζύμων (α-αμυλάση και λιπάσης) μετά από εμφάνιση οξείας παγκρεατίτιδας [από Montgomery *et al.*, *Biochemistry: a case-oriented approach*, Saint Louis, MO, 1980]

Ως προς την αιτιολογία της οξείας (ή και της χρόνιας) παγκρεατίτιδας, τα δεδομένα είναι περιορισμένα, πέραν της γνωστής συσχέτισης που αναφέρεται μεταξύ παγκρεατίτιδας και αλκοολισμού. Θεωρείται ότι ο παγκρεατικός ιστός καταστρέφεται λόγω υπερενεργοποίησης των ίδιων των πρωτεολυτικών του ενζύμων, ιδιαίτερα της θρυψίνης. Σε πρόσφατες μοριακές βιολογικές μελέτες, έχει περιγραφεί κληρονομική προδιάθεση δηλ. εγγενείς μεταλλάξεις που οδηγούν σε αυτοκαταλυτική σταθεροποίηση του θρυψινογόνου και, μέσω αυτής, σε συσσώρευση θρυψίνης μέσα στον παγκρεατικό ιστό (Arg117→Asn και Asn21→Ile).

### **B3. Μέθοδοι προσδιορισμού α-αμυλάσης**

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας α-αμυλάσης στηρίζεται σε μεταβολές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του αμυλολυόμενου υποστρώματος, όπως μείωση ιξώδους, μείωση έντασης της χρώσης ιωδίου, απελευθέρωση αναγωγικών ομάδων, αλλαγή γωνίας στροφής του επιπέδου ταλάντωσης του πολωμένου φωτός (optical rotation), απελευθέρωση χρωμογόνων ομάδων. Κλασικές μέθοδοι είναι οι εξής:

(α) Αντίδραση αμύλου-ιωδίου



Η α-αμυλολυτική δράση οδηγεί σε υδρολυτική αποικοδόμηση τόσο του αδιακλάδωτου α-1,4-πολυμερούς (αμυλόζης) όσο και του α-1,6-διακλαδιζόμενου α-1,4-πολυμερούς (αμυλοπηκτίνης). Η έκταση της αποικοδόμησης μετράται από τη μείωση απορροφητικότητας διαλύματος αμύλου-ιωδίου (στα 600 nm), δηλ. μείωση έντασης της χαρακτηριστικής χρώσης ιωδίου που δίδουν αμυλοπηκτίνη και αμυλόζη. Ευαισθησία, 0.02-0.1 mg (υδρολυόμενου) υποστρώματος.

**(β) Μέτρηση της απελευθέρωσης αναγωγικών σακχάρων**

Αναγωγικά άκρα στα μόρια του πολυσακχαρικού υποστρώματος είναι μόνον αυτά που περιέχουν ελεύθερη υδροξυλομάδα στη θέση C1 του μονομερούς δακτυλίου (1-OH), διότι έχουν την ιδιότητα της ημιακετάλης σε αντίθεση με τον χαρακτήρα των -OH στις θέσεις 2 έως 6. Για παράδειγμα, διακλαδιζόμενα πολυμερή όπως το γλυκογόνο ή η αμυλοπηκτίνη έχουν μόνον μία ελεύθερη 1-OH, δηλ. ένα αναγωγικό άκρο ανά μόριο (τα υπόλοιπα άκρα, με ελεύθερες 4-OH, ονομάζονται μη αναγωγικά άκρα). Μέσω της απελευθέρωσης μικρών ολιγομερών γλυκόζης, η α-αμυλολυτική δράση οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης αναγωγικών ομάδων (δηλ. ελεύθερων 1-OH) στο διάλυμα. Οι αναγωγικές ομάδες, στη συνέχεια, ανιχνεύονται με χρήση ήπιων οξειδωτικών μέσων, όπως είναι τα ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$  (Somogyi, 1938, Nelson, 1944), ή το 3,5-δινιτροσαλικυλικό (Bernfeld, 1951). Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται η μέθοδος ιόντων  $\text{Cu}^{2+}$  (αντιδραστήριο Nelson), τα ανηγμένα ιόντα  $\text{Cu}^{1+}$  επανοξειδώνονται από αρσеноμολυβδαινικό οξύ που λειτουργεί ως οξειδοαναγωγικός δείκτης. Ανίχνευση 0.1-1  $\mu\text{mol}$  (παραγόμενων) ισοδυνάμων γλυκόζης.

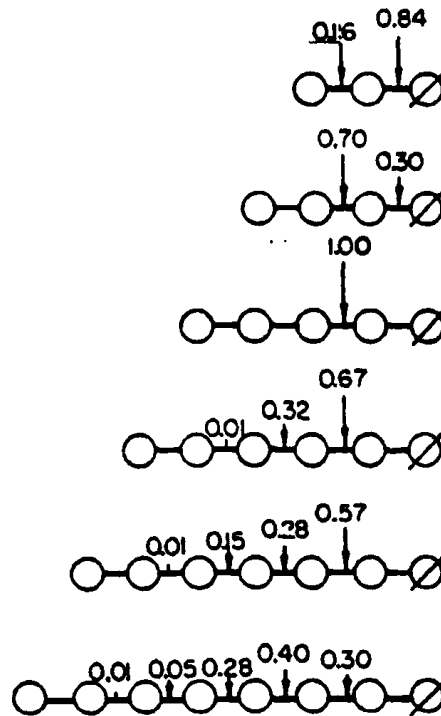
**(γ) Συνθετικά υποστρώματα που περιέχουν χρωμογόνες ομάδες**

όπως π-νιτροφαινυλο-μαλτοσιδίων (Jansen and Wydeveld, 1958) ή Remazol-brilliant blue-αμύλου (Rinderknecht, 1967).

Η α-αμυλολυτική δράση, συνήθως σε συνδυασμό με συζευγμένες ενζυμικές αντιδράσεις άλλων γλυκοσιδασών (Εικόνα 8.4) επιτρέπει απελευθέρωση της έγχρωμης ομάδας και αύξηση της απορροφητικότητας του διαλύματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος του ορατού φάσματος. Μέθοδοι του τύπου αυτού είναι κοινής χρήσης στην κλινική διαγνωστική ανάλυση. Ευαισθησία



μεθόδου Sigma που παρουσιάζεται στο Πειραματικό μέρος, 0.01 - 0.02 U/ml (37 °C) [U = μmol καταναλισκόμενου ET-G<sub>7</sub>PNP ανά min, βλ. κατωτέρω].



Maltooligosaccharide	Conc.	Relative rate of hydrolysis
G <sub>2</sub>	0.002 M	0
G <sub>3</sub>	0.002 M	9
G <sub>4</sub>	0.002 M	98
G <sub>5</sub>	0.002 M	72
G <sub>6</sub>	0.002 M	49
G <sub>7</sub>	0.002 M	34
Maltodextrin (G <sub>20</sub> )	0.2 %	85
Starch	0.25 %	100

Εικόνα 8.4. (α) Ειδικότητα α-αμυλολυτικής δράσης επί ολιγομαλτοσιδίων [από P. D. Boyer, The Enzymes, Academic Press, New York, 1970]



Εικόνα 8.4. (β) Αρχή προσδιορισμού α-αμυλάσης με χρήση συνθετικού υποστρώματος και συζευγμένης αντίδρασης α-γλυκοσιδάσης [από Sigma Diagnostics, Amylase-577, Saint Louis, MO, 1997]





### Γ. Ανίχνευση πρωτεϊνών στα ούρα

Τα ούρα απετέλεσαν το αρχαιότερο διαγνωστικό υγρό στην Ιατρική. Το χρώμα (π.χ. ερυθρά στην αιματουρία), η διαύγεια (π.χ. θολερά στην πρωτεϊνουρία) και η γεύση τους (π.χ. γλυκά στην γλυκοζουρία) ήταν και συνεχίζουν να είναι άμεσα χρήσιμοι δείκτες παθήσεων.

Οι δοκιμασίες ανίχνευσης πρωτεϊνών στα ούρα θα πρέπει, για να είναι πρακτικά εφαρμόσιμες, (α) να δίδουν αρνητικό αποτέλεσμα σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις και θετικό σε συγκεντρώσεις  $>0.01\%$  w/v (100 mg / L), (β) να μην επηρεάζονται από γλυκοπρωτεΐνες και άλλες πρωτεΐνες των ουροφόρων οδών. Το βιολογικό υλικό θα πρέπει να είναι *πρωϊνά* ούρα και η εξέταση να γίνεται όσο το δυνατό συντομότερα ή μετά από παραμονή  $<48$  h σε ψύξη. Στο δείγμα προστίθεται τολουόλιο, για περιορισμό της ανάπτυξης μικροοργανισμών, ενώ δείγματα ούρων που περιέχουν βακτήρια (π.χ. σε πυελονεφρίτιδα ή λοιμώξεις ουρογεννητικού) θα πρέπει οπωσδήποτε να εξετάζονται αμέσως.

Οι κλασικές μέθοδοι ανίχνευσης πρωτεϊνών στα ούρα στηρίζονται σε καθίζηση τους, π.χ. λόγω θερμικής μετουσίωσης, η οποία αυξάνει την θολερότητα του δείγματος. Ενδεικτικά: (1) Κατά τη δοκιμασία μετουσίωσης με θέρμανση, ρυθμίζεται καταρχήν το pH σε 4-4.6 και τυχόν δυσδιάλυτο υλικό (π.χ. γλυκοπρωτεΐνες) απομακρύνεται με φυγοκέντρηση. Μετά από θέρμανση του δείγματος ( $40-60$  °C), μετράται (εμπειρικά) ο βαθμός θολερότητας ο οποίος αντιστοιχεί κατά προσέγγιση σε συγκεκριμένες περιοχές συγκέντρωσης πρωτεΐνης (Πίνακας 8.1). (2) Κατά τη δοκιμασία ανίχνευσης με σουλφοσαλικυλικό, το (διαυγές) δείγμα ούρων αναμιγνύεται με διάλυμα σουλφοσαλικυλικού οξέος και σχηματίζονται δύο στιβάδες στην μεσεπιφάνεια των οποίων καθιζάνει, εφόσον υπάρχει, πρωτεΐνη, και μετράται και πάλι ο βαθμός θολερότητας (Πίνακας 8.1). (3) Σε περιπτώσεις όπου δεν έχουμε πρωτεϊνουρία, είναι δυνατόν το δείγμα ούρων να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση της πρωτεΐνης Bence-Jones (H. Bence-Jones, 1847), διμερές των L-αλυσίδων ανοσοσφαιρινών, η οποία συσχετίζεται με πολλαπλούν μυέλωμα (δηλ. κακοήθης μετασχηματισμός κυττάρων του μυελού των οστών και υπερπαραγωγή ανοσοσφαιρίνης). Στην περίπτωση αυτή, θέρμανση σε  $40-60$



°C οδηγεί αρχικά σε καθίζηση (εμφάνιση θολερότητας) και, στη συνέχεια, αναδιάλυση της πρωτεΐνης Bence-Jones (και διαυγές διάλυμα).

Εμφάνιση	Αξιολόγηση	Συγκεντρώσεις πρωτεΐνης (σε mg / L)
Καθαρή	Αρνητικό	0-40
Ελαφρά, ευκρινής θολερότητα	ίχνη	40-100
Ελαφρά θολερότητα (αναγνώσιμα λεπτά γράμματα επί χάρτου που τοποθετείται πίσω από τον δοκιμαστικό σωλήνα)	1+	150-300
Εντονότερη θολερότητα (αναγνώσιμα παχύτερα γράμματα)	2+	400-1000
Εντονη θολερότητα, λίγο ίζημα	3+	2000-5000
Εντονη θολερότητα, κροκιδοειδές ίζημα	4+	άνω των 8000-10000

Πίνακας 8.1. Κλίμακα αξιολόγησης αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ανίχνευσης πρωτεϊνών στα ούρα (βλ. Πειραματικό μέρος, Δ)

Κοινό τεχνικό πρόβλημα στις ανωτέρω δοκιμασίες είναι τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που μπορούν να προέλθουν από την ύπαρξη (α) σκιαγραφικών ακτινολογικών ουσιών, (β) φαρμάκων όπως τολβουταμίδιο (1-βουτυλο-3-ρ-τολυσουλφονουλουρία) ή gantricin στα ούρα, που προκαλούν από μόνα τους την εμφάνιση θολερότητας. Επίσης, είναι ευνόητο ότι οι δοκιμασίες αυτές είναι ημιποσοτικές (Πίνακας 8.1). Για την ανίχνευση και μέτρηση πρωτεϊνών από βιολογικά υγρά εφαρμόζονται επίσης αναλυτικότερες ηλεκτροφορητικές και ανοσοχημικές μέθοδοι.



#### Δ. Κετονοσώματα

Η συσσώρευση κετονοσωμάτων (ακετοξικό, 3-υδροξυβουτυρικό, ακετόνη) στο αίμα και στα ούρα υποδεικνύει διαταραχή στην ισορροπία μεταβολισμού υδατανθράκων-λιπιδίων που μπορεί να προκληθεί π.χ. από αστία ή σακχαρώδη διαβήτη [βλ. Stryer, σελ. 506-508]. Τα κετονοσώματα ανιχνεύονται με αναλυτικές χημικές δοκιμασίες, όπως η μέθοδος Rothera (για ακετοξικό οξύ και ακετόνη) ή η μέθοδος Gerhardt (ακετοξικό).

#### Ε. Πορφυρίνες και μεταβολίτες πορφυρινών

Διαταραχές στον μεταβολισμό των πορφυρινών οδηγούν σε συσσώρευση παραγώγων πορφυρίνης στα ούρα [βλ. Stryer, σελ. 649-651]. Οι πορφυρίνες ανιχνεύονται με αναλυτικές χημικές δοκιμασίες, όπως η μέθοδος Ehrlich (για ουροχολινογόνο και πορφοχολερυθρινογόνο) και η μέθοδος Fouchet (για χολερυθρίνη).

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### A. Προσδιορισμός αναγωγικών ουσιών.

##### Μέθοδος Benedict

Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

Benedict	5 ml
δείγμα	0.5 ml
-----	
<i>100 °C, 5 min</i>	
-----	
<i>επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου (3 min)</i>	
-----	
<i>εμφάνιση χρώματος/ιζήματος</i>	

Benedict = μίγμα Benedict A [διάλυμα κιτρικών,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 21.6 mg/ml,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.125 g/ml], Benedict B [διάλυμα δισθενών ιόντων χαλκού,



$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.173 g/ml] και  $\text{ddH}_2\text{O}$ , σε αναλογία A:B: $\text{ddH}_2\text{O}$  = 8:1:1 (v/v/v) παρασκευαζόμενο πριν από τη χρήση, με ταχεία ανάδευση.

Δείγμα = πρόσφατα δείγματα ούρων που θα δοθούν

Από το χρωματικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας Benedict υπολογίζονται κατά προσέγγιση οι συγκεντρώσεις αναγωγικών ουσιών σε ισοδύναμα γλυκόζης (g/0.1L), σύμφωνα με την εξής κλίμακα:

Χρώση	Ιζημα	Αρίθμηση	g/0.1L
κυανή	-	0	0-0.1
πράσινη	κίτρινο	1+	0.2-0.5
ελαιώδης	καφεκίτρινο	2+	1
καφε-κίτρινο		3+	1.5
πορτοκαλί	καφεκόκκινο	4+	>2

Αναγωγικές ουσίες που απαντώνται στα ούρα μπορεί να είναι σάκχαρα (φρουκτόζη, λακτόζη, γαλακτόζη, μαλτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη, ριβόζη), οξέα (ουρικό, ασκορβικό, οξαλικό, ιππουρικό, γλυκουρονικό, σαλικυλικά, σαλικυλουρικό, ομογεντισικό), κρεατινίνη, κυστεΐνη, κετονοσώματα, σουλφαναμίδιο, φορμαλδεΰδη, κλπ.

## B. Προσδιορισμός γλυκόζης.

**Συζευγμένες αντιδράσεις οξειδάσης της γλυκόζης και υπεροξειδάσης**  
(Εικόνα 8.1)

Η δοκιμασία στηρίζεται σε τυποποιημένο τεστ με χρήση εμβαπτιζόμενων δοκιμαστικών ταινιών που περιέχουν τη χρωμογόνο ένωση ο-διανισιδίνη και τα ένζυμα οξειδάση της γλυκόζης και υπεροξειδάση.

**Συζευγμένες αντιδράσεις εξοκινάσης και αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης**  
(Εικόνα 8.2)



	(όγκοι σε ml)		
Αντιδραστήριο	1	1	1
ορός	0.02	0	0
ορός 1:10 (v/v)	0	0.02	0
ορός 1:100 (v/v)	0	0	0.02

**ΕΠΨΑΣΗ, ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ**

[Τα δείγματα φωτομετρούνται μετά πάροδο 0, 3, 5 και 15 min]

---

$A_{340 \text{ nm}}$

Αντιδραστήριο = *Sigma Diagnostics* Glucose (HK) Infinity Reagent, δηλ.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 M, pH 7.5,  $\text{NAD}^+$ , 1.5 mM, ATP, 1 mM,  $\text{MgCl}_2$ , 2.1 mM, που περιέχει εξοκινάση (EC 2.7.1.1) (από *S. cerevisiae*), 1 U/ml, και αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (EC 1.1.1.49), βακτηριακής προέλευσης, 1 U/ml, Ορός = physiological serum sample, χωρίς αραιώση ή αραιωμένο 1:10, 1:100 (v/v) σε  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.01 M, NaCl, 0.138 M, KCl, 0.0027 M, pH 7.2.

Από τα φωτομετρικά δεδομένα, τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης του NADH στα 340 nm ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 25 °C) και τον νόμο των Lambert-Beer ( $A = \epsilon c l$ , Άσκηση 1) (με  $l = 1 \text{ cm}$ ), θα υπολογισθούν οι τιμές παραγόμενου προϊόντος (NADH) (μmol) σε κάθε περίπτωση και, εξ αυτής, η συγκέντρωση γλυκόζης του δείγματος, σε μmol ανά ml ορού ή mg ανά 100 ml ορού. Επίσης, θα γίνει γραφική παράσταση της προόδου της ενζυμικής αντίδρασης (0-15 min), για κάθε μία από τις αντίστοιχες αραιώσεις ορού.

### Γ. Προσδιορισμός α-αμυλάσης

Θα εφαρμοσθεί η μέθοδος απελευθέρωσης χρωμογόνων ομάδων από συνθετικά υποστρώματα (Εισαγωγή Β). Ως υπόστρωμα α-αμυλάσης χρησιμοποιείται 4,6-αιθυλιδενο(G<sub>7</sub>)-π-νιτροφαινυλο (G<sub>1</sub>)-α-D-μαλτοεπτασίδιο (ET-G<sub>7</sub>PNP) και για την ολοκλήρωση της διάσπασης των α-1,4-γλυκοσιδικών δεσμών χρησιμοποιείται το ένζυμο α-1,4-γλυκοσιδάση (EC 3.2.1.3) (1,4-α-D-glucan glucohydrolase) (Εικόνα 8.4).



Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

	(όγκοι σε ml)		
Αντιδραστήριο	1	1	1
ορός	0.02	0	0
ορός 1:10 (v/v)	0	0.02	0
ορός 1:100 (v/v)	0	0	0.02

**επίπωση, θερμοκρασία δωματίου**

[Τα δείγματα φωτομετρούνται μετά πάροδο 0, 3, 5 και 7 min]

---

$A_{405 \text{ nm}}$

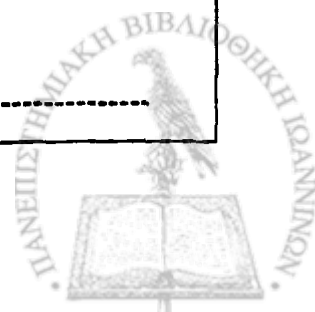
Αντιδραστήριο = Sigma Amylase Reagent, δηλ.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 M, pH 7.0, NaCl, 0.05 M,  $\text{MgCl}_2$ , 0.01 M, που περιέχει ET-G<sub>7</sub>PNP (υπόστρωμα α-αμυλάσης), 1 mM, α-1,4-γλυκοσιδάση, 25 U/ml, Ορός = physiological serum sample, χωρίς αραιώση ή αραιωμένο 1:10, 1:100 (v/v) σε  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.01 M, NaCl, 0.138 M, KCl, 0.0027 M, pH 7.2.

Από τα φωτομετρικά δεδομένα, τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης της π-νιτροφαινόλης στα 405 nm ( $\epsilon = 8600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 25 °C, ή  $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 30 °C, ή  $9100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 37 °C) και τον νόμο των Lambert-Beer ( $A = \epsilon c l$ , Άσκηση 1) (με  $l = 1 \text{ cm}$ ), θα υπολογισθούν οι τιμές παραγόμενου προϊόντος (π-νιτροφαινόλης, PNP) σε κάθε περίπτωση και, στη συνέχεια, η ενεργότητα α-αμυλάσης, σε μμολ παραγόμενου προϊόντος (PNP) ή μμολ καταναλισκόμενου υποστρώματος (ET-G<sub>7</sub>PNP) ανά min, ανά ml ορού (25 °C). Επίσης, θα γίνει γραφική παράσταση της προόδου της ενζυμικής αντίδρασης (0-7 min), για κάθε μία από τις αντίστοιχες αραιώσεις ορού.

#### Δ. Ανίχνευση πρωτεϊνών στα ούρα

Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

δείγμα	5 ml
σουλφοσαλικυλικό	0.5 ml
-----	



θερμοκρασία δωματίου (1 min)

-----  
εμφάνιση θολερότητας στη μεσεπιφάνεια των στιβάδων, Πίνακας 8.1

Δείγμα = πρόσφατο (διαυγές) διάλυμα ούρων

σουλφοσαλικυλικό = διάλυμα σουλφοσαλικυλικού οξέος, 0.8 M [προστίθεται προσεκτικά ώστε να σχηματίσει κάτω στιβάδα]

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται βάσει της κλίμακας του Πίνακα 8.1.

### Ε. Ανίχνευση κετονοσωμάτων

#### Μέθοδος Rothera

Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

στερεό  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1/3 του όγκου δοκιμαστικού σωλήνα

δείγμα 10 ml

-----  
νιτροπρωσσικό νάτριο (5% w/v) 0.2 ml

-----  
αμμωνία 2 ml

-----  
εμφάνιση χρώματος στη μεσεπιφάνεια των στιβάδων (10 min)

Δείγμα = πρόσφατο διάλυμα ούρων

[μετά την προσθήκη του δείγματος, καθώς και μετά την προσθήκη του νιτροπρωσσικού νατρίου, ακολουθεί έντονη ανάδευση του μίγματος. Στο τελικό στάδιο, η αμμωνία προστίθεται με προσοχή και υπό πλάγια θέση του σωλήνα, ώστε να σχηματίσει άνω στιβάδα]

Παρουσία ακετοξικού οξέος ή ακετόνης υποδεικνύεται με εμφάνιση ιώδους χρώματος

### ΣΤ. Ανίχνευση πορφυρινών

#### Μέθοδος Ehrlich

Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:



δείγμα	1 ml
Ehrlich	1 ml
-----	
<i>εμφάνιση χρώματος (2 min)</i>	
-----	
CH <sub>3</sub> COONa (κεκορεσμένο διάλυμα)	2 ml
-----	
<i>εμφάνιση χρώματος</i>	
-----	
αμυλική:βενζυλική αλκοόλη (3:1 v/v)	2 ml
-----	
<i>διαχωρισμός στιβάδων (οργανική-υδατική φάση)</i>	

Δείγμα = πρόσφατο (διαυγές) διάλυμα ούρων

Ehrlich = Αντιδραστήριο Ehrlich, δηλ. π-διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδη, 2.8 mg/ml, σε HCl, 0.6 N

Παρουσία ουροχολινογόνου υποδεικνύεται με εμφάνιση ερυθρού χρώματος που ανακτάται στην *οργανική φάση* (διαλυτό στο μίγμα αμυλικής:βενζυλικής αλκοόλης), ενώ παρουσία πορφοχολερυθρινογόνου υποδεικνύεται με εμφάνιση ερυθρού χρώματος που ανακτάται στην *υδατική φάση* (αδιάλυτο στο μίγμα αμυλικής:βενζυλικής αλκοόλης).

Σημείωση: Φυσιολογικά ούρα περιέχουν μικρά ποσά ουροχολινογόνου (ρόδινο χρώμα στην οργανική φάση) και ίχνη πορφοχολερυθρινογόνου (ανεπαρκή για σχηματισμό χρώματος στην υδατική φάση).





## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ

Πειραματικό μέρος Β:

Χρόνος (min)	$A_{340 \text{ nm}}$ (ορός)	$A_{340 \text{ nm}}$ (ορός, 1:10)	$A_{340 \text{ nm}}$ (ορός, 1:100)
0			
3			
5			
15			

Πειραματικό μέρος Γ:

Χρόνος (min)	$A_{405 \text{ nm}}$ (ορός)	$A_{405 \text{ nm}}$ (ορός, 1:10)	$A_{405 \text{ nm}}$ (ορός, 1:100)
0			
3			
5			
7			

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Πειραματικό μέρος Β:

Καμπύλη προόδου της αντίδρασης εξοκινάσης για τον προσδιορισμό γλυκόζης ( $A_{340 \text{ nm}}$  έναντι χρόνου)

Πειραματικό μέρος Γ:

Καμπύλη προόδου της αντίδρασης α-αμυλάσης ( $A_{405 \text{ nm}}$  έναντι χρόνου)

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Πειραματικό μέρος Β:

Συγκέντρωση γλυκόζης ορού (σε  $\mu\text{mol/ml}$  και  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\text{MB}=180$ ), από τις τιμές παραγόμενου  $\text{NADH}$  ( $\mu\text{mol}$ ) σε 15 min.



Πειραματικό μέρος Γ:

Ενεργότητα α-αμύλασης ορού (σε  $\mu\text{mol}$  παραγόμενου PNP ή καταναλισκόμενου ET-G<sub>7</sub>PNP ανά  $\text{min}$ , ανά  $\text{ml}$ ), από το γραμμικό τμήμα της καμπύλης προόδου.



## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΠΕΔΩΣΗΣ

Πειραματικό μέρος Α-Β:

1. Σε τι ομοιάζουν και σε τι διαφέρουν οι μέθοδοι Benedict και Nelson.
2. Συγκρίνατε τις μεθόδους Glucose (HK) (εξοκινάσης) και Glucose (GO) (οξειδάσης) ως προς την εξειδίκευση προσδιορισμού γλυκόζης.

Πειραματικό μέρος Γ:

3. Περιγράψτε τον τρόπο με τον οποίο (α) η *π*-νιτροφαινόλη, (β) η α-1,4-γλυκοσιδάση χρησιμοποιείται ως "εργαλείο" για τον προσδιορισμό της α-αμυλάσης.
4. Τι ονομάζεται αναγωγικό άκρο ενός πολυμερούς γλυκόζης; Πόσα αναγωγικά άκρα περιέχει ένα μόριο αμυλοπηκτίνης;

Πειραματικό μέρος Δ:

5. Τι είναι η πρωτεΐνη Bence-Jones;



# ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

## ΑΣΚΗΣΗ 9

### Ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

1. Επίστρωση πλακιδίου ELISA με διαλύματα ανοσοσφαιρινών ανθρώπου (coating)
2. Δέσμευση κενών/μη ειδικών αντιγονικών θέσεων με λευκωματίνη ορού βοός (blocking)
3. Επώαση με σύζευγμα αντι-ανοσοσφαιρίνης γ - αλκαλικής φωσφατάσης
4. Επώαση με υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης και φωτομετρικός προσδιορισμός σε μετρητή πλακιδίου ELISA

Όνοματεπώνυμο φοιτητή

Υπογραφή επιβλέποντα



## **ELISA**

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ**

Η **ELISA** (ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο, **E**nzyme **L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay) ανήκει στις ανοσοχημικές τεχνικές (τεχνικές αντιγόνου-αντισώματος). Είναι μία ανοσομετρική τεχνική στερεάς φάσης, η οποία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της μεγάλης εξειδίκευσης της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος, της ταχύτητας της ενζυμικής δράσης, αλλά και της ασφάλειας που παρέχει η μη ραδιενεργός διαδικασία ανίχνευσης. Πρόκειται για μία απλή και εργαστηριακά εύχρηστη τεχνική ποσοτικού προσδιορισμού αντιγόνων ή αντισωμάτων (βλ. κατωτέρω) από ορό αίματος, άλλα βιολογικά υγρά, καθώς και υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών, με μεγάλη **ευαισθησία** ανίχνευσης (σε επίπεδα nM ή pM). Τεχνικά, η ELISA επιτρέπει εξοικονόμηση χρόνου και αντιδραστηρίων με την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων επί πλακιδίου πολλών μικροφρεατίων (ELISA microtiter plate). Η εφαρμογή της σήμερα είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στην κλινική βιοχημική έρευνα και αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία στο πεδίο της ιατρικής διαγνωστικής.

Στο πειραματικό επίπεδο, μία τυπική ELISA περιλαμβάνει, διαδοχικά, προσρόφηση του αντιγόνου επί του πλαστικού υποστρώματος, δηλ. επίστρωση των μικροφρεατίων (**coating**), κάλυψη των κενών θέσεων (**blocking**), δέσμευση του αντιγόνου με ειδικό αντίσωμα (**1<sup>st</sup> antibody**), δέσμευση των θέσεων ειδικού αντισώματος με δεύτερο αντίσωμα, συνδεδεμένο-με-ένζυμο (**2<sup>nd</sup> antibody, enzyme-linked**), ενζυμική αντίδραση ανίχνευσης (**detection**). Εκτός του ανωτέρω, έχουν αναπτυχθεί και πολλά εναλλακτικά πρωτόκολλα ELISA, ανάλογα με την περίπτωση εργαστηριακής εφαρμογής. Για την αύξηση της ειδικότητας ανίχνευσης, χρησιμοποιείται συχνά ο τύπος της sandwich ELISA (βλ. κατωτέρω) και για την αύξηση της ευαισθησίας χρησιμοποιείται το σύστημα βιοτίνης-αβιδίνης (Εισαγωγή, Γ2).

Στην Άσκηση 9, θα δοθεί μία απλή εφαρμογή της ELISA, **ανίχνευση ανοσοσφαιρινών γ (IgG) από ορό αίματος ανθρώπου**, με στόχο την εξοικείωση των φοιτητών με τις αρχές και εργαστηριακές λεπτομέρειες της τεχνικής.



## A. Ανοσοχημικές τεχνικές (τεχνικές αντιγόνου-αντισώματος)

Μία στατιστική επισκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας στο γνωστικό πεδίο της Βιοχημείας έχει δείξει ότι άνω του 25% των δημοσιευμένων ερευνητικών εργασιών χρησιμοποιούν ανοσοχημικές τεχνικές, δηλ. στηρίζονται στη χρήση αντισωμάτων ως ερευνητικών εργαλείων. Τα **αντισώματα** (antibodies) ή **ανοσοσφαιρίνες** (immunoglobulins, Ig) αποτελούν, επομένως, εξαιρετικά χρήσιμα μόρια στην Πειραματική Βιοχημεία. Πρόκειται για πρωτεΐνες παραγόμενες και εκκρινόμενες από τα Β λεμφοκύτταρα, οι οποίες λειτουργούν ως εξειδικευμένος μηχανισμός άμυνας σε περιπτώσεις ιικών ή βακτηριακών λοιμώξεων ή κακοήθους μετασχηματισμού (νεοπλασίας). Στις περιπτώσεις αυτές, κάθε ενεργοποιημένο Β λεμφοκύτταρο παράγει έναν συγκεκριμένο (ειδικό) τύπο αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει μία συγκεκριμένη μοριακή περιοχή (*επίτοπο*) επί ενός συγκεκριμένου αντιγόνου. **Αντιγόνο** (antigen) είναι ένα οιοδήποτε μόριο (π.χ. μία βακτηριακή μεμβρανική πρωτεΐνη) το οποίο *παρουσιάζεται* στο ανοσολογικό σύστημα κατά τη διαδικασία της λοίμωξης ή της νεοπλαστικής ανάπτυξης και αναγνωρίζεται από το ανοσολογικό σύστημα ως ξένο (foreign) ώστε να *ενεργοποιήσει* τον αντίστοιχο κλώνο Β λεμφοκυττάρων. Οι λεπτομέρειες του ανωτέρω ανοσολογικού μηχανισμού αποτελούν αντικείμενο του γνωστικού πεδίου της Ανοσολογίας. Στη Βιοχημεία μας ενδιαφέρει αυτή καθαυτή η αντίδραση δέσμησης αντιγόνου-αντισώματος, η οποία παρουσιάζει υψηλό βαθμό εξειδίκευσης (**specificity**) και συγγένειας (**affinity**) (σταθερές διάστασης,  $K_D$  μεταξύ  $10^{-6}$  και  $10^{-10}$  M) και χρησιμοποιείται εργαστηριακά για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων αντιγόνων (π.χ. πρωτεϊνών, ορμονών, φαρμάκων κλπ.).

Στην εργαστηριακή εφαρμογή, η έννοια του αντιγόνου (antigen) αναφέρεται σε οιοδήποτε πρωτεϊνικό ή άλλο μόριο που *αναγνωρίζεται* και μπορεί να ανιχνευθεί από *ειδικά* αντισώματα (antibodies). Τα αντισώματα αυτά μπορεί να είναι μονοκλωνικά (monoclonal) ή πολυκλωνικά (polyclonal) και παρασκευάζονται με μεθόδους τεχνητής ανοσολογικής ενεργοποίησης πειραματοζώων, ενίοντας το ίδιο το (επιθυμητό) μόριο "αντιγόνου" ως



ανοσογόνο (immunogen), ώστε να επάγει την ανοσολογική απόκριση και σύνθεση αντισωμάτων από το πειραματόζωο.

Στην τεχνική της ELISA, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τόσο μονοκλωνικά όσο και πολυκλωνικά αντισώματα. Όταν χρησιμοποιούνται πολυκλωνικά αντισώματα (όπως στην παρούσα Άσκηση), η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται κατά πολύ από τα ενδιάμεσα στάδια δέσμευσης μη ειδικών θέσεων (blocking) και έκπλυσης της περίσσειας αντισώματος (washing), τα οποία περιορίζουν στο ελάχιστο την "ψευδώς θετική" εμφάνιση σήματος λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης με μη ειδικές αντιγονικές θέσεις (cross-reactivity). Για τον περιορισμό των φαινομένων διασταυρούμενης αντίδρασης, τα παρασκευάσματα πολυκλωνικών αντισωμάτων (ορού ανοσοποιηθέντων πειραματοζώων που περιέχει τα αντισώματα, δηλ. *αντιορού*, antiserum) είναι δυνατόν να καθαρισθούν με καταβύθιση σε θειϊκό αμμώνιο (50%, v/v) και χρωματογραφία συγγένειας επί αδρανούς υποστρώματος συζευγμένου με το ειδικό αντιγόνο (immunoaffinity chromatography). Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα (τα οποία αναγνωρίζουν έναν συγκεκριμένο μόνο επίτοπο επί του αντιγόνου), η παρεμπόδιση από (μη ειδικές) διασταυρούμενες αντιδράσεις μειώνεται σε σημαντικό βαθμό.

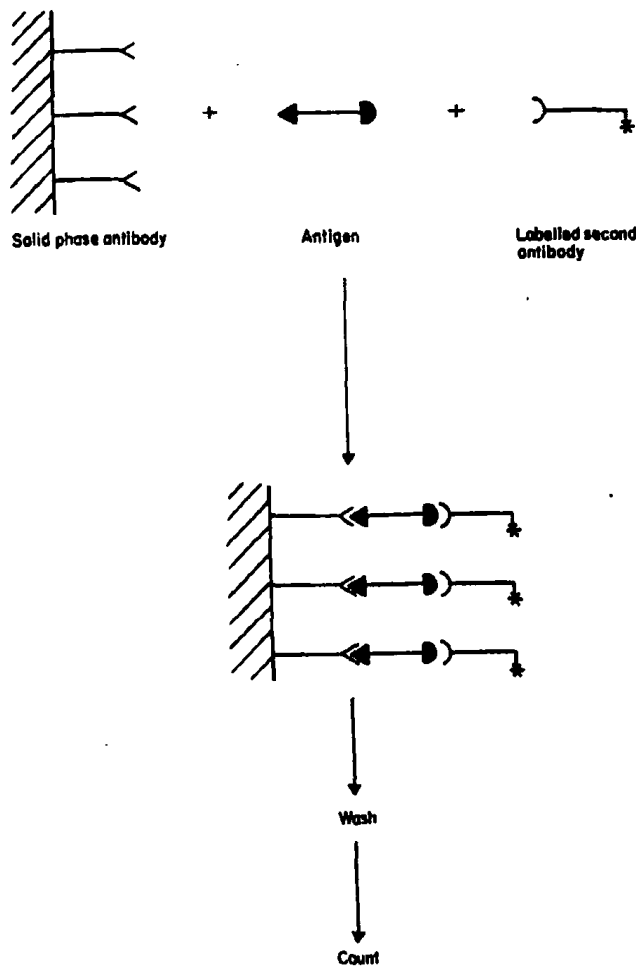
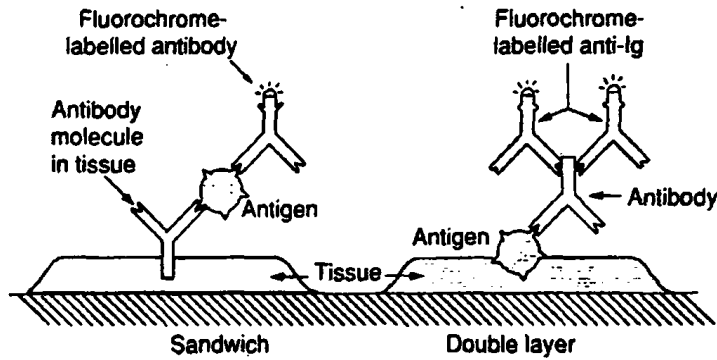
Ανοσοχημικές τεχνικές (δηλ. τεχνικές αντιγόνου-αντισώματος) που χρησιμοποιούνται συχνά στην Βιοχημεία είναι, εκτός της ELISA, ο ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός (radioimmunoassay ή RIA), η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (immunoblotting ή Western blotting), η ανοσοκαταβύθιση (immunoprecipitation), η μικροσκοπία ανοσοφθορισμού (immunofluorescence), η ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry), η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry). Εξάλλου, ως τελικό βήμα χρωματογραφικού καθαρισμού μιας πρωτεΐνης χρησιμοποιείται συχνά η τεχνική της χρωματογραφίας ανοσοσυγγένειας (immunoaffinity chromatography).

## **B. Ανάπτυξη της τεχνικής ELISA**

Η πειραματική αρχή της ELISA δεν διαφέρει ουσιαστικά από προγενέστερες ανοσομετρικές τεχνικές, όπως αυτές του έμμεσου ανοσοφθορισμού ή της ραδιοανοσομετρίας στερεάς φάσης (Εικόνα 9.1). Η βασική μεθοδολογία



εξάλλου δεν διαφέρει από αυτήν της RIA (ραδιοανοσολογικού προσδιορισμού), που είχε αναπτυχθεί παλαιότερα, με αρχικές εφαρμογές την μέτρηση ορμονών, όπως ινσουλίνης (R. S. Yalow και S. A. Berson, 1960). Διαφέρει, ωστόσο, η ELISA, ως προς τον τρόπο ανίχνευσης, διότι χρησιμοποιεί φωτομετρική ανίχνευση προϊόντος μιας ενζυμικής αντίδρασης (βλ. κατωτέρω) και όχι φθορισμομετρία ή μέτρηση ραδιενέργειας. Το βασικό,



**Εικόνα 9.1.** Διαγραμματική απεικόνιση των τεχνικών έμμεσου ανοσοφθορισμού (άνω) και ραδιοανοσομετρίας στερεάς φάσης (κάτω) [από Herbert *et al.*, The Dictionary of Immunology, Academic Press, London, England, 1995]





επομένως, ερευνητικό βήμα για την ανάπτυξη της ELISA ήταν η παρασκευή και εργαστηριακή σύνθεση αντισωμάτων ομοιοπολικά συνδεδεμένων με ένζυμο (*enzyme-linked antibodies*), που να διατηρούν τόσο την εξειδίκευση αντιγόνου του συγκεκριμένου αντισώματος όσο και την ενεργότητα και εξειδίκευση υποστρώματος του συγκεκριμένου ενζύμου.

Συζεύγματα (conjugates) ενζύμου-αντισώματος του ανωτέρω τύπου παρουσιάσθηκαν κατά τα τέλη της δεκαετίας του 1960, από τον Δρ. Στρατή Αβραμέα (S. Avrameas) του Ερευνητικού Κέντρου Pasteur (Pasteur Institute, Paris, France). Τα συζεύγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την διερεύνηση εναλλακτικών πρωτοκόλλων για αύξηση ευαισθησίας των τότε γνωστών ανοσοϊστοχημικών τεχνικών (S. Avrameas, 1967) και στη συνέχεια για την ανάπτυξη της τεχνικής ELISA (S. Avrameas, 1969-1971). Συζεύγματα ενζύμου-αντισώματος χρησιμοποιήθηκαν επίσης στην τεχνική ανοσο-αποτύπωσης (Western blotting), η οποία αναπτύχθηκε μεταγενέστερα (1979).

### Γ. Πειραματική αρχή της ELISA

Η ακολουθία πειραματικών σταδίων ενός τυπικού πρωτοκόλλου ELISA δίδεται διαγραμματικά στην Εικόνα 9.2. Πρόκειται για ένα πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό αντιγόνου (Ag) το οποίο προσροφάται αρχικά επί του πλαστικού μικροφρεατίου και στη συνέχεια δεσμεύεται διαδοχικά από ένα πρώτο, ειδικό αντίσωμα (1<sup>st</sup> Ab) και ένα δεύτερο αντι-ανοσοσφαιρινικό αντίσωμα, συνδεδεμένο με ένζυμο (2<sup>nd</sup> Ab, enzyme-linked).

#### Γ1. Τυπικά πειραματικά στάδια

**Βήμα 1.** Επίστρωση των μικροφρεατίων του πλακιδίου ELISA με διάλυμα που περιέχει το αντιγόνο (Ag) [π.χ. μία πρωτεΐνη ή ένα μικρομόριο (αππένιο)], ώστε αυτό να προσροφηθεί (μη ειδικά) επί του πλαστικού υποστρώματος (**coating**)

**Βήμα 2.** Κάλυψη κενών/μη ειδικών θέσεων με "αδρανείς" πρωτεΐνες [όπως BSA] (**blocking**)

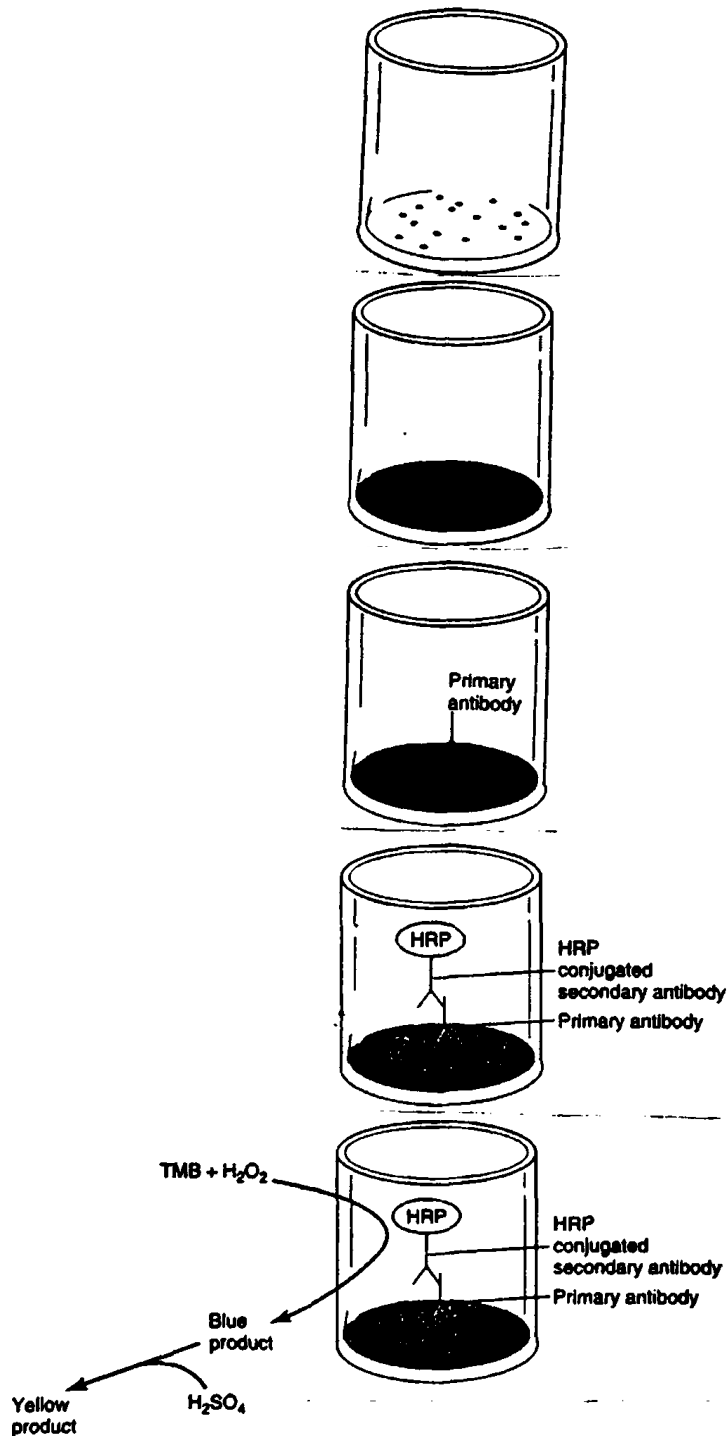
Ακολουθεί απομάκρυνση της περίσσειας αντιγόνου (**washing**)

**Βήμα 3.** Δέσμευση των ειδικών θέσεων (αντιγόνου) με το ειδικό αντίσωμα (πρώτο αντίσωμα) (**primary antibody binding**).



Ακολουθεί απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος (washing)

**Βήμα 4.** Δέσμευση των θέσεων πρώτου αντισώματος με αντι-ανοσοσφαιρινικό αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο (secondary antibody binding).



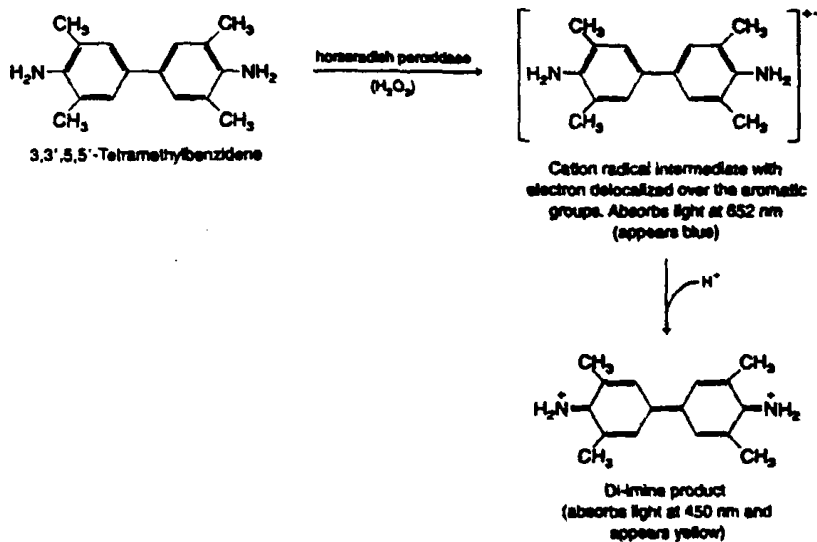
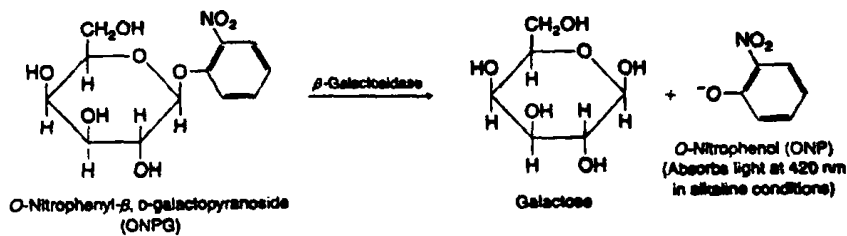
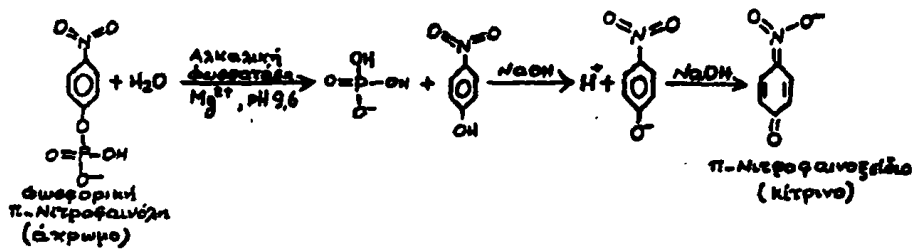
Εικόνα 9.2. Τυπικά πειραματικά βήματα μιας ELISA όπως περιγράφονται στο κείμενο (HRP, υπεροξειδάση, TMB, 3,3',5,5'-τετραμεθυλ-βενζιδένιο) [από Switzer and Garrity, Experimental Biochemistry, Freeman & Co., New York, 1999]



Ακολουθεί απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος (washing)

**Βήμα 5.** Προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος και φωτομετρική ανίχνευση προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης, σε μετρητή πλακιδίου ELISA (**detection**)

Στην ανωτέρω τυπική πειραματική διαδικασία ELISA, χρησιμοποιούνται: (βήματα 1-5), πλαστικό πλακίδιο πολλών μικροφρεατίων (συνήθως 96 θέσεων) (96-well ELISA microtiter plate), **πολυστυρενίου** ή **πολυβινυλικού χλωριδίου (PVC)**



**Εικόνα 9.3.** Τυπικές αντιδράσεις αλκαλικής φωσφατάσης,  $\beta$ -γαλακτοσιδάσης και υπεροξειδάσης που χρησιμοποιούνται συχνά στα πρωτόκολλα ELISA

(βήμα 1), διάλυμα επίστρωσης (coating buffer), δηλ. ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει το αντιγόνο, και (συνήθως) παράγοντες για την αύξηση της αποτελεσματικότητας **προσρόφησης** (adsorption) των μορίων αντιγόνου επί του πλαστικού υλικού, π.χ. ανθρακικά ιόντα, πολυλυσίνη (PLL) κλπ.

(βήμα 2 και βήματα 3-4), οι "αδρανείς" πρωτεΐνες λευκωματίνη ορού βοός (**BSA**), **ζελατίνη** (gelatin) ή **καζεΐνη** (casein), σε υψηλές συγκεντρώσεις, ως παράγοντες μη ειδικής δέσμησης κενών αντιγονικών θέσεων (blocking agents).

(στάδια εκπλύσεων, 2-4), **μη ιοντικά απορρυπαντικά** (κατά κανόνα, **Tween 20**), τα οποία παρεμποδίζουν την μη ειδική πρόσδεση και απομακρύνουν τα μη ειδικώς δεσμευθέντα μόρια από τα τοιχώματα των μικροφρεατίων, **χωρίς να αποδιατάσσουν** τις πρωτεΐνες (αντιγόνα, αντισώματα κλπ.)

(βήμα 3), ειδικό αντίσωμα, **υψηλού τίτλου** (δηλ. ευαισθησίας) και **εξειδίκευσης** ως προς το εξεταζόμενο αντιγόνο. Εναλλακτικά, το αντίσωμα αυτό μπορεί να είναι ιχνηθετημένο με βιοτίνη (βιοτινυλιωμένο) (επιτρέποντας, στη συνέχεια, δέσμηση με συζεύγματα αβιδίνης, για επιπρόσθετη αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης, βλ. Εισαγωγή Γ2)

(βήμα 4), δεύτερο αντίσωμα, συνδεδεμένο με ένζυμο, το οποίο επιτρέπει στη συνέχεια φωτομετρική ανίχνευση προϊόντος, συνήθως **αλκαλική φωσφατάση** ή **υπεροξειδάση** (επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η β-γαλακτοσιδάση) (Εικόνα 9.3)

(βήμα 5), ενζυμικά υποστρώματα (Εικόνα 9.3) τα οποία, κατά την διεξαγωγή της αντίδρασης, μετατρέπονται σε έγχρωμα προϊόντα και μετρώνται **φωτομετρικά** στα αντίστοιχα μήκη κύματος, σε ειδική συσκευή φωτομέτρησης (μετρητή πλακιδίου ELISA)

## **Γ2. Εναλλακτικά πρωτόκολλα**

Το ανωτέρω τυπικό πρωτόκολλο ELISA αναφέρεται σε μέτρηση αντιγόνου (Ag) και χρησιμοποιεί (1) επίστρωση **αντιγόνου** επί του υποστρώματος και (2) την διαδοχική σειρά επωάσεων του τύπου Ag-1<sup>st</sup> Ab-2<sup>nd</sup> Ab (όμοιου με αυτόν της τεχνικής double-layer, Εικόνα 9.1). Ένας κοινός εναλλακτικός τύπος ELISA είναι αυτός της τεχνικής sandwich, δηλ. (1) με επίστρωση **αντισώματος** και (2) διαδοχική σειρά επωάσεων 1<sup>st</sup> Ab-Ag-2<sup>nd</sup> Ab (Εικόνα 9.1), κατά την οποία **δύο διαφορετικοί επίτοποι** του ίδιου αντιγόνου (Ag) αναγνωρίζονται από



δύο διαφορετικά αντισώματα, ένα ακινητοποιημένο σε στερεά φάση (1<sup>st</sup> Ab) και ένα ελεύθερο σε διάλυμα (υγρή φάση) (2<sup>nd</sup> Ab) (**sandwich ELISA**). Η εφαρμογή της τεχνικής sandwich ELISA επιτρέπει περιορισμό των φαινομένων διασταυρούμενης αντίδρασης (cross reactivity) και αύξηση της ευαισθησίας (*ειδικής*) ανίχνευσης του αντιγόνου, με την προϋπόθεση βέβαια ότι χρησιμοποιούνται πλήρως χαρακτηρισμένα αντισώματα, που μπορεί να είναι πολυκλωνικά, καθαρισμένα από παρασκευάσματα αντιορού, ή (συνηθέστερα) μονοκλωνικά (βλ. ανωτέρω, Εισαγωγή Α).

Ενας άλλος συνήθης τύπος τεχνικής είναι αυτός της ανταγωνιστικής ELISA (**competitive ELISA**) ή ELISA αναστολής, κατά την οποία η επώαση για την πρόσδεση του ειδικού αντισώματος (βήμα 3, ανωτέρω) διενεργείται σε σειρά δειγμάτων, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων αντιγόνου στο ανοσοσφαιρινικό διάλυμα. Το αντιγόνο αυτό (αντιγόνο υγρής φάσης) ανταγωνίζεται με το αντιγόνο που έχει ήδη ακινητοποιηθεί επί του πλαστικού υποστρώματος (αντιγόνο στερεάς φάσης) για δέσμευση στις ειδικές θέσεις του αντισώματος. Ο ανταγωνισμός (competition) οδηγεί σε αναστολή (inhibition) της αντίδρασης, ανάλογη προς την συγκέντρωση αντιγόνου υγρής φάσης, η οποία μπορεί να μετρηθεί έμμεσα από την έκταση της αναστολής.

Για την αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης, είναι δυνατόν να διερευνηθεί η τροποποίηση πολλών παραμέτρων (συγγένεια αντισώματος προς το αντιγόνο, καθαρότητα αντιγόνου, πρωτόκολλα απομόνωσης αντιγόνου και παρασκευής αντισώματος, διάλυμα επίστρωσης επί του πλακιδίου, συνθήκες επώασης, συγκέντρωση ενζυμικού υποστρώματος, κλπ.). Συχνή επίσης είναι η τροποποίηση των βημάτων 3-4 (ανωτέρω) με χρήση βιοτινυλιωμένου αντισώματος (ή βιοτινυλιωμένου αντιγόνου, στην εκδοχή της sandwich ELISA) και, στη συνέχεια, συζεύγματος ενζύμου-αβιδίνης. Η τροποποίηση αυτή επιτρέπει αύξηση της ευαισθησίας της ELISA με αξιοποίηση της υψηλής συγγένειας δέσμευσης του συστήματος **αβιδίνης-βιοτίνης** ( $K_D$  της τάξης του  $10^{-15}$  M).

#### **Δ. Εφαρμογές της ELISA**

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η τεχνική της ELISA αποτελεί ισχυρό πειραματικό εργαλείο στην βιοχημική έρευνα και ιδιαίτερα στην κλινική



βιοχημεία και στον τομέα της ιατρικής διαγνωστικής. Οι βασικές εφαρμογές περιλαμβάνουν

(1) προσδιορισμό *αντιγόνου*, δηλ. μικρομορίων (π. χ. φαρμάκων, τοξικών ουσιών, στεροειδών ορμονών, κυτοκινών) ή μακρομορίων (π. χ. πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και ανοσοσφαιρινών, βλ. Πειραματικό μέρος της Άσκησης) σε βιολογικά υγρά, υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειας κλπ.

(2) προσδιορισμό *αντισώματος*, π. χ. προσδιορισμό τίτλου αντισωμάτων αντιορού μετά από ανοσοποίηση πειραματοζώων, ή ανίχνευση αντισωμάτων σε κλινικές εφαρμογές (αντισώματα έναντι λοιμογόνων ή αλλεργιογόνων παραγόντων, αυτοαντισώματα κλπ.)

Για να δοθούν δύο μόνο χαρακτηριστικά παραδείγματα, στον τύπο εφαρμογής (1) ανήκει η ELISA ανίχνευσης της κύησης μέσω προσδιορισμού μιας ορμόνης του πλακούντα, της ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης (hCG), ενώ στον τύπο (2) ανήκει η ELISA ανίχνευσης λοιμώξεων από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV).

Η ELISA που παρουσιάζεται στο Πειραματικό μέρος της Άσκησης 9 αποτελεί μία απλή εφαρμογή ανίχνευσης και προσδιορισμού ανοσοσφαιρινών γ από ορό ανθρώπου. Ακολουθείται η τυπική σειρά βημάτων που αναφέρθηκε ανωτέρω (Εισαγωγή Γ1) με τη διαφορά ότι παρακάμπτεται το βήμα 3, εφόσον το επιστρωμένο "αντιγόνο" (ανοσοσφαιρίνη γ ανθρώπου) παίζει επίσης τον ρόλο του "πρώτου αντισώματος" (1<sup>st</sup> Ab). Για την ανίχνευση χρησιμοποιείται το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση με υπόστρωμα την φωσφορική π-νιτροφαινόλη (PNPP) (βλ. και Ασκήσεις 2-3).

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

*(Οι αναγραφόμενοι αριθμοί πειραματικών βημάτων (1 έως 5) αντιστοιχούν ακριβώς στους αριθμούς των βημάτων ενός τυπικού πρωτοκόλλου ELISA, όπως αναφέρονται και περιγράφονται ανωτέρω, βλ. Εισαγωγή, Γ1)*

### A. Επίστρωση πλακιδίου ELISA (human IgG)

**βήμα 1:** Επίστρωση (Coating). Επώαση: 37 °C, 2 h (ή 0-4 °C, 16 h)



Το πλαστικό πλακίδιο (ELISA microtiter plate) (96 μικροφρεατίων) φέρει εγχάρακτες σημειώσεις συμβόλων (αριθμοί 1-12 και γράμματα A-H) για τον ευχερή εντοπισμό και αρίθμηση των μικροφρεατίων όπου τοποθετούνται τα δείγματα (π. χ. μικροφρεάτια 1A, 1B, 1C, 2E, 2F, 4G, 5H κλπ.). Για κάθε ένα από τα προστιθέμενα δείγματα καταγράφεται ο αντίστοιχος αριθμός μικροφρεατίου. Τα δείγματα προστίθενται ως εξής:

μικροφρεάτιο	δείγμα (διάλυμα ορού ανθρώπου, 0.1 ml, που περιέχει...)	
	[από διάλυμα ορού 10 mg / ml, αραιωθέν σε coating buffer]	
2B	coating buffer	(blank)
3B	coating buffer	
2C	2000 ng (human IgG) / ml	(1:5000)
3C	2000 ng (human IgG) / ml	
2D	1000 ng (human IgG) / ml	(1:10000)
3D	1000 ng (human IgG) / ml	
2E	500 ng (human IgG) / ml	(1:20000)
3E	500 ng (human IgG) / ml	
2F	200 ng (human IgG) / ml	(1:50000)
3F	200 ng (human IgG) / ml	
2G	100 ng (human IgG) / ml	(1:100000)
3G	100 ng (human IgG) / ml	
4B	10 ng (human IgG) / ml	(1:1000000)
5B	10 ng (human IgG) / ml	
4C	1 ng (human IgG) / ml	(1:10000000)
5C	1 ng (human IgG) / ml	
4D	0.1 ng (human IgG) / ml	(1:100000000)
5D	0.1 ng (human IgG) / ml	
4E	coating buffer	(blank)
5E	coating buffer	
4F	άγνωστο-1	(unknown)
5F	άγνωστο-1	
4G	άγνωστο-2	
5G	άγνωστο-2	



6B	500 ng (human IgG) / ml	(1:20000)
7B	500 ng (human IgG) / ml	
6C	500 ng (human IgG) / ml	
7C	500 ng (human IgG) / ml	
6D	500 ng (human IgG) / ml	
7D	500 ng (human IgG) / ml	
6E	500 ng (human IgG) / ml	
7E	500 ng (human IgG) / ml	
6F	500 ng (human IgG) / ml	
7F	500 ng (human IgG) / ml	
6G	500 ng (human IgG) / ml	
7G	500 ng (human IgG) / ml	

(Η σειρά δειγμάτων των στηλών 8 και 9 θα χρησιμοποιηθεί για μέτρηση τίτλου του αντισώματος αντι-IgG, βλ. κατωτέρω, Πειραματικό μέρος Γ)

*Coating buffer = NaHCO<sub>3</sub> / Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.05 M, pH 9.6*

#### **B. Κάλυψη κενών/μη ειδικών θέσεων (blocking)**

βήμα 2: Κάλυψη κενών θέσεων (blocking). Επώαση: 37 °C, 45 min

Μετά την προσρόφηση του αντιγόνου (serum IgG) (δηλ. μετά το πέρας του σταδίου επίστρωσης), ακολουθεί στέγνωμα των μικροφρεατίων του πλακιδίου (με έντονη ανατύπηση επί φύλλων διηθητικού χάρτου) και προσθήκη διαλύματος που περιέχει λευκωματίνη ορού βοός (**BSA**) (συνήθως, BSA fraction V) (blocking buffer), 0.1 ml ανά φρεάτιο.

*Blocking buffer = φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), που περιέχει BSA, 3% (w/v)*

*PBS = KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 M, NaCl, 0.138 M, KCl, 0.0027 M, pH 7.2*

Ακολουθεί απομάκρυνση της περίσσειας αντιγόνου/αντισώματος (washing). Τρεις εκπλύσεις, μετά από στέγνωμα των μικροφρεατίων του πλακιδίου, όπως προηγουμένως.

*Washing buffer = PBS, pH 7.2, Tween-20, 0.01% (v/v)*





### Γ. Επώαση με το [δεύτερο] αντίσωμα (anti-human IgG, AP-linked)

**βήμα 4 (παρακάμπτεται το βήμα 3):** Προσθήκη αντισώματος (goat anti-human IgG), συνδεδεμένου με αλκαλική φωσφατάση (AP). Επώαση: 37 °C, 30 min  
Η σειρά προσθήκης έχει ως εξής (βλ. και Πειραματικό μέρος, Α):

μικροφρεάτιο	AP-linked anti-human IgG, 0.1 ml, σε αρραίωση... [σε antibody incubation buffer]
σειρά στηλών 2-3	1:1000 (τελική συγκέντρωση αντι-IgG, 1 µg/ml)
σειρά στηλών 4-5	1:1000
σειρά στηλών 6-7	1:50 (6B, 7B)
	1:200 (6C, 7C)
	1:500 (6D, 7D)
	1:2000 (6E, 7E)
	1:10000 (6F, 7F)
	antibody incubation buffer (6G, 7G)

*Antibody incubation buffer = PBS, pH 7.2, 0.1% (w/v) BSA, 0.01% (v/v) Tween-20 (βλ. και Εισαγωγή, Β)*

Ακολουθεί απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος (washing). Τρεις εκπλύσεις, μετά από στέγνωμα των μικροφρεατίων του πλακιδίου, όπως προηγουμένως.

*Washing buffer = PBS, pH 7.2, Tween-20, 0.01% (v/v)*

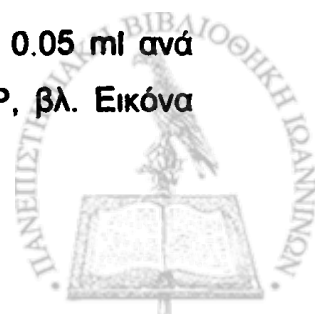
### Δ. Ενζυμική αντίδραση και φωτομέτρηση προϊόντος

**βήμα 5:** Ενζυμική αντίδραση ανίχνευσης (detection). Επώαση: Θερμοκρασία δωματίου, 15-45 min (διακόπτεται κατά τις οδηγίες του επιβλέποντα, ανάλογα με την πρόοδο της αντίδρασης, η οποία παρακολουθείται οπτικά)

Προστίθεται διάλυμα φωσφορικής π-νιτροφαινόλης (PNPP), 0.065 ml ανά φρεάτιο. Παρακολουθείται η εμφάνιση υποκιτρίνου χρώματος.

*Διάλυμα PNPP = PNPP (1 mg/ml) σε buffer διαιθανολαμίνης (1 M), περιέχον MgCl<sub>2</sub> (1 mM), pH 9.6 (βλ. και Ασκήσεις 2-3).*

Η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη NaOH (3 M), 0.05 ml ανά φρεάτιο, και μετράται η οπτική πυκνότητα του προϊόντος (PNP, βλ. Εικόνα



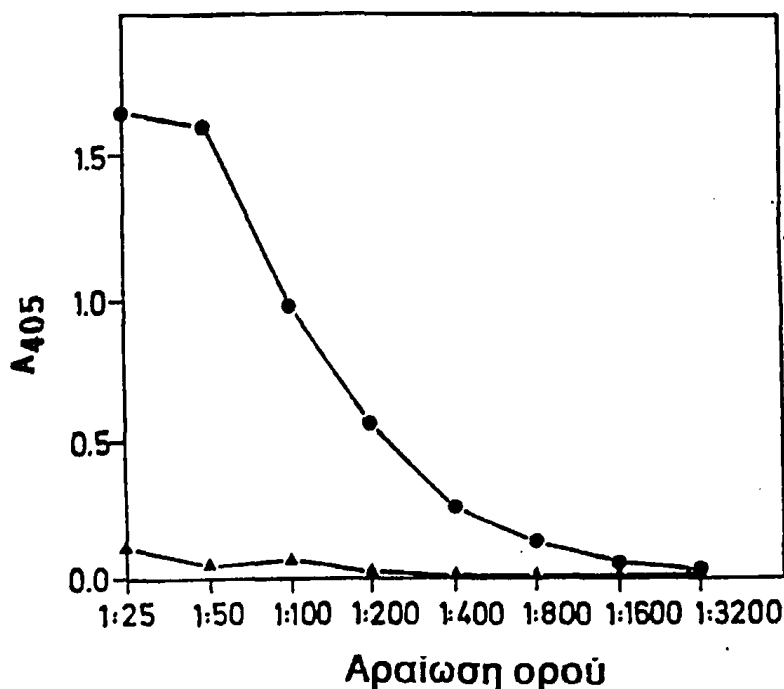
9.3) σε μήκος κύματος 405 nm ( $O.D._{405nm}$ ). Η φωτομέτρηση γίνεται σε μετρητή πλακιδίου ELISA (ELISA reader) της εταιρείας Awareness Technology (τύπου StatFax 2100).

### Ε. Γραφικές παραστάσεις και επεξεργασία των δεδομένων

Από τα δεδομένα της φωτομέτρησης, θα κατασκευασθούν τα εξής διαγράμματα:

#### Ε1. Τίτλος αντισώματος αντι-IgG

Διάγραμμα της  $O.D._{405nm}$  συναρτήσει της αραίωσης του αντισώματος αντι-IgG (δεδομένα από τη σειρά στηλών 6 και 7, Πειραματικό μέρος, Γ). Από αυτό μπορεί να υπολογισθεί η ελάχιστη συγκέντρωση αντι-IgG (δηλ. μέγιστη αραίωση του διαλύματος αντι-IgG) που δίδει  $O.D._{405nm}$  στατιστικά υψηλότερες των  $O.D._{405nm}$  αρνητικού ελέγχου (φρεάτια 6G και 7G). Η μέγιστη τιμή αραίωσης αντισώματος που προσδιορίζεται με τον ανωτέρω τρόπο ονομάζεται τίτλος (titer) του αντισώματος και η καμπύλη της ανωτέρω συνάρτησης καμπύλη τιτλοδότησης αντισώματος (titration curve). Τιμές αραίωσης μικρότερες ή ίσες της τιμής τίτλου (titer) είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως αραιώσεις "εργασίας" (working dilutions) σε αντίστοιχα



**Εικόνα 9.5.** Παράδειγμα καμπύλης τιτλοδότησης αντισώματος σε πείραμα ELISA [από Διδακτορική Διατριβή που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων Ιατρική Σχολή, Ευστάθιος Φριλίγγος, 1990]



πειράματα ELISA, εφόσον βέβαια αναφέρονται στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης τιτλοδότησης (titration curve) (Εικόνα 9.5). Στις σειρές φρεατίων των στηλών 2-3 και 4-5 χρησιμοποιήθηκε ως working dilution η αραιώση 1:1000 (συγκέντρωση αντι-IgG, 1  $\mu\text{g/ml}$ ).

## **E2. Συγκέντρωση IgG αγνώστου δείγματος**

Διάγραμμα της  $O.D._{405\text{nm}}$  συναρτήσει της συγκέντρωσης IgG ("αντιγόνου" στην περίπτωση αυτή) (δεδομένα από τις σειρές στηλών 2-3 και 4-5, Πειραματικό μέρος, Α). Από το διάγραμμα αυτό μπορεί να υπολογισθεί η συγκέντρωση IgG των αγνώστων δειγμάτων (φρεάτια 4F-5F και 4G-5G).



## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ

### Πειραματικό μέρος E1:

Φρεάτιο	Αραίωση αντι-IgG (v/v)	A <sub>405</sub> nm
6B	1:50	
7B	1:50	
6C	1:200	
7C	1:200	
6D	1:500	
7D	1:500	
6E	1:2000	
7E	1:2000	
6F	1:10000	
7F	1:10000	
6G	χωρίς αντι-IgG	
7G	χωρίς αντι-IgG	

### Πειραματικό μέρος E2:

Φρεάτιο	[IgG] (ng/ml)	A <sub>405</sub> nm
2B	0	
3B	0	
2C	2000	
3C	2000	
2D	1000	
3D	1000	
2E	500	
3E	500	
2F	200	
3F	200	
2G	100	
3G	100	
4B	10	
5B	10	



## ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ (συνέχεια)

Φρεάτιο	[IgG] (ng/ml)	A <sub>405 nm</sub>
4C	1	
5C	1	
4D	0.1	
5D	0.1	
4E	0	
5E	0	
4F	άγνωστο-1	
5F	άγνωστο-1	
4G	άγνωστο-2	
5G	άγνωστο-2	

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Πειραματικό μέρος E1:

Καμπύλη τίτλου (διάγραμμα O.D.<sub>405 nm</sub> συναρτήσει της αραίωσης αντι-IgG)  
(από τα δεδομένα 6B έως 7G)

Πειραματικό μέρος E2:

Διάγραμμα της O.D.<sub>405 nm</sub> συναρτήσει της συγκέντρωσης human IgG (ng/ml)  
(από τα δεδομένα 2B έως 5E)

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Προσδιορισμός συγκέντρωσης αγνώστου-1 (4F,5F) και αγνώστου-2 (4G,5G)  
(σε ng/ml ισοδυνάμων human IgG) από το διάγραμμα του Πειρ. μέρους E2.  
Για κάθε άγνωστο, θα ληφθεί ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.



## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΠΕΔΩΣΗΣ

Πειραματικό μέρος Α:

1. Αναφέρατε ένα παράδειγμα εφαρμογής της ELISA για τον προσδιορισμό αντισώματος. Αναφέρατε ένα παράδειγμα εφαρμογής της ELISA για τον προσδιορισμό αντιγόνου.

Πειραματικό μέρος Β-Γ:

2. Ποιος είναι ο ρόλος της αλβουμίνης (BSA);
3. Ποιο είναι το πλεονέκτημα της χρήσης του συστήματος αβιδίνης-βιοτίνης σε μία ELISA; Ποια τροποποίηση απαιτείται για να είναι δυνατή η εφαρμογή ενός τέτοιου συστήματος;
4. Τι ονομάζεται ELISA αναστολής;

Πειραματικό μέρος Δ:

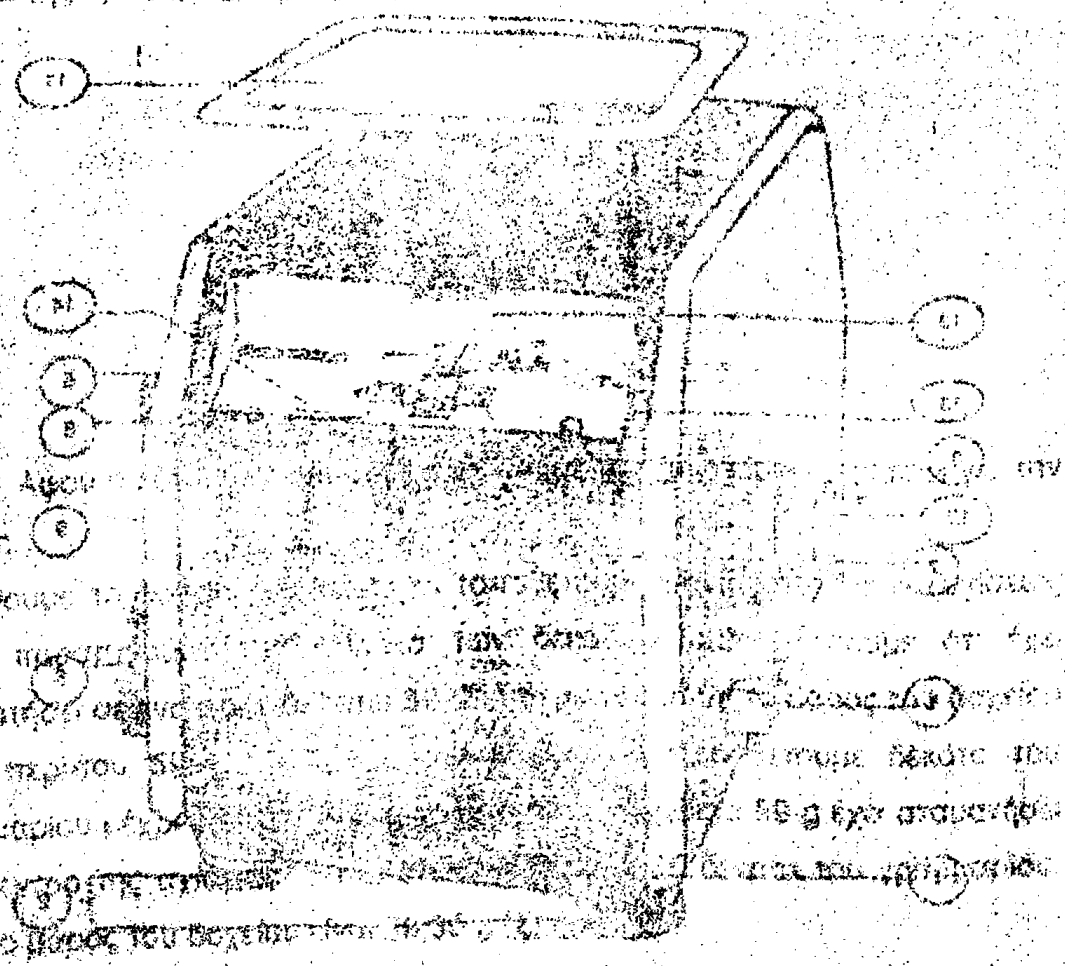
5. Ποια ένζυμα χρησιμοποιούνται συνήθως στην τεχνική ELISA;

Πειραματικό μέρος Ε:

6. Ποια είναι η πειραματική αξία της καμπύλης τιτλοδότησης; Τι ονομάζεται τίτλος αντισώματος;

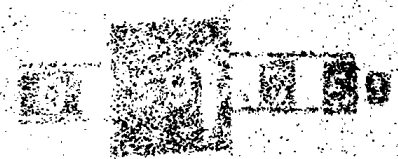


Η ορθότητα του τύπου προκύπτει από τους κοινούς σημείους  
 στη σελίδα 3 του (2), ή φέρει (3) πρόσημα κλειστά στο τέλος του  
 λόγου. Αποδοχή μέσω σημείων του πακέτου (4), στην περίπτωση που  
 συμπεριλάβει κολλητή κάρτα με αριθμό οργάνου Q του  
 προκύπτει στο τέλος του...  
 (5) οργάνου...  
 (6) οργάνου...  
**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**  
 κατά τον...  
 κέντρο της οχλήσης...



Από...  
 ζυγισ...  
 Παρουσιάζει...  
 (11)...  
 στοιχείο...  
 είναι...  
 η...  
 στο...  
 από το... του...

Σχήμα 1



Σχήμα 2

στο (1) πρόσημο να γίνεται με τον...  
 Σχήμα 2

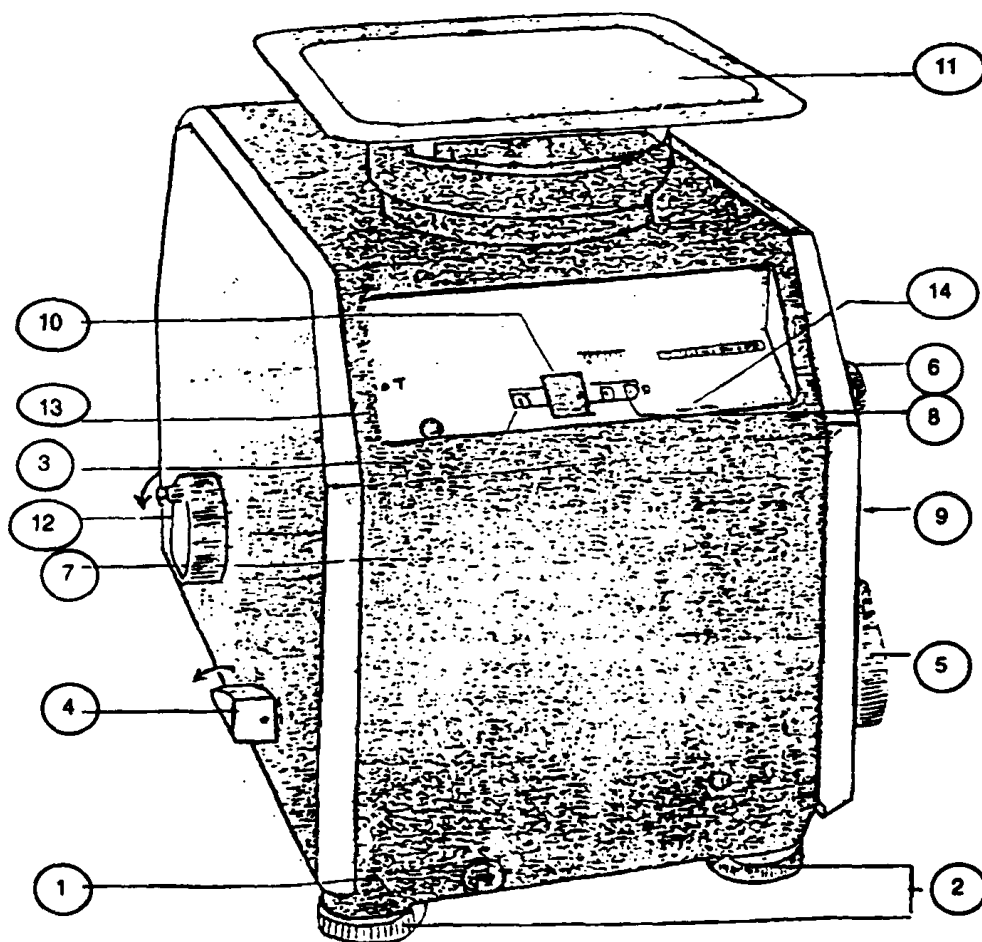


## Παράρτημα 1

### ΖΥΓΟΣ

Ο ζυγός είναι όργανο ακριβείας. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του βάρους στερεών και υγρών.

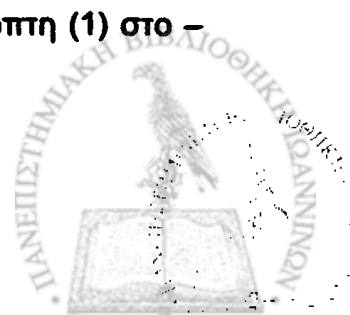
Η προς ζύγιση ουσία τοποθετείται σε καθαρό γυάλινο δοχείο του οποίου η θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβαίνει αυτή του περιβάλλοντος. Ο ηλεκτρονικός ζυγός φαίνεται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1.

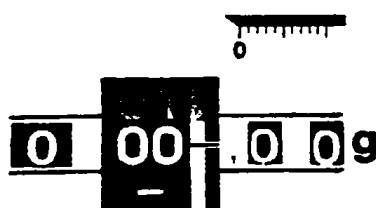
### Δοκιμασία Ζυγίσεως

Θέτουμε τον ζυγό σε λειτουργία τοποθετώντας τον διακόπτη (1) στο ON-.





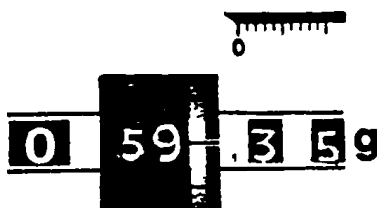
Η οριζοντίωση του ζυγού ρυθμίζεται από τους κοχλίες που βρίσκονται στη βάση του (2). Η φυσαλίδα (3) πρέπει να ισορροπεί στην μέση του κύκλου. Απασφαλίζουμε στρίβοντας τον μοχλό (4), στην αριστερή πλευρά του ζυγού προς τα κάτω. Μηδενίζουμε τα σταθμά με τους δύο κοχλίες που βρίσκονται στα πλάγια του ζυγού (5, 6). Ο κοχλίας (5) ρυθμίζει τις εκατοντάδες (7) και ο κοχλίας (6) τα εκατοστά (8). Μεταξύ των δύο αυτών κοχλιών υπάρχει ένας πιο μικρός (9) που χρησιμεύει για την ρύθμιση των δεκάδων (10). Πρέπει κατά τον μηδενισμό η γραμμή που δείχνει τις δεκάδες να είναι ακριβώς στο κέντρο της σχισμής (Σχήμα 2):



Σχήμα 2

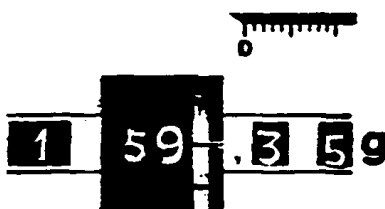
Αφού οριζοντιώσουμε και μηδενίσουμε τον ζυγό είμαστε έτοιμοι για την ζύγιση.

Παίρνουμε το δοχείο ζυγίσεως, το τοποθετούμε πάνω στο δίσκο ζυγίσεως (11), παρατηρούμε την κλίμακα των δεκάδων (10) βλέπουμε ότι έχει σταματήσει σε ένα αριθμό, έστω 59. Συμπεραίνουμε ότι το βάρος του δοχείου είναι περίπου 59 g. Τώρα με τον κοχλία (9) προσθέτουμε δέκατα του γραμμαρίου μέχρι να δούμε ότι η γραμμή που δείχνει τα 59 g έχει σταματήσει στο κέντρο της σχισμής. Έστω ότι προσθέσαμε 35 δέκατα του γραμμαρίου. Άρα το βάρος του δοχείου είναι 59,35 g (Σχήμα 3):



Σχήμα 3

Στη συνέχεια γυρίζουμε το μοχλό (12) αριστερά μέχρι να ανάψει το κόκκινο λαμπάκι (13). Έτσι μηδενίζουμε το βάρος του δοχείου ζυγίσεως και είμαστε έτοιμοι να ζυγίσουμε την επιθυμητή ουσία, η οποία τώρα προστίθεται στο δοχείο ζυγίσεως. Αν το βάρος της είναι γνωστό π.χ. 159,35 g προσθέτουμε 1 εκατοντάδα στην κλίμακα (7) και 35 εκατοστά στην κλίμακα (8). Στην συνέχεια προσθέτουμε την ουσία μέχρι η κλίμακα (10) να δείξει τον αριθμό 59 (σχήμα (4)). Έτσι η ζύγιση τελειώνει.



Σχήμα 4.

Αφαιρούμε το φιαλίδιο από το δίσκο ζυγίσεως, επαναφέρουμε τον μοχλό (12) στην αρχική του θέση (σβήνει το λαμπάκι), μηδενίζουμε τα σταθμά και κλείνουμε τον διακόπτη λειτουργίας του ζυγού.

#### Σημείωση

1. Δεν ζυγίζουμε ποτέ θερμά σώματα.
2. Δεν τοποθετούμε στον δίσκο ζυγίσεως αντικείμενα βαρύτερα από όσο μπορεί να ζυγίσει ο ζυγός (14).

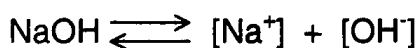
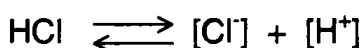
**ΠΕΧΑΜΕΤΡΟ**

Το pH ενός διαλύματος είναι ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκεντρώσεως ιόντων  $H^+$  του διαλύματος:  $pH = -\log[H^+]$ . Αυτό σημαίνει πως το pH είναι ο δείκτης της οξύτητας ή αλκαλικότητας ενός διαλύματος, δηλ τα αλκαλικά ή τα όξινα διαλύματα εξαρτώνται από την συγκέντρωση ιόντων  $[H^+]$  και  $[OH^-]$ . Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των  $H^+$ , τόσο ελαττώνεται η συγκέντρωση των  $OH^-$  και το διάλυμα γίνεται όξινο και αντίστροφα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των  $OH^-$ , η συγκέντρωση των  $H^+$  ελαττώνεται και το διάλυμα γίνεται αλκαλικό.

Το pH εκφράζεται ποσοτικά σε μια κλίμακα αριθμών από το 0 έως το 14. Η περιοχή της κλίμακας από το 0 έως 7 αναφέρεται στα όξινα διαλύματα που έχουν γεύση όξινη π.χ. ξύδι, λεμόνι, κ.λ.π.

Η τιμή 7 αντιστοιχεί σε ουδέτερα διαλύματα π.χ. καθαρό νερό. Η περιοχή από το 7 έως το 14 αντιστοιχεί σε αλκαλικά διαλύματα που δίνουν συνήθως την αίσθηση του σαπουνιού. Μαγειρική σόδα διαλυμένη σε νερό σχηματίζει αλκαλικό διάλυμα με pH περίπου 9.

Όταν ένα οξύ ή μια βάση βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα τότε έχουμε διάσταση σε υδρογονοϊόντα ή υδροξυλιόντα αντίστοιχα:



Η διάσταση αυτή γίνεται με βάση μια σταθερά, την σταθερά διαστάσεως. Η σταθερά διαστάσεως δεν είναι βέβαια η ίδια για όλα τα οξέα και για όλες τις βάσεις. Οξέα όπως το  $HCl$ ,  $HNO_3$ ,  $H_2SO_4$  και βάσεις όπως το  $NaOH$ , το  $KOH$  διίστανται πλήρως και γι αυτό καλούνται ισχυρά οξέα και ισχυρές βάσεις αντίστοιχα.

Οξέα όπως το  $CH_3COOH$  και βάσεις όπως το  $Ba(OH)_2$  διίστανται ελάχιστα και καλούνται ασθενή οξέα και ασθενείς βάσεις αντίστοιχα.

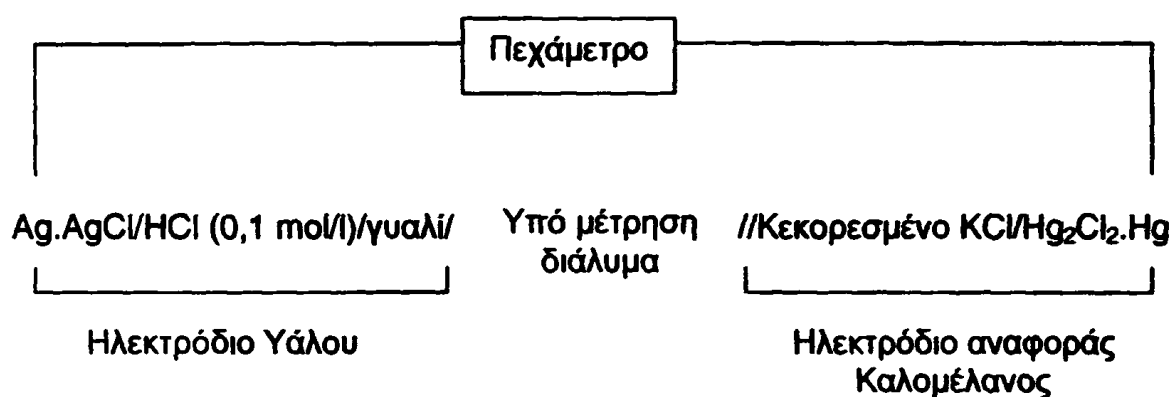


## Μέτρηση του pH

Η μέτρηση του pH μπορεί να γίνει με τους δείκτες που ανάλογα με την αλλαγή του χρώματός τους εντοπίζουν περίπου την περιοχή της τιμής του pH, χωρίς όμως μεγάλη ακρίβεια.

Η ακριβής τιμή του pH μετρείται με ειδικά όργανα τα πεχάμετρα (pH-meters).

Η λειτουργία των πεχαμέτρων στηρίζεται στην διαφορά δυναμικού που σχηματίζει ένα βολταϊκό κύτταρο, που αποτελείται από ένα διάλυμα γνωστού pH (0,1 N HCl), μια μεμβράνη υάλου ευαίσθητη σε ιόντα  $H^+$ , το διάλυμα που θέλουμε να μετρήσουμε και ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς. Όταν το ένα διάλυμα κρατηθεί σταθερό (στο εσωτερικό της μεμβράνης) τότε το δυναμικό της μεμβράνης μεταβάλλεται μόνο με το pH του εξωτερικού διαλύματος (Σχήμα 1).



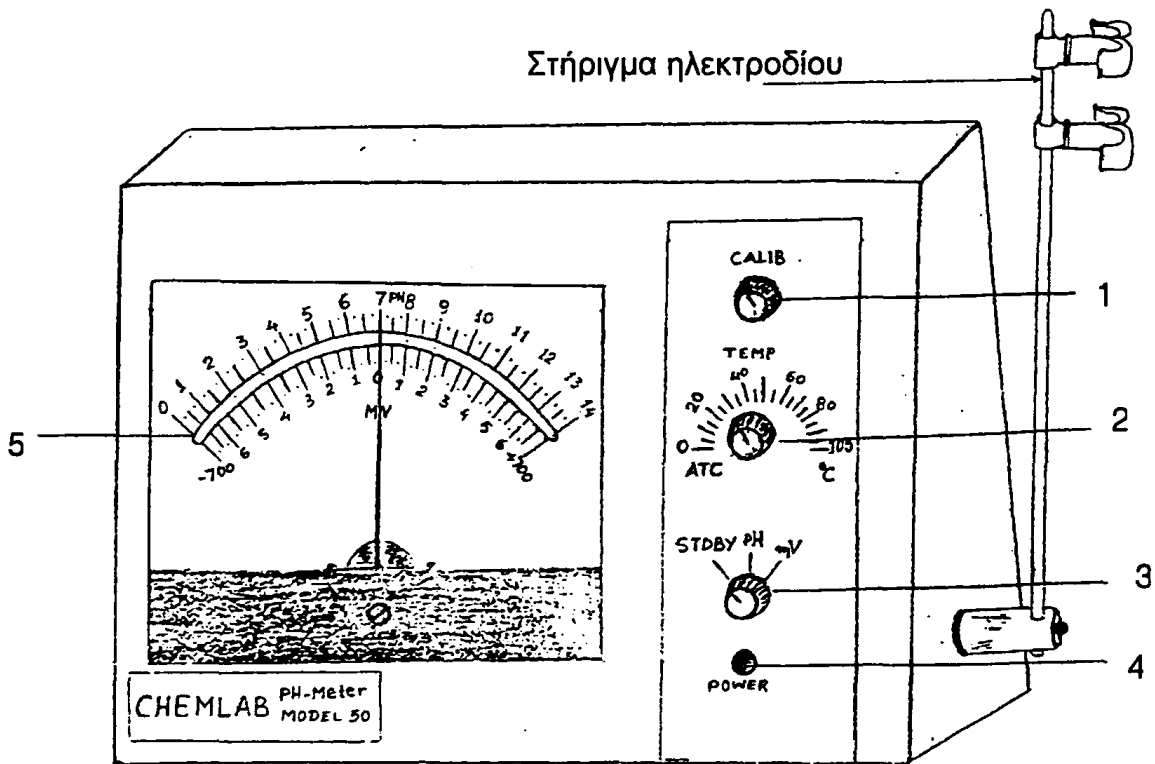
Σχήμα 1. Ηλεκτροχημικό σύστημα του ηλεκτροδίου του πεχαμέτρου

Υπάρχουν διάφορα είδη πεχαμέτρων. Ένα από αυτά που θα χρησιμοποιήσουμε στο εργαστήριο φαίνεται στο σχήμα 2. Βασικά, όλα τα πεχάμετρα αποτελούνται από δύο μέρη:

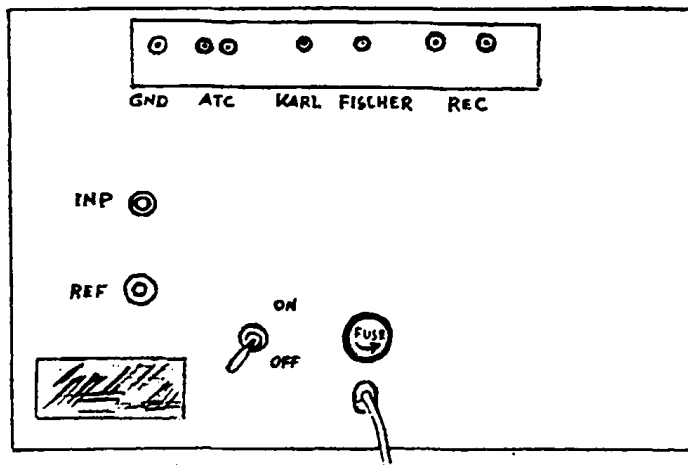
A. Το πλαίσιο στο οποίο υπάρχουν τα διάφορα κουμπιά ρυθμίσεως, η κλίμακα βαθμολογήσεως και ο διακόπτης λειτουργίας του πεχαμέτρου.

B. Το ηλεκτρόδιο υάλου και αναφοράς.

Σχήμα 2. Πεχάμετρο με κλίμακα



Σχήμα 3. Πίσω όψη του πεχαμέτρου



## A. Κουμπιά ρυθμίσεως πεχαμέτρου

Στο σχήμα 1 φαίνονται παραστατικά τα διάφορα κουμπιά και οι διακόπτες ρυθμίσεως του πεχάμετρου. Η χρήση τους είναι η ακόλουθη:

- 1) Κουμπί βαθμολογήσεως (calibration). Χρησιμοποιείται όταν το όργανο λειτουργεί σαν πεχάμετρο για την ρύθμισή του ως προς διάλυμα γνωστού pH (calibration buffer), βλ. σημείωση.
- 2) Κουμπί θερμοκρασίας (temperature). Καλύπτει την περιοχή από 0 έως 100°C. Πρέπει πάντοτε να τοποθετείται στην θερμοκρασία που βρίσκεται το υπό μέτρηση διάλυμα (θερμοκρασία περιβάλλοντος), γιατί το pH εξαρτάται από την θερμοκρασία του διαλύματος. Όταν το κουμπί είναι στην θέση (ATC), το όργανο μπορεί να δεχθεί εξάρτημα αυτόματης ρύθμισης θερμοκρασίας.
- 3) Διακόπτης επιλογής λειτουργίας. Όταν είναι στην θέση (pH) το όργανο χρησιμοποιείται σαν πεχάμετρο. Στην θέση (mV) χρησιμοποιείται σαν mv-μετρο. Στην θέση (STDBY) το όργανο προθερμαίνεται.
- 4) Ενδεικτική λυχνία που ανάβει όταν στο όργανο παρέχεται τάση (POWER).
- 5) Κλίμακα βαθμολογήσεως. Όταν ο διακόπτης επιλογής είναι στη θέση (pH) οι μετρήσεις που παίρνουμε αντιστοιχούν στην επάνω κλίμακα (0-14). Όταν είναι στη θέση (mv) οι μετρήσεις αντιστοιχούν στη κάτω κλίμακα (-700 έως +700 mV). Ο καθρέπτης μεταξύ δύο περιοχών επιτρέπει να γίνεται ανάγνωση της κλίμακας χωρίς σφάλμα παραλλάξεως.

Στο πίσω μέρος του οργάνου (σχήμα 3) υπάρχει διακόπτης λειτουργίας (ON-OFF) και διάφορες είσοδοι από τις οποίες μας ενδιαφέρει προς το παρόν η είσοδος του ηλεκτροδίου ή άλλου (INPUT), και (REF).

## B. Ηλεκτρόδιο υάλου και καλομέλανος

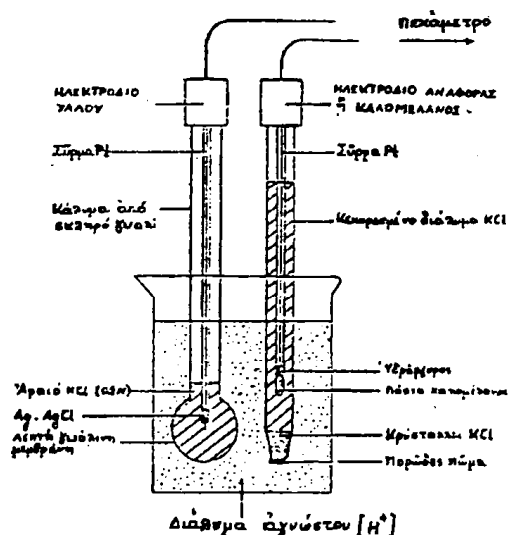
Το ηλεκτρόδιο υάλου είναι κατασκευασμένο από ειδικό γυαλί που αποτελείται από λειωμένο SiO<sub>2</sub> με προσθήκη οξειδίων διαφόρων μετάλλων.



Το ηλεκτρόδιο καταλήγει σε μια πολύ λεπτή μεμβράνη. Το πάχος των μεμβρανών γενικώς κυμαίνεται στα 50-100  $\mu\text{M}$ . Η μεμβράνη αυτή έχει πολύ μεγάλη αντίσταση (10-80  $\text{M}\Omega$ ) η οποία αυξάνεται όταν ελαττώνεται η θερμοκρασία, γι αυτό το πεχάμετρο πρέπει να ρυθμίζεται στην θερμοκρασία του περιβάλλοντος κατά τις μετρήσεις.

Οι μεμβράνες ανάλογα με την σύνθεσή τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ιόντα  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ . Επίσης είναι γνωστά ειδικά ηλεκτρόδια για την άμεση μέτρηση  $\text{Ca}^{2+}$  και ορισμένων ανιόντων όπως τα  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  και άλλων. Στο εσωτερικό της μεμβράνης υπάρχει ένα διάλυμα 0,1 M  $\text{HCl}$  (σχήμα 4).

Το ηλεκτρόδιο καλομέλανος αποτελείται από υάλινο σωλήνα με ένα πορώδες πώμα το οποίο συγκρατεί κορεσμένο διάλυμα  $\text{KCl}$  (με κρυστάλλους  $\text{KCl}$ ). Το κυρίως ηλεκτρόδιο που αποτελείται από σύρμα πλατίνας συνδεδεμένο με υδράργυρο και πάστα καλομέλανος είναι βυθισμένο στο διάλυμα  $\text{KCl}$ .



**Σχήμα 4.** Σύστημα ηλεκτροδίων για τη μέτρηση του pH

Στην πράξη, για ευκολία, τα δύο αυτά ηλεκτρόδια δηλ. το ηλεκτρόδιο υάλου και το ηλεκτρόδιο αναφοράς βρίσκονται μέσα σε ένα σωλήνα που ονομάζεται ηλεκτρόδιο συνδυασμού (combination electrode).



Εκτός όμως από το pH και άλλοι παράγοντες επηρεάζουν το δυναμικό. Αυτοί είναι: η σύνθεση της μεμβράνης, ο τρόπος κατασκευής της και φυσικά η θερμοκρασία. Το σφάλμα από αυτές τις ατέλειες διορθώνεται κατά την ώρα που κάνουμε τις μετρήσεις με το κουμπί 3 (CALIB). Η διόρθωση γίνεται με αναφορά σε διάλυμα γνωστού pH (buffer solution). Εκτός όμως από τα σφάλματα αυτά είναι γνωστό και το αλκαλικό σφάλμα. Αυτό παρατηρείται κατά τις μετρήσεις ισχυρών διαλυμάτων και κυρίως NaOH σε περιοχή pH>10. Γενικά πρέπει να αποφεύγεται η μέτρηση ισχυρών αλκαλικών διαλυμάτων με τα ηλεκτρόδια υάλου, διότι η παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης ιόντων Na<sup>+</sup> επηρεάζει την ένδειξη του πεχαμέτρου.

Πηγαίνοντας από το ένα διάλυμα στο άλλο, το μόνο που αλλάζει είναι η συγκέντρωση H<sup>+</sup>. Κάθε διαφορά ενδείξεως του οργάνου οφείλεται στην αλλαγή συγκεντρώσεως ιόντων H<sup>+</sup>.

Το δυναμικό των στοιχείων σε mV μετατρέπεται στην κλίμακα του βολταμέτρου σε μονάδες pH. Μια μονάδα pH ισούται με κίνηση της βελόνας που αντιστοιχεί σε αλλαγή περίπου 59 mV.

Στο εργαστήριο θα χρησιμοποιήσουμε και ψηφιακά πεχάμετρα, τα οποία βασίζονται στις ανωτέρω αρχές αλλά είναι απλούστερα στον χειρισμό τους.

Για να μετρήσουμε το pH ενός διαλύματος ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία.

1. Συνδέουμε τον ρευματολήπτη του οργάνου με την παροχή ηλεκτρικού ρεύματος.
2. Τοποθετούμε τον διακόπτη επιλογής στη θέση (STDBY).
3. Ελέγχουμε αν ο ακροδέκτης του ηλεκτροδίου είναι καλά τοποθετημένος στην είσοδό του (πίσω μέρος του οργάνου).
4. Στρέφουμε τον διακόπτη ON-OFF στη θέση ON και περιμένουμε δέκα λεπτά για να θερμανθεί το όργανο.
5. Τοποθετούμε τον διακόπτη επιλογής στην θέση (pH).
6. Βυθίζουμε το ηλεκτρόδιο στο διάλυμα (buffer) γνωστού pH αφού πρώτα πλύνουμε με απεσταγμένο νερό, χρησιμοποιώντας τον υδροβολέα. Προσέχουμε να μην αγγίζουμε την μεμβράνη στα





τοιχώματα του ποτηριού ή σε άλλα αντικείμενα γιατί είναι πολύ εύθραυστη και θέλει μεγάλη προσοχή.

7. Ρυθμίζουμε το κουμπί θερμοκρασίας με την θερμοκρασία του buffer. Αυτή συνήθως είναι 20-25°C.
8. Με το κουμπί (CALIB) ρυθμίζουμε την τιμή του buffer π.χ. pH=4 ή pH=7, προσέχοντας την παραλλαγή, δηλαδή η βελόνα και το ομοίωμα της στον καθρέπτη, πρέπει να βρίσκονται στην ίδια γραμμή με το μάτι. (Η διαδικασία αυτή γίνεται κανονικά μια φορά την ημέρα, πριν αρχίσουμε τις μετρήσεις).
9. Τοποθετούμε τον διακόπτη επιλογής στην θέση (STDBY).
10. Βγάζουμε το ηλεκτρόδιο από το buffer και το ξεπλένουμε καλά με απεσταγμένο νερό χρησιμοποιώντας τον υδροβολέα ή με το υπό μέτρηση διάλυμα για να μην μολυνθεί από το προηγούμενο και αλλάξει η πραγματική τιμή του pH.
11. Τοποθετούμε το υπό μέτρηση διάλυμα σε ποτήρι ζέσεως των 25, 100, ή 250 ml.
12. Με τον μαγνητικό αναδευτήρα αναδεύουμε πολύ καλά το διάλυμα ώστε το pH να είναι το ίδιο σε όλα τα σημεία.
13. Τοποθετούμε τον διακόπτη επιλογής στην θέση (pH).
14. Βυθίζουμε το ηλεκτρόδιο στο διάλυμα (προσοχή στον αναδευτήρα) και σημειώνουμε την ένδειξη που δείχνει η βελόνα στην κλίμακα pH.
15. Μετά την μέτρηση ξεπλένουμε καλά το ηλεκτρόδιο με απεσταγμένο νερό (υδροβολέας) και βυθίζουμε το ηλεκτρόδιο (μόνο το κάτω μέρος) δηλ. την μεμβράνη, σε ποτήρι ζέσεως με απεσταγμένο νερό όπου και θα μείνει μέχρι την επόμενη μέτρηση.

Σημείωση: Σύσταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων

A) Φωσφορικό ρυθμιστικό, για pH=7,00 στους 25°C.

B) Φθαλικό ρυθμιστικό, (0.05 M όξινο φθαλικό κάλιο, (KHC<sub>8</sub>O<sub>4</sub>H<sub>4</sub>) για pH=4,008 στους 25°C. Ενδεικτικό χρώμα ρόδινο.



ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

Η περιστροφή ενός σώματος γύρω από κεντρικό άξονα έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας φυγοκέντρου δυνάμεως, που ασκείται πάνω στο αντικείμενο. Αν το αντικείμενο είναι ένα μόριο μάζας  $M$  τότε:

$$\text{Φυγόκεντρος δύναμη} = M \cdot \omega^2 \cdot r$$

Όπου  $\omega$ , η γωνιακή ταχύτητα και  $r$  η ακτίνα περιστροφής.

Το φαινόμενο αυτό δηλ. της αναπτύξεως φυγοκέντρου δυνάμεως σε ένα αντικείμενο που περιστρέφεται, χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία, π.χ. για να απομονώσουμε μια ουσία από ένα διάλυμα μέσα στο οποίο βρίσκεται αιωρημένη ή για να βρούμε το Μ.Β. της. Μια ουσία για να μπορεί να φυγοκεντρηθεί θα πρέπει να έχει Μ.Β. μεγαλύτερο απ'αυτό του διαλύτη της, οπότε σύμφωνα με τον παραπάνω τύπο εξασκείται επάνω της μεγαλύτερη φυγόκεντρη δύναμη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση της ουσίας στον πυθμένα του σωλήνα της φυγοκέντρωσης, ενώ ο διαλύτης βρίσκεται στο υπερκείμενο. Κάθε αιώρημα ή διάλυμα μακρομορίων φυγοκεντρείται σε διαφορετικές τιμές στροφών ανά λεπτό (rpm) ή g ανάλογα με τη φύση και το είδος των διαλυμένων σωματιδίων του. Επίσης ο χρόνος φυγοκέντρωσης ποικίλει ανάλογα με το υγρό. Όπως φαίνεται και παραπάνω, κάθε διαδικασία φυγοκέντρωσης χαρακτηρίζεται από δύο στοιχεία:

α) Τις στροφές ανά min (rpm) που θα πρέπει να κάνει ο κινητήρας της φυγοκέντρου (ή αλλιώς η επιτάχυνση που θα χρειαστεί να υποστεί το μίγμα, για να διαχωριστεί φυγοκεντρικά μετρούμενη σε g).

β) Ο χρόνος που θα πρέπει να διαρκέσει η φυγοκέντρωση σε min. Για να μετατρέψουμε τιμές rpm σε g ή αντίστροφα g σε rpm χρησιμοποιούμε τον εξής τύπο:

$$g = 1,12 \times \text{ακτίνα (cm)} \times (\text{rpm})^2 \times 10^{-5}$$



π.χ. δίνονται ούρα για φυγοκέντρηση σε 3000 στροφές/min (3000 rpm) και για 5 min. Η επιτάχυνση σε g που υφίστανται είναι:

$$g = 1,12 \times 10 \text{ cm} \times (3000 \text{ rpm})^2 \times 10^{-5} = 1008 \text{ g}.$$

### Χειρισμός της φυγοκέντρου

1. Αριθμείστε τους σωλήνες φυγοκέντρησης (είναι ειδικοί σωλήνες με ισχυρό τοίχωμα για μεγαλύτερη αντοχή) και γεμίστε τους με το υλικό που θέλετε να φυγοκεντρήσετε κατά τα 2/3 (όχι περισσότερο).
2. Επιδιώξτε οι σωλήνες να έχουν ανά δύο το ίδιο βάρος. Με άλλα λόγια φτιάξτε ζεύγη ισοβαρών σωλήνων.
3. Ανοίξτε το κάλυμμα της φυγοκέντρου.
4. Βάλτε στις υποδοχές της κεφαλής τα ζεύγη των σωλήνων με τέτοιο τρόπο, ώστε οι δύο ισοβαρείς σωλήνες κάθε ζεύγους να έχουν ακριβώς εκ διαμέτρου αντίθετες θέσεις.
5. Κλείστε το κάλυμμα.
6. Ρυθμίστε με τους ανάλογους διακόπτες τη ταχύτητα της φυγοκέντρησης (δηλ. στροφές/min ή g) (βλ. σημείωση) και τη διάρκεια της φυγοκέντρησης.
7. Μόλις τελειώσει ο χρόνος φυγοκέντρησης, αφήστε να σταματήσει ο κινητήρας. Αφού γίνει αυτό, ανοίξτε το κάλυμμα και βγάλτε τους σωλήνες.

### Προσοχή

Κάθε φορά που φυγοκεντρείτε πρέπει ιδιαίτερα να προσέχετε τα εξής, για να αποφύγετε τυχόν ατυχήματα.

1. Να βάζετε πάντα ισοβαρή ζεύγη σωλήνων διαμετρικά αντίθετα το ένα με το άλλο στην κεφαλή.
2. Να εξετάζετε αν η κεφαλή είναι καλά στερεωμένη στο κινητήρα.
3. Να βεβαιωνόσαστε ότι πράγματι το κάλυμμα της φυγοκέντρου είναι καλά προσαρμοσμένο, προτού να αρχίσει να περιστρέφεται ο κινητήρας.



4. Όταν φυγόκεντρείτε σε πολλές στροφές μην γυρνάτε τον διακόπτη αμέσως στην ένδειξη που θέλετε, αλλά κάντε το σταδιακά, (δηλ. η αύξηση των στροφών του κινητήρα δεν πρέπει να γίνεται απότομα).

Σημείωση:

Οι φυγόκεντροι του φοιτητικού εργαστηρίου είναι τύπου Hettich, Universal II και φέρουν:

α) κλίμακα ρυθμίσεως στροφών 0% -100% (δηλ. στην ένδειξη 100 % έχουμε όλη την ισχύ του κινητήρα ενώ στις ενδιάμεσες τιμές επί τοις εκατό, διαβαθμίσεις της ολικής ισχύος).

β) Ένδειξη στροφών (στροφόμετρο) που βρίσκεται επάνω στο όργανο και λειτουργεί με βάση τη μετατόπιση μηνίσκου υγρής στήλης. Όσο αυξάνονται οι στροφές του κινητήρα ο μηνίσκος μετατοπίζεται προς τα κάτω και ο αριθμός των στροφών διαβάζεται επάνω στην ενσωματωμένη κλίμακα.

Η μέτρηση του χρόνου φυγοκέντρωσης σε αυτό το όργανο μπορεί να γίνει εξωτερικά με κατάλληλο χρονοδιακόπτη με τον οποίο συνδέεται η φυγόκεντρος, ή με χρονόμετρο εντοιχισμένο στο όργανο.

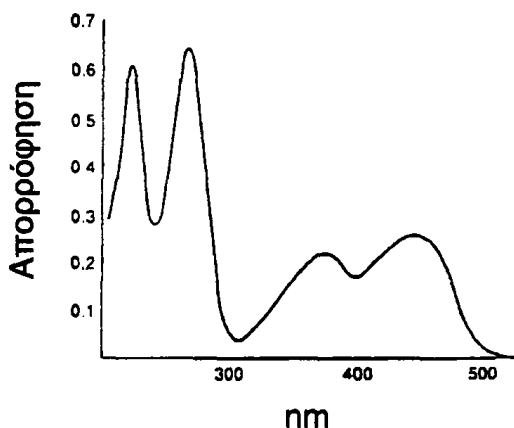


## Παράρτημα 4

### ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

#### Εισαγωγή

Όταν ορατό φως διαπεράσει διάλυμα που περιέχει μια έγχρωμη ουσία τότε ορισμένα μήκη κύματος απορροφούνται και το αποτέλεσμα είναι ότι το διάλυμα θα παρουσιάσει ένα χρώμα το οποίο αποτελείται μόνο από το εκπεμπόμενο φως. Η αρχή αυτή απεικονίζεται στο φάσμα απορροφήσεως της ριβοφλαβίνης.



Σχήμα 1. Φάσμα απορροφήσεως ριβοφλαβίνης pH=7,06

Η ριβοφλαβίνη έχει κίτρινο χρώμα, διότι στο ορατό φάσμα (400-700 nm) έχει μέγιστο απορροφήσεως στα 450 nm, και το υπόλοιπο φάσμα που δεν απορροφάται εκπέμπεται και είναι κίτρινο. Ο πίνακας που παραθέτουμε δίνει τα απορροφούμενα και τα παρατηρούμενα συμπληρωματικά χρώματα.

#### ΠΙΝΑΚΑΣ ΧΡΩΜΑΤΩΝ

Μήκος κύματος (nm)	Χρώμα που απορροφάται	Χρώμα που παρατηρείται
400	Ιώδες	Πράσινο-κίτρινο
480	Κυανούν	Κίτρινο
530	Πράσινο	Πορφυρούν (magenta)
580	Κίτρινο	Κυανούν
610	Πορτοκαλί	Πράσινο-κυανούν
660	Κόκκινο	Κυανούν-πράσινο
720	Πορφυρό-κόκκινο	πράσινο

## Φασματοφωτομετρία

Η φασματοφωτομετρία είναι γενικά η τεχνική που έχει αντικείμενο την ποιοτική και ποσοτική μελέτη των φασμάτων απορρόφησης διαφόρων ουσιών στην περιοχή 200-900 nm. Η θεωρία της φασματοφωτομετρίας βασίζεται σε δύο κλασικούς νόμους, τον νόμο του Lambert και τον νόμο του Beer οι οποίοι συνοψίζονται στη σχέση Lambert-Beer που δίνεται μαθηματικά ως εξής:

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

Όπου:

$I_0$  = ένταση φωτός που προσπίπτει στο διάλυμα της προς μέτρηση ουσίας

$I$  = ένταση φωτός που εξέρχεται από το διάλυμα

$\epsilon$  = συντελεστής μοριακή απόσβεσης χαρακτηριστικός μιας δοθείσης ουσίας σε ορισμένο μήκος κύματος. (Molar extinction coefficient). Το  $\epsilon$  αριθμητικά είναι ίσο με την απορροφητικότητα 1M διαλύματος ουσίας, σε κυψελίδα πάχους 1 cm.

$c$  = συγκέντρωση του προς μέτρηση διαλύματος σε moles/l.

$l$  = απόσταση που διανύει το φως στο διάλυμα ή το πάχος της κυψελίδας μέσα στην οποία τοποθετείται το διάλυμα.

Στην πράξη, το  $\log \frac{I_0}{I}$  δεν υπολογίζεται άμεσα από το  $I_0$  και  $I$ , αλλά φωτομετρούμε μαζί με το διάλυμα σε παράλληλη κυψελίδα και τον διαλύτη ( $I_0$ ). Έτσι μπορούμε να απλοποιήσουμε την σχέση (1).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

όπου,  $A$  = απορροφητικότητα (absorbance).

Βλέπουμε λοιπόν ότι σύμφωνα με την σχέση (2) η απορροφητικότητα είναι ευθέως ανάλογη με την συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα.

Τα φωτόμετρα είναι απλούστερα όργανα τα οποία μετρούν φάσματα περιοχής 400-700 nm (ορατού φωτός) και η επιλογή μήκους κύματος γίνεται με φίλτρα (εύρος κύματος 10-15 nm). Τα φασματοφωτόμετρα χρησιμοποιούν πρίσμα ή παραθλαστική εσχάρα για την επιλογή του μήκους κύματος με ακρίβεια της τάξεως του 1nm.



### Ποιοτική φωτομετρία

Επειδή πολλές ουσίες βιοχημικού ενδιαφέροντος απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή 200-900 nm τα φάσματα των ουσιών αυτών χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους. Μπορούμε δηλ. συγκρίνοντας το φάσμα διαλύματος καθαρής ουσίας με γνωστά φάσματα να προσδιορίσουμε την διαλυμένη ουσία.

Σε μια τέτοια σύγκριση φασμάτων πρέπει όμως να προσέχουμε να ταυτίζονται οι συνθήκες κάτω από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες έχει μετρηθεί το φάσμα. Συγκεκριμένα το φάσμα μιας ουσίας αλλάζει:

- α) Με τη αλλαγή του διαλύτη
- β) Με την αλλαγή του pH.

Γι αυτό μαζί με το φάσμα πρέπει πάντοτε να αναφέρεται ο διαλύτης και το pH του διαλύματος.

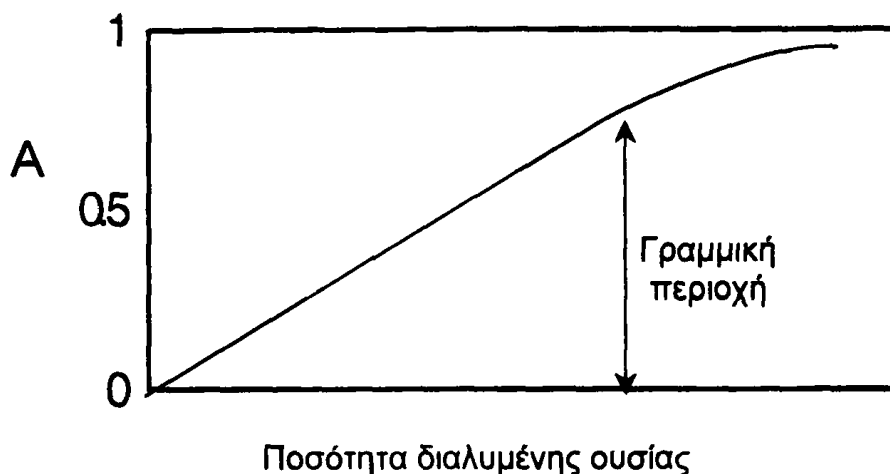
### Ποσοτική φωτομετρία

Η φωτομετρία πολύ συχνά χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης διαλύματος γνωστής ουσίας όπως φαίνεται στη σχέση (2). Μετρώντας την τιμή της  $A$  μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση  $C$  (το  $l$  δίνεται από το πάχος της κυψελίδας και είναι σταθερό, επίσης και το  $\epsilon$ ) για την ουσία που μελετάμε είναι γνωστό). Η γραμμική συνάρτηση της απορροφητικότητας ( $A$ ) με την συγκέντρωση ισχύει για τις περισσότερες ουσίες. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου δεν ισχύει η σχέση (2). Αυτές είναι:

1. Σε ορισμένα οξέα, βάσεις ή άλατα παρατηρείται αύξηση του ιονισμού τους με αυξανόμενη αραίωση του διαλύματος. Πολλές φορές το ιόν απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος.
2. Ορισμένα οργανικά μόρια έχουν τάση προς συσσωμάτωση (aggregation), όταν βρίσκονται σε διάλυμα.
3. Σε παλαιότερα όργανα όταν η απορρόφηση ενός διαλύματος (πυκνά διαλύματα) είναι μεγαλύτερη από 0.5 (στην κλίμακα του οργάνου 0-2  $A$ ). Στην περίπτωση αυτή η συνάρτηση μεταξύ



απορρόφησης και συγκέντρωσης παύει να είναι γραμμική (Σχήμα 2).



**Σχήμα 2.** Συνάρτηση της απορρόφησης  $A$  με την συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας.

Για να αποφύγουμε λοιπόν μετρήσεις στο μη γραμμικό τμήμα της καμπύλης πρέπει να αραιώσουμε το διάλυμά μας (βλ. πίνακα αραιώσεων στην Εισαγωγή του Εργαστηρίου).

**Παράδειγμα.** Φωτομετρώντας ένα δείγμα πρωτεϊνών με την μέθοδο της διουρίας βρήκαμε  $A=0.8$ . Βγάζουμε την κυψελίδα από το φωτόμετρο και αραιώνουμε 1:3 (δηλ. εάν ο όγκος του υγρού ήταν 5 ml προσθέτουμε  $2 \times 5 = 10$  ml  $H_2O$ ). Παίρνουμε τώρα 5 ml αυτού του διαλύματος σε καθαρή κυψελίδα και φωτομετρούμε. Η νέα τιμή της  $A=0.3$  αντιστοιχεί σε ορισμένο ποσόν πρωτεΐνης (που βρίσκεται από την πρότυπη καμπύλη π.χ. 3 mg. Επομένως η μη αραιωμένη περιεκτικότητα είναι:  $3 \times 3 \text{ mg} = 9 \text{ mg}$ ).

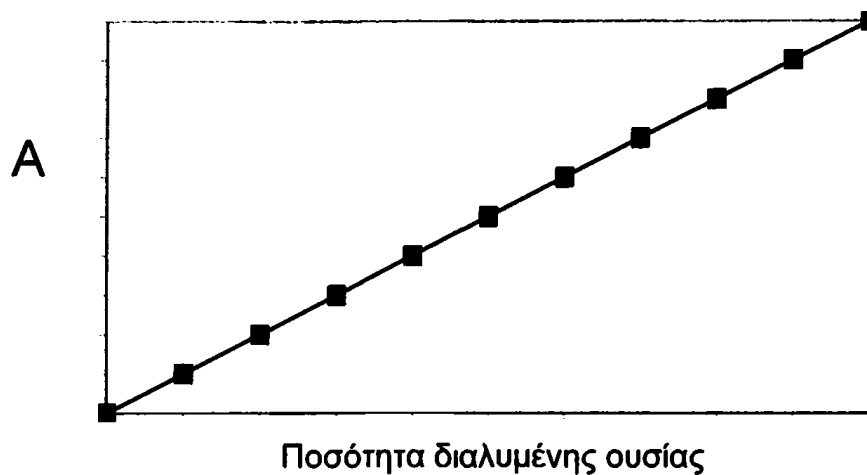
#### Πρότυπος καμπύλη

Για να μετρήσουμε την συγκέντρωση μιας ουσίας στο διάλυμα πρέπει πρώτα να σχηματίσουμε την πρότυπη καμπύλη της ουσίας αυτής. Φωτομετρούμε μια σειρά από διαλύματα που περιέχουν όλα την ίδια ποσότητα αντιδραστηρίων, αλλά συνεχώς αυξανόμενες γνωστές ποσότητες της ουσίας που μετράμε. Ο τελικός όγκος πρέπει πάντα να είναι ο ίδιος. Η





μέτρηση αρχίζει πάντοτε με την φωτομέτρηση του “τυφλού”, όπως καλείται το διάλυμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός της ουσίας (ο όγκος του συμπληρώνεται με νερό). Το “τυφλό” επομένως έχει συγκέντρωση ουσίας (0) μηδέν. Αφού πάρουμε τις αντίστοιχες τιμές του A για τα γνωστά διαλύματα της ουσίας, σχεδιάζουμε την καμπύλη (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης

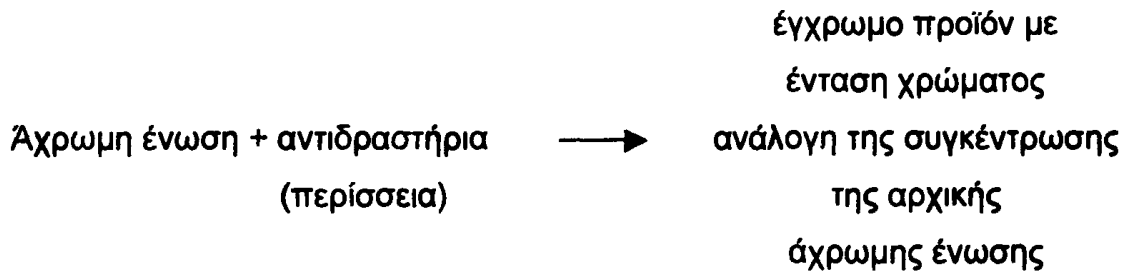
Σύμφωνα με την σχέση των Lambert-Beer για μια ορισμένη ένωση, για ορισμένο μήκος κύματος και σταθερό πάχος κυψελίδας η απορροφητικότητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης.

Με την πρότυπη καμπύλη έχουμε τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε οποιαδήποτε άγνωστη συγκέντρωση της ουσίας εάν γνωρίζουμε την απορρόφηση του διαλύματός της. Οι πρότυπες καμπύλες των ουσιών που μας ενδιαφέρουν πρέπει να επαναλαμβάνονται κάθε 1-2 ημέρες για να αποφύγουμε λάθη που μπορεί να προέρχονται από την αλλοίωση των αντιδραστηρίων μας με τον χρόνο. Γι αυτό κάθε πρότυπος καμπύλη φέρει εκτός από το όνομα της ουσίας την ημερομηνία και ώρα που έγινε η φωτομετρική μέτρησή της.

### Έμμεση φωτομετρία

Εκτός από τις ουσίες που απορροφούν το φως και είναι κατά συνέπεια έγχρωμες, υπάρχουν και ουσίες που δεν απορροφούν το ορατό φως, όπως η αλβουμίνη, αλλά παρουσιάζουν μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον. Για την

φωτομέτρηση των ουσιών αυτών προσφεύγουμε σε ειδικές χημικές αντιδράσεις τα προϊόντα των οποίων είναι έγχρωμα, άρα μπορούν να φωτομετρηθούν. Κατά κανόνα προσθέτουμε στην άχρωμη ουσία που θέλουμε να μετρήσουμε ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια πάντοτε σε περίσσεια ούτως ώστε το χρώμα του προϊόντος να είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της άχρωμης ουσίας που μετράμε.



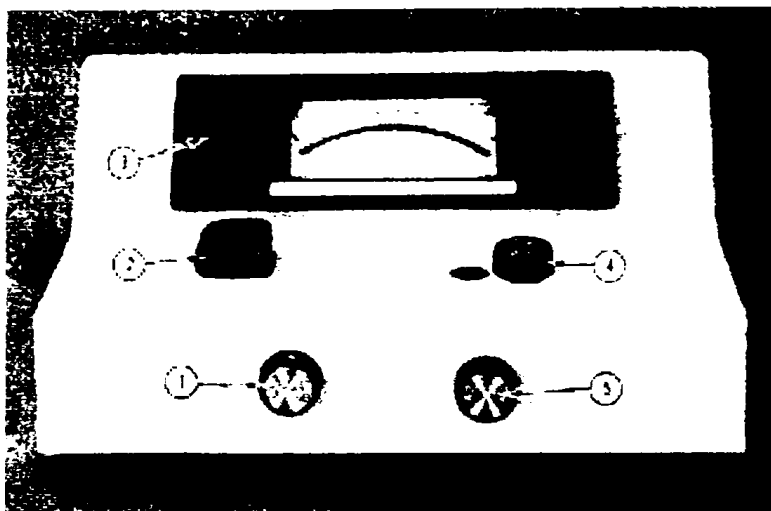
Η έμμεση φωτομέτρηση εφαρμόζεται πολύ συχνά στη βιοχημεία. Μερικά παραδείγματα είναι: μέτρηση σακχάρου στα ούρα (οξειδάση γλυκόζης), μέθοδος διουρίας στην μέτρηση πρωτεϊνών, μέτρηση ενζύμων με συνένζυμα κλπ. (βλ. Ασκήσεις 5-7)

#### Χρήση του φωτομέτρου (Bausch & Lomb, Spectronics 20)

Η σωστή φωτομέτρηση απαιτεί πλήρη γνώση της θεωρίας της φωτομέτρησης καθώς και γνώση του χειρισμού του φωτομέτρου.

Το φωτόμετρο του φοιτητικού εργαστηρίου εργάζεται στην περιοχή 340-600 nm (Σχήμα 4).





Σχήμα 4. Φωτόμετρο Spectronic 20

Στο επάνω μέρος το όργανο φέρει την κλίμακα A από 0-2. Στην θέση (2) είναι ο υποδοχέας για τα δείγματα (χρησιμοποιούνται μόνο ειδικοί σωλήνες με μια άσπρη γραμμή η οποία πρέπει να ευθυγραμμίζεται με την αντίστοιχη γραμμή του υποδοχέα.

Στην θέση (4) είναι το κουμπί επιλογής μήκους κύματος. Στο εμπρόσθιο μέρος έχουμε τα κυριότερα κουμπιά ρυθμίσεως του οργάνου. Στην θέση (1) είναι ο διακόπτης ON-OFF και zero-control.

1. Βάζετε σε λειτουργία το φωτόμετρό σας με το (1), θα ανάψει το λαμπάκι (3). Περιμένετε 5 λεπτά για να θερμανθεί το όργανο και να έχει σταθερή απόδοση.
2. Με το ίδιο κουμπί (1) χωρίς να βάλετε τίποτα μέσα στον υποδοχέα δειγμάτων ρυθμίζετε το 0% T ή  $\infty$  A (δηλ. στο αριστερό άκρο της κλίμακας).
3. Μετά με το κουμπί (5) και το "τυφλό" μέσα στον υποδοχέα ρυθμίζετε το 100 % T ή 0 A. Αυτές οι ρυθμίσεις δηλ. το 0 % T και το 100 % T πρέπει να γίνονται με προσοχή και σε ανάγκη ή όταν υπάρχει υποψία, να επαναλαμβάνονται και μεταξύ των μετρήσεων.

Προσοχή: Η ρύθμιση του 100 % T πρέπει οπωσδήποτε να ξαναγίνει μετά από κάθε αλλαγή του μήκους κύματος.

## ΘΕΩΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η χρωματογραφία είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, τον καθαρισμό, την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό πολλών χημικών ουσιών κυρίως οργανικού και βιοχημικού ενδιαφέροντος. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και για παρασκευαστικούς σκοπούς.

Σε όλες τις παρασκευαστικές μεθόδους διακρίνονται βασικά δύο φάσεις, η στατική φάση (στερεά ή υγρή) πάνω στην οποία συγκρατούνται τα προς διαχωρισμό συστατικά και η κινούμενη φάση (υγρή ή αέριος) με την οποία επιτυγχάνεται η μετατόπιση των συστατικών πάνω στη στατική φάση. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται γιατί οι ουσίες με διαφορετική σύνθεση κατανέμονται σε διαφορετικό βαθμό μεταξύ στατικής και κινούμενης φάσης.

### Τύποι χρωματογραφίας

1. Χρωματογραφία προσροφήσεως (adsorption chromatography)
2. Χρωματογραφία κατανομής (Partition chromatography)
3. Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (ion exchange chromatography)
4. Χρωματογραφία πηκτής (gel chromatography)

Οι ανωτέρω τύποι χρωματογραφίας επιτυγχάνονται με διάφορες τεχνικές και μέσα χρωματογράφησης βάσει των οποίων διακρίνονται τα εξής είδη χρωματογραφίας.

Χρωματογραφία χάρτου (paper chromatography)

Χρωματογραφία στήλης (column chromatography)

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin layer chromatography) ή TLC και,

Αέριος χρωματογραφία (gas chromatography)

Πλεονεκτήματα των χρωματογραφικών μεθόδων είναι η ελάχιστη ποσότητα δείγματος που απαιτείται ( $\mu\text{g} - \text{mg}$ ), ο σχετικά μικρός χρόνος ανάλυσης, η μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού και συγχρόνως η δυνατότητα ταυτοποίησης και προσδιορισμού των συστατικών.



## Όροι χρωματογραφίας

Προσροφητικό (adsorbent): χρησιμοποιείται για στερεά στατική φάση.

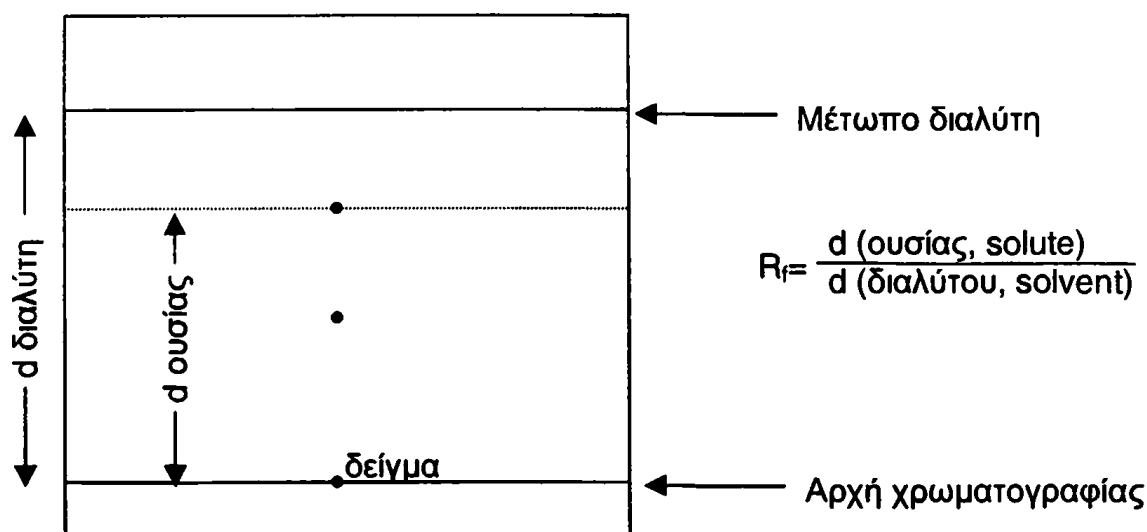
Υπόστρωμα (support): χρησιμοποιείται για να δείξει το στερεό που συγκρατεί μια υγρή φάση

Διαλύτης (solvent): Η κινούμενη φάση που προκαλεί την μετακίνηση του δείγματος.

Μέτωπο του διαλύτη (solvent front)

Αρχή (origin): Το σημείο στο οποίο τοποθετείται το δείγμα.

Η θέση μιας ουσίας στο χρωματογράφημα ορίζεται συνήθως με την τιμή  $R_f$ , που είναι ο λόγος της απόστασης που διένυσε η ουσία προς την απόσταση που διένυσε το μέτωπο του διαλύτη.



Για κάθε χημική ένωση οι τιμές  $R_f$  είναι χαρακτηριστικές υπό καθορισμένες συνθήκες. Οι ουσίες πάνω στο χρωματογράφημα συνήθως δεν είναι ορατές παρά μόνο εάν πρόκειται για έγχρωμες ουσίες. Γι αυτό μετά την "ανάπτυξη" του χρωματογραφήματος απαιτείται εμφάνιση που γίνεται με την χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων. Η παραλαβή των ουσιών που διαχωρίστηκαν πάνω στο χρωματογράφημα καλείται έκλουση (elution). Για να γίνει η έκλουση αφήνεται ο διαλύτης να διατρέξει την στατική φάση και να παρασύρει τις ουσίες έξω από το χρωματογράφημα.

Η κατανομή μιας ουσίας μεταξύ στατικής και κινούμενης φάσης εκφράζεται με τον συντελεστή κατανομής (distribution coefficient)



$$K = \frac{\text{Συγκέντρωση ουσίας στην κινητή φάση}}{\text{Συγκέντρωση ουσίας στην στατική φάση}}$$

### Χρωματογραφία προσροφήσεως και κατανομής

Η κατανομή των ουσιών μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης ακολουθεί είτε μεθόδους προσροφήσεως είτε μεθόδους κατανομής, ανάλογα με τον τύπο της στατικής φάσης που χρησιμοποιείται. Στη μέθοδο κατανομής η στατική φάση είναι υγρή (στηρίζεται πάνω σε ένα στερεό υπόστρωμα), όπως και η κινητή και η ουσία κατανέμεται ανάλογα με την διαλυτότητά της στα δύο υγρά. Οι ουσίες που είναι περισσότερο διαλυτές στον διαλύτη μετακινούνται γρηγορότερα από εκείνες που είναι περισσότερο διαλυτές στην στατική φάση.

Στην χρωματογραφία προσροφήσεως, η στατική φάση είναι ένα στερεό προσροφητικό, η κινητή φάση υγρό και ουσίες προσροφώνται σε διαφορετικό βαθμό από το προσροφητικό ανάλογα με την φύση τους, δηλ. τις ομάδες που περιέχουν. Κατά την προσρόφηση σχηματίζονται ιονικοί δεσμοί και δεσμοί υδρογόνου.

Η χρωματογραφία προσροφήσεως προτιμάται για παρασκευαστικούς σκοπούς, γιατί μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες ποσότητες (σε σύγκριση με άλλες χρωματογραφίες).

Εφαρμογή της χρωματογραφίας προσροφήσεως αποτελεί η απλή χρωματογραφία χάρτου και λεπτής στοιβάδας. Σαν υλικό προσροφήσεως χρησιμοποιείται κυρίως  $\text{SiO}_2$  (silica gel), γη διατόμων (kieselguhr),  $\text{MgCO}_3$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , κ.τ.λ.

Η χρωματογραφία κατανομής εξαρτάται από την διαλυτότητα της ουσίας σε δύο υγρά. Είναι πιο αποτελεσματική για τον διαχωρισμό ουσιών που διαφέρουν στις ιδιότητες διαλυτότητας π.χ. ουσίες μιας ομόλογης σειράς, ενώ η χρωματογραφία προσρόφησης στο διαχωρισμό ουσιών που διαφέρουν στην δομή ή στο φορτίο.



Η χρωματογραφία κατανομής εφαρμόζεται επίσης στην χρωματογραφία στήλης, λεπτής στοιβάδας ή χάρτου όπου στερεό υπόστρωμα επικαλύπτεται από μια υγρή στερεή φάση.

### Χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (Thin layer chromatography, TLC)

Η TLC μπορεί να εφαρμοσθεί επιτυχώς για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση μεγάλου αριθμού οργανικών ενώσεων. Η TLC έχει το πλεονέκτημα του γρήγορου διαχωρισμού, της μεγάλης ευαισθησίας και της απλής τεχνικής. Στην TLC η στατική φάση προσαρμόζεται σε κατάλληλο υπόστρωμα όπως πλακίδια από γυαλί ή πλαστικό. Η στατική φάση είναι λεπτόκοκκη σκόνη που δρα σαν προσροφητικό για ένα υγρό. Πολλές ουσίες χρησιμοποιούνται σαν προσροφητικά, αλλά το silica gel και η κυτταρίνη (cellulose) είναι τα πιο κοινά. Επίσης χρησιμοποιείται η Alumina ( $Al_2O_3$ ), η γη διατόμων κ.λ.π. Το silica gel δρα σαν προσροφητικό ύστερα από ενεργοποίηση με θέρμανση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αρκετά επιτυχώς για τον διαχωρισμό πολλών ουσιών. Η κάλυψη των πλακιδίων με το προσροφητικό πρέπει να είναι ομοιογενής για να πάρουμε καλά αποτελέσματα και γίνεται με διάφορους τρόπους. Ο διαλύτης εκλέγεται ανάλογα με την φύση των ουσιών που πρόκειται να διαχωρισθούν. Στην χρωματογραφία κατανομής πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η σχετική διαλυτότητα των ουσιών σε δύο υγρά. Τυπικά διαλυτικά συστήματα για τον διαχωρισμό πολικών ουσιών είναι: Ισοπροπανόλη/αμμωνία/ $H_2O$  (9:1:2), βουτανόλη/οξικό οξύ/ $H_2O$  (4:1:5) και φαινόλη/ $H_2O$  (4:1).

### Τεχνική χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC)

Το δείγμα τοποθετείται 1 cm περίπου από το ένα άκρο του πλακιδίου με μικροσιφώνιο ή τριχοειδές. Για να γίνει καλός διαχωρισμός η κηλίδα πρέπει να είναι μικρή. Μέσα σε ειδικό θάλαμο τοποθετείται ο διαλύτης μέχρι ύψους 1 cm από τον πυθμένα. Ο θάλαμος αφήνεται να κορεσθεί από τους ατμούς του διαλύτη και στην συνέχεια τοποθετείται το πλακίδιο. Όταν το μέτωπο του διαλύτη φθάσει σε απόσταση 2 cm κάτω από το άνω άκρο του πλακιδίου απομακρύνεται το πλακίδιο από τον θάλαμο αφού σημειωθεί το μέτωπο και στην συνέχεια ξηραίνεται και εμφανίζεται.



### Ανίχνευση

Η εμφάνιση των κηλίδων γίνεται είτε με έκθεση στο UV είτε με κάποια αντίδραση με ορισμένο αντιδραστήριο προς παραγωγή έγχρωμου συμπλόκου. Χρησιμοποιούνται διάφορα ψεκάσματα (spray) γενικά ή ειδικά, από τα οποία τα πιο κοινά είναι το  $H_2SO_4$  και το  $I_2$ . Π.χ. κρύσταλλοι ιωδίου τοποθετούνται σε κλειστό θάλαμο, αφήνονται να εξαχνωθούν, το πλακίδιο εκτίθεται στους ατμούς και οι οργανικές ουσίες δίνουν καφέ χρώμα. Από τα ειδικά αντιδραστήρια αναφέρουμε το ψέκασμα νινυδρίνης για ανίχνευση αμινοξέων.

Σφάλματα: Υπερφόρτωση του πλακιδίου με ουσία (overloading), οπότε δεν μπορεί να γίνει καλός διαχωρισμός και παρατηρούνται ουρές στις κηλίδες (tailing).





## ΑΓΩΓΙΜΟΜΕΤΡΟ

Ο όρος αγωγιμότητα (conductivity) εκφράζει την σχετική ευχέρεια με την οποία διέρχεται το ηλεκτρικό ρεύμα μέσα από ένα διάλυμα ηλεκτρολυτών. Η αγωγιμότητα συνδέεται με την ηλεκτρική αντίσταση με τη σχέση  $\Lambda = 1/R$ , όπου  $\Lambda$  = αγωγιμότητα και  $R$  = αντίσταση. Μονάδα μέτρησης της αγωγιμότητας είναι το Siemens (S) ή  $\Omega^{-1}$  ή Mho. Στην πράξη χρησιμοποιούνται κυρίως τα υποπολλαπλάσια mS και  $\mu$ S.

Η μέτρηση της αγωγιμότητας γίνεται με ειδικά όργανα, τα αγωγιμόμετρα (conductivity meters). Η κυψελίδα του αγωγιμομέτρου (βλ. Σχήμα) φέρει 3 ενσωματωμένα ηλεκτρόδια από λευκόχρυσο σχήματος δακτυλίου. Το άνω και το κάτω ηλεκτρόδια είναι συνδεδεμένα με τη γείωση του οργάνου, ενώ το κεντρικό συνδέεται με τον κεντρικό αγωγό του ομοιαξονικού καλωδίου. Μεταξύ των μετρήσεων, η κυψελίδα φυλάσσεται εμβαπτισμένη σε δοχείο με απιονισμένο ύδωρ. Κατά τη μέτρηση, εμβαπτίζουμε τη κυψελίδα στο εξεταζόμενο διάλυμα, με τρόπο ώστε και τα 3 ηλεκτρόδια να είναι καλυμμένα από υγρό. Απαιτείται προσοχή επίσης ώστε να μην σχηματίζονται μέσα στη κυψελίδα φυσαλίδες αέρα. Το αποτέλεσμα της μέτρησης (αγωγιμότητα) δίδεται στην κλίμακα του οργάνου σε S (0-5) ή (0-15). Μετά τη μέτρηση, πλένουμε το εσωτερικό και εξωτερικό της κυψελίδας με απιονισμένο ύδωρ και την επανατοποθετούμε προς φύλαξη.

### Οδηγίες χειρισμού

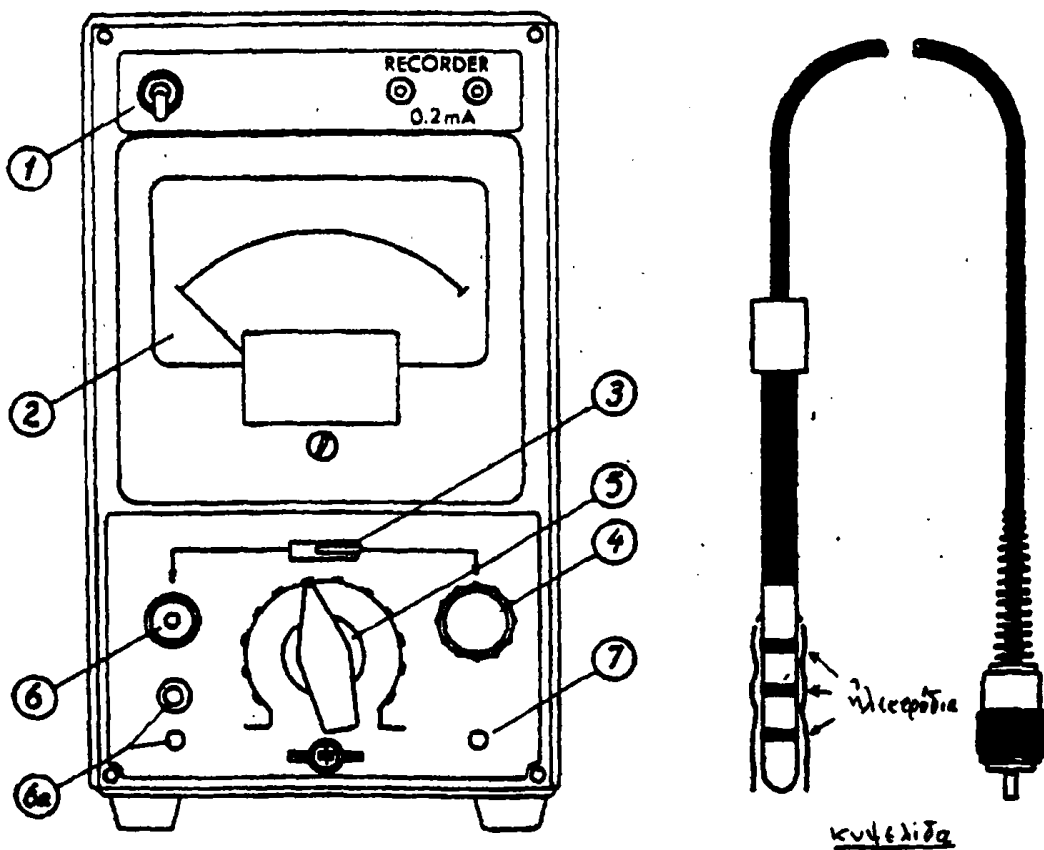
1. Ανοίγουμε το διακόπτη ON-OFF (1) του οργάνου και αφήνουμε το όργανο να προθερμανθεί επί 15 min
2. Φέρουμε το διακόπτη (3) (MEASURE-CALIBRATE) στη θέση MEASURE
3. Στρέφουμε το διακόπτη (5) σε κατάλληλη βαθμολόγηση ώστε να έχουμε κανονική απόκλιση του δείκτη



4. Διαβάζουμε την τιμή αγωγιμότητας σε S, από την κλίμακα (2) του οργάνου
5. Επαναφέρουμε τον διακόπτη (3) στη θέση CALIBRATE
6. Πλένουμε την κυψελίδα με απιονισμένο ύδωρ και την επιστρέφουμε στο δοχείο φύλαξης.

Σημείωση: Η ειδική αγωγιμότητα (specific conductivity) δίδεται από τη σχέση

$$\text{Ειδ. αγωγιμότητα} = \frac{\text{αγωγιμότητα (mS)}}{\text{σταθερά κυψελίδας (cm)}}$$



Σχήμα 5. Αγωγιμόμετρο

## ΦΛΟΓΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

Η φλογοφωτομετρία χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον ποσοτικό προσδιορισμό ηλεκτρολυτών όπως  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  και  $\text{Ca}^{2+}$  στα φυσιολογικά υγρά. Το  $\text{Li}^+$  που επίσης πιθανόν να απαντάται σε πολύ μικρή ποσότητα στο πλάσμα, μπορεί και αυτό να μετρηθεί φλογοφωτομετρικά.

Το φλογοφωτόμετρο αποτελείται από

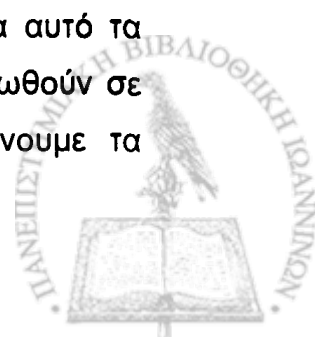
- (α) τον καυστήρα, στον οποίο με τη βοήθεια μίγματος προπανίου και οξυγόνου δημιουργείται φλόγα θερμοκρασίας  $2850\text{ }^\circ\text{C}$ ,
- (β) τον ψεκαστήρα, που χρησιμεύει για τον ψεκασμό του διαλύματος που θα μετρηθεί, μέσα στην φλόγα,
- (γ) σύστημα φίλτρων, για την απομόνωση φωτός ορισμένου μήκους κύματος,
- (δ) τον ανιχνευτή της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας.

Η αρχή λειτουργίας του οργάνου βασίζεται στην απορρόφηση ενέργειας (φλόγα) και διέγερση των ηλεκτρονίων των μετάλλων. Τα ασταθή, διηγερμένα ηλεκτρόνια, τείνουν να χάσουν την επιπρόσθετη ενέργεια τους, εκπέμποντας (φάσμα εκπομπής) ενέργεια με μορφή φωτονίων ορισμένου μήκους κύματος και να μεταπέσουν στην κανονική, μη διηγερμένη κατάσταση. Το αποτέλεσμα είναι η φλόγα να χρωματίζεται χαρακτηριστικά, π.χ. το  $\text{Na}^+$  την χρωματίζει κίτρινη, το  $\text{K}^+$  κυανή, το  $\text{Li}^+$  κόκκινη, κλπ.

Το σύστημα φίλτρων απομονώνει από το φάσμα εκπομπής το χαρακτηριστικό μήκος κύματος του μετάλλου που μετράται, ενώ ο ανιχνευτής μετατρέπει την φωτεινή ενέργεια σε ηλεκτρική, η οποία προκαλεί απόκλιση του δείκτη του οργάνου.

Η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι συνάρτηση του αριθμού των  $n$  ιόντων του μετάλλου που ευρίσκονται στο διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατή η ανίχνευση των ηλεκτρολυτών.

Τα φλογοφωτόμετρα είναι όργανα αρκετά ευαίσθητα και για αυτό τα διαλύματα που θέλουμε να μετρήσουμε θα πρέπει πρώτα να αραιωθούν σε κατάλληλο όγκο. Πρέπει επίσης να προσέχουμε να μη μολύνουμε τα



δείγματα μας αγγίζοντας το χείλος γυαλικών γιατί έτσι μεταφέρονται ιόντα στο δείγμα. Βαθμολόγηση του οργάνου γίνεται κάθε φορά από τον βοηθό ή επιβλέποντα του εργαστηρίου. Το αποτέλεσμα κάθε μέτρησης δίδεται σε χιλιοστοϊσοδύναμα (meq) ανά L.

#### Οδηγίες χειρισμού φλογοφωτομέτρου.

- 1 Ανοίγουμε τον διακόπτη (ON-OFF). Ανάβει το φωτάκι.
- 2 Ανοίγουμε την βαλβίδα του οξυγόνου (αντίθετα προς τη φορά των δεικτών του ωρολογίου)
- 3 Ανοίγουμε την βαλβίδα του προπανίου (αντίθετα προς τη φορά των δεικτών του ωρολογίου), η πίεση ρυθμίζεται αυτόματα σε 5 p.s.i. Πιέζουμε το κουμπί (ignitor) στο πρόσθιο μέρος του πίνακα για να ανάψει η φλόγα.
- 4 Με τον κοχλία της μεμβράνης αυξάνουμε σταδιακά την πίεση του οξυγόνου μέχρι 13 p.s.i. (ο κοχλίας ανοίγει κατά τη φορά των δεικτών του ωρολογίου)
- 5 Βάζουμε την καπνοδόχο και παρατηρούμε τη φλόγα από το παράθυρο
- 6 Αφήνουμε το όργανο να θερμανθεί, επί 10 min, καθαρίζουμε τον ψεκαστήρα με την βελόνα, και ελέγχουμε την ταχύτητα ροής απεσταγμένου ύδατος (1.5-2.0 ml/min)
- 7 Πριν από κάθε μέτρηση περιμένουμε 5-10 sec να σταθεροποιηθεί η βελόνα του οργάνου και κατόπιν καταγράφουμε την τιμή
- 8 Όταν ολοκληρώσουμε τις μετρήσεις, κλείνουμε τον κοχλία του μανομέτρου του οξυγόνου (αντίθετα προς τη φορά των δεικτών του ωρολογίου) και στη συνέχεια κλείνουμε τη βαλβίδα της φιάλης του οξυγόνου
- 9 Κλείνουμε τη βαλβίδα της φιάλης του προπανίου. Όταν η φλόγα σβήσει, ανοίγουμε τον κοχλία του μανομέτρου του οξυγόνου, για να φύγει το οξυγόνο που έμεινε και να καθαρίσει συγχρόνως η οπή του ψεκαστήρα
- 10 Τέλος, κλείνουμε τον διακόπτη ON-OFF, αφήνουμε το όργανο να κρυώσει και το σκεπάζουμε με το πλαστικό κάλυμμα του.



## ΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΤΑΣΕΙΣ

Σε ένα πείραμα, τα πειραματικά αποτελέσματα δίδονται είτε με τη μορφή πίνακα τιμών είτε με τη μορφή γραφικής παράστασης. Πάνω από κάθε πίνακα αναγράφεται επεξηγηματικός τίτλος, ενώ επιπρόσθετες διευκρινίσεις γράφονται κάτω από τον τίτλο του πίνακα.

Οι μονάδες όπου δίδονται τα αποτελέσματα γράφονται στην κορυφή της στήλης των αριθμών και δεν επαναλαμβάνονται σε κάθε γραμμή του πίνακα. Τις μονάδες που χρησιμοποιούμε τις διαμορφώνουμε με τον πρακτικότερο τρόπο ώστε να υπάρχει μικρός αριθμός ψηφίων, π.χ. 7.2 mM αντί του 0.0072 M, κλπ. Στη συνέχεια, προχωρούμε σε γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων η οποία δίδει περισσότερες πληροφορίες από ό,τι ο πίνακας, π.χ. υποδεικνύει τυχαία πειραματικά σφάλματα από το πόσο ικανοποιητικά εφαρμόζουν τα σημεία πάνω σε μία ομαλή καμπύλη, το αν υπάρχει ασυνέχεια των μετρήσεων, κλπ.

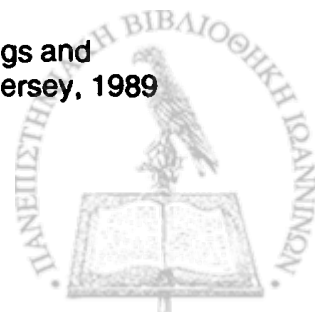
Σε περίπτωση γραμμικής συσχέτισης, του τύπου  $y=ax+b$ , η απεικόνιση  $(x,y)$  σε σύστημα συντεταγμένων θα δώσει ευθεία γραμμή με κλίση ίση με  $a$  και τεταγμένη επί την αρχή (οριζόμενη από την τομή της γραμμής με τον άξονα των  $y$ ) ίση με  $b$ .

Η ενδεδειγμένη πρακτική είναι στον οριζόντιο άξονα μιας γραφικής παράστασης (άξονα των  $x$ ) να απεικονίζεται η ανεξάρτητη μεταβλητή (γνωστές ποσότητες) και στον κατακόρυφο άξονα (άξονα των  $y$ ) η εξαρτημένη μεταβλητή (άγνωστες ή μετρούμενες ποσότητες). Επιπρόσθετα, (α) οι κλίμακες τιμών ρυθμίζονται με τρόπο ώστε η κλίση της ευθείας γραμμής (αν πρόκειται για γραμμική συσχέτιση) να είναι 45 μοιρών, (β) δίδεται ευκρινής επεξηγηματικός τίτλος καθώς και τα αντίστοιχα φυσικά μεγέθη με τις μονάδες μετρήσεων στους άξονες των  $x$  και  $y$ , (γ) ο κάθε άξονας διαιρείται σε ίσα μέρη, ανάλογα με την περιοχή μετρήσεων, και σημειώνονται επί των υποδιαιρέσεων (και μόνο) οι αντίστοιχες τιμές.



## ΒΑΣΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- L. Stryer, **Biochemistry**, third edition, W. H., Freeman & Co., San Francisco, California, 1988 [Βιοχημεία, μετάφραση Α. Αλετράς, Θ. Βαλκανά, Δ. Δραϊνας, Κ. Δραϊνας, Η. Κούβελας, Γ. Παπαδόπουλος, Μ. Παπαδόπουλος, Μ. Φράγκου-Λαζαρίδη, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997]
- D. L. Nelson and M. M. Cox, **Lehninger Principles of Biochemistry**, third edition (media connected), Worth Publishers, New York, 2000
- R. Boyer, **Concepts in Biochemistry**, Brooks/Cole Publishing Co., New York, 1999
- G. L. Zubay, W. W. Parson, D. E. Vance, **Principles of Biochemistry**, Wm. C. Brown Publishers, Oxford, England, 1994 [Αρχές Βιοχημείας, επιμέλεια Α. Καλοφούτης και Κ. Ε. Σέκερης, μετάφραση Α. Παπαλόης, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 1999]
- H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, **Molecular Cell Biology**, fourth edition (media connected), W. H. Freeman & Co., New York, 2000
- J. M. Clark and R. L. Switzer, **Experimental Biochemistry**, second edition, W. H. Freeman & Co., San Francisco, California, 1977 (Πειραματική Βιοχημεία, μετάφραση Γ. Παπαδόπουλος και Μ. Παπαδόπουλος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1991); R. L. Switzer and L. F. Garrity, **Experimental Biochemistry**, third edition, W. H. Freeman & Co., New York, 1999
- R. R. Alexander, J. Griffiths and M. Wilkinson, **Basic Biochemical Methods**, (laboratory manual), Biological Sciences 430, Cornell University, Ithaca, New York, 1982
- I. Segel, **Biochemical Calculations**, J. Wiley & Sons, New York, 1976
- T. M. Devlin (*ed.*), **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**, third edition, Wiley-Liss, Inc., New York, 1992
- A. Kaplan, L. L. Szabo, and K. E. Opheim, **Clinical Chemistry: Interpretation and techniques**, third edition, Lea & Febiger, Philadelphia, PA, 1988
- E. Harlow and D. Lane (*eds*), **Antibodies: A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988; E. Harlow and D. Lane (*eds*), **Using antibodies: A Laboratory Manual**, second edition, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999
- P. D. Boyer (*ed.*), **The Enzymes**, third edition, Academic Press, New York, 1970
- J. S. White and D. C. White, **Source Book of Enzymes**, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1997
- S. Budavari (*ed.*), **The Merck Index** (an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals), eleventh edition, Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, 1989



R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott, and K. M. Jones, **Data for Biochemical Research**, third edition, Oxford University Press, Oxford, 1987





Τυπώθηκε στο Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο  
με δαπάνη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ  
Τυπογραφείο

Διανέμεται Δωρεάν στους φοιτητές.

