

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Ι. Γεωργάτσος
Δ. Κυριακίδης
Τ. Γιουψάνης
Θ. Χολή-Παπαδοπούλου
Θ. Γιαννακούρος
Ε. Νικολακάκη
Α. Πανταζάκη
Κ. Κοτίνης
Α. Καράγιωργας
Σ. Ασβεστά

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σκοπός των εργαστηριακών ασκήσεων είναι η συμπλήρωση και η εδραίωση των γνώσεων που αποκτά ένας φοιτητής στο μάθημα της Βιοχημείας. Οι ασκήσεις γράφτηκαν για να καλύψουν τα σπουδαιότερα κεφάλαια της Βιοχημείας όπως πρωτεΐνες, ένζυμα, οξειδοαναγωγικά συστήματα, έκφραση ενζύμων στο γονιδιακό επίπεδο, απομόνωση DNA και κοπή πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού. Πιστεύουμε ότι το βιβλίο με τις ασκήσεις αυτές θα αγαπηθεί από τους φοιτητές και θα τους επιτρέψει να κατανοήσουν βαθύτερα τις ιδιότητες των μακρομορίων ως και τους διάφορους βιοχημικούς μηχανισμούς. Ευχαριστούμε τους Dr X. Μπαμπάτσικο, Dr P. Παπή, Κ. Ιωάννου και Β. Κλωναρίδου για την πολύτιμη βοήθεια κατά τη συγγραφή των ασκήσεων αυτών.

Νοέμβριος 2004

Οι συγγραφείς

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Γενικά για τις Εργαστηριακές Ασκήσεις της Βιοχημείας

Οι Εργαστηριακές Ασκήσεις στο Μάθημα της Βιοχημείας	9
Πρακτικές συμβουλές για το Εργαστήριο Βιοχημείας	9
α) Για τον επιβλέποντα εκπαιδευτή	9
β) Για τον ασκούμενο φοιτητή	10
Βασικές Εργαστηριακές Τεχνικές	12
1. Δουλεύοντας και μεταγγίζοντας υγρά	12
2. Έκφραση της συγκέντρωσης και αλληλομετατροπές μονάδων	15
Φασματοσκοπία	16
1. Γενικές αρχές	16
2. Το φασματόμετρο, ορατού/υπεριώδους	17
3. Ποσοτική φασματοσκοπική ανάλυση	18
Χρωματογραφικές Μέθοδοι	19
Γενικά	19
Τύποι χρωματογραφίας	19
Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος ή επίπεδο χρωματογραφία	20
Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης	21
Χρωματογραφικοί μηχανισμοί διαχωρισμού	23
Μέθοδοι Ηλεκτροφόρησης	30
Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών	33
Φασματομετρικός προσδιορισμός πρωτεΐνης	33
Μέθοδος διουρίας	33
Μέθοδος Lowry ή Follin-Ciocalteu	34
Μέθοδος Bradford	34

Ασκήσεις – Πειραματικό Μέρος

1 ^η Άσκηση: Πρωτεΐνες: Απομόνωση και Μελέτη Ιδιοτήτων Μυοσΐνης	37
2 ^η Άσκηση: Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων	49
3 ^η Άσκηση: Οξειδοαναγωγικά Ένζυμα	57
4 ^η Άσκηση: Ρύθμιση Γονιδιακής Έκφρασης στο Βακτήριο <i>Escherichia coli</i> (BL21)	67

5 ^η Άσκηση: Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA	77
6 ^η Άσκηση: Κοπή Ανασυνδασμένου Πλασμιδιακού DNA με ΕνδονουκLEASE Περιορισμού	83
7 ^η Άσκηση: Βάσεις Δεδομένων Νουκλεϊνικών Οξέων και Πρωτεϊνών	87

Αναφορά Αποτελεσμάτων

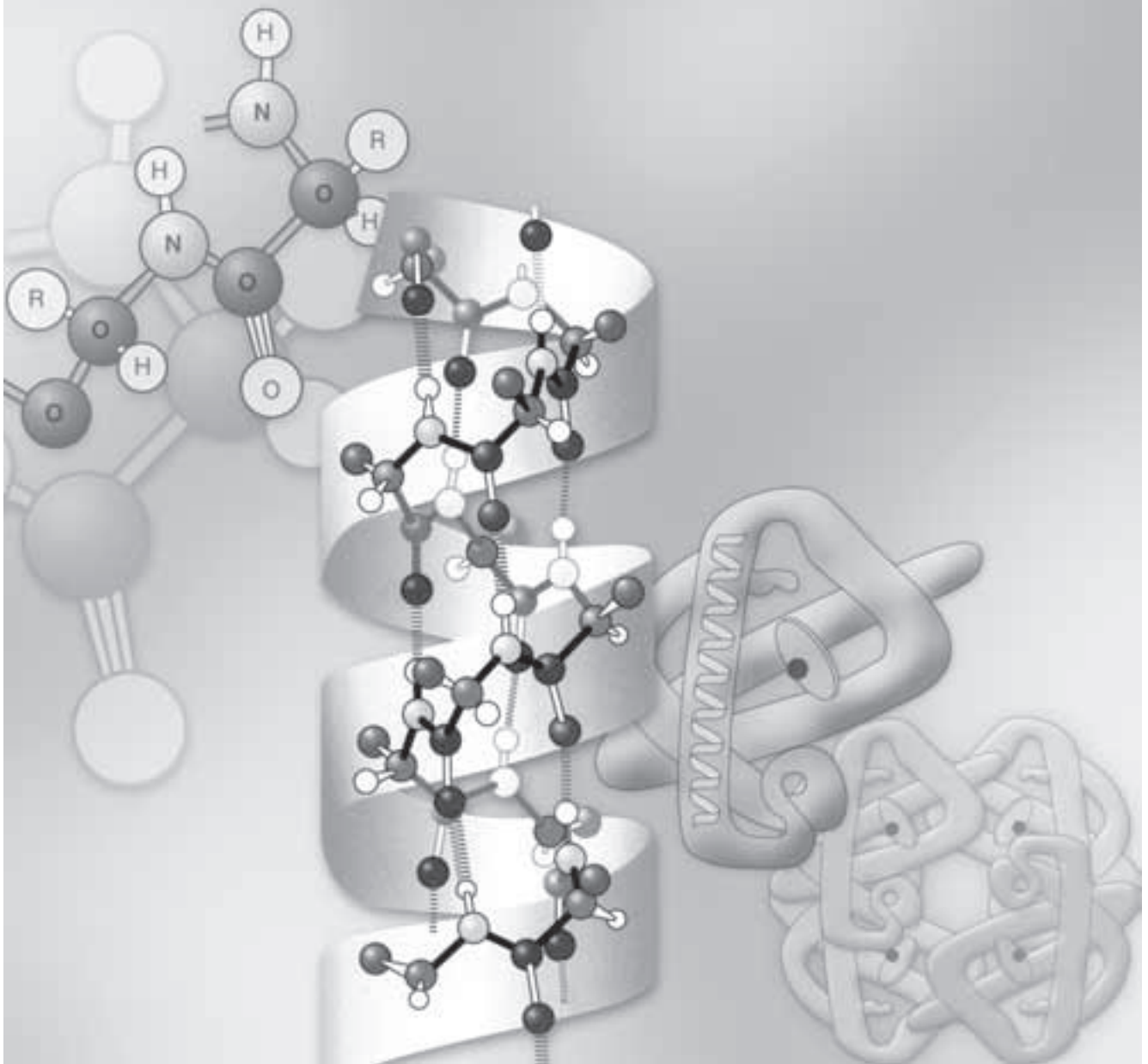
1 ^η Άσκηση: Πρωτεΐνες: Απομόνωση και Μελέτη Ιδιοτήτων Μυοσίνης.....	101
2 ^η Άσκηση: Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων.....	107
3 ^η Άσκηση: Οξειδοαναγωγικά Ένζυμα.....	115
4 ^η Άσκηση: Ρύθμιση Γονιδιακής Έκφρασης στο Βακτήριο <i>Escherichia coli</i> (BL21) ...	121
5 ^η Άσκηση: Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA	125
6 ^η Άσκηση: Κοπή Ανασυνδασμένου Πλασμιδιακού DNA με ΕνδονουκLEASE Περιορισμού	129
7 ^η Άσκηση: Βάσεις Δεδομένων Νουκλεϊνικών Οξέων και Πρωτεϊνών	133

Απαραίτητα Αντιδραστήρια – Όργανα	137
--	------------

Βιβλιογραφία.....	145
--------------------------	------------

Ευρετήριο Όρων.....	147
----------------------------	------------

ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΟ ΜΑΘΗΜΑ ΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Οι βιομοριακές επιστήμες, όπως η βιοχημεία και η μοριακή βιολογία μελετούν τη μοριακή βάση της ζωής. Οι επιστήμες αυτές αναπτύχθηκαν παράλληλα με την ανάπτυξη διάφορων εργαστηριακών τεχνικών και επιδεξιότητων. Η σημασία τους γίνεται εμφανής από τη μεγάλη χρονική αναλογία που κατέχουν στα προγράμματα σπουδών στα γνωστικά πεδία των βιοεπιστημών.

Ένα εργαστηριακό βιβλίο βιοχημείας φιλοδοξεί να συμβάλει στην εκπαίδευση των φοιτητών εδραιώνοντας την ύλη που διδάσκονται στο μάθημα της Βιοχημείας.

Η παρακολούθηση των εργαστηριακών ασκήσεων βιοχημείας προαπαιτεί βασικές γνώσεις ποσοτικής χημικής ανάλυσης καθώς επίσης και γνώση βασικών εργαστηριακών τεχνικών όπως η δημιουργία διαλυμάτων, η χρήση γυάλινων και άλλων σκευών, η ετοιμασία διαδοχικών αραιώσεων κ.λ.π.

Στο εργαστήριο ο φοιτητής θα διδαχθεί, μεταξύ των άλλων, και τεχνικές που στοχεύουν στο διαχωρισμό, απομόνωση και μελέτη των ιδιοτήτων των βιομορίων. Τα βιολογικά μακρομόρια έχουν ιδιαίτερα πολύπλοκες δομές και είναι ευαίσθητα στις συνθήκες του περιβάλλοντος. Έτσι η βιοχημική εργαστηριακή άσκηση συχνά απαιτεί υπομονή, δημιουργικότητα και ικανότητα στην αντιμετώπιση προβλημάτων.

Πρακτικές συμβουλές για το Εργαστήριο Βιοχημείας

α) Για τον επιβλέποντα εκπαιδευτή

Η επιτυχία των φοιτητών αυξάνεται πολύ όταν ο επιβλέπων τους βοηθήσει στα σημεία που παρουσιάζονται δύσκολα ή δυσνόητα γι αυτούς. Μία καλή τεχνική είναι ο επιβλέπων να κάνει ένα περιληπτικό σχεδιάγραμμα για τα πειράματα που είναι να γίνουν κάθε μέρα. Αυτό δίνει στους φοιτητές μία σαφέστερη εικόνα για τα κύρια στάδια του πειράματος.

Πρέπει να κάνουμε τους φοιτητές να αισθάνονται άνετα στο εργαστήριο και προκειμένου να έχουν μία θετική εργαστηριακή εμπειρία θα πρέπει ο επιβλέπων:

1. Να προβλέπει τα πιθανά λάθη που θα κάνουν οι ασκούμενοι και να τους τα επισημαίνει.
2. Να έχει ευχέρεια με τη διαδικασία του πειράματος και να μπορεί να επικεντρωθεί στη θεωρία του κατά τη σύντομη εισαγωγή που προηγείται της εργαστηριακής άσκησης.
3. Να επιβραβεύει διαρκώς τις μικρές τους επιτυχίες στη διεκπεραίωση απλών χειρισμών.
4. Να ελέγχει το βαθμό συμμετοχής και αυτενέργειας στην άσκηση των φοιτητών παίρνοντας παρουσίες σε ανύποπτο χρόνο, μία ή περισσότερες φορές.
5. Να μονογράφει τις μετρήσεις τους στο τέλος της άσκησης.

β) Για τον ασκούμενο φοιτητή

Προκειμένου να ολοκληρωθεί με επιτυχία μια εργαστηριακή άσκηση, οι φοιτητές πρέπει να ακολουθούν τους ακόλουθους απλούς κανόνες:

1. Πρέπει να βρίσκονται στο εργαστήριο την προκαθορισμένη ώρα, γιατί μια καθυστερημένη προσέλευση παρακαλύει την εκτέλεση της άσκησης στο συγκεκριμένο χρόνο.
2. Επειδή συνήθως τα εργαστήρια γίνονται κατά ζεύγη φοιτητών, ο κάθε φοιτητής πρέπει να διακατέχεται από πνεύμα συνεργασίας διότι η ανταλλαγή ιδεών και η καλή συνεργασία μέσα στη δυάδα φέρνει και καλά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, η γραπτή παρουσίαση των αποτελεσμάτων πρέπει να φέρει την προσωπική σφραγίδα του καθενός.
3. Πρέπει να κάνουν καλή διαχείριση του εργαστηριακού χρόνου γιατί αυτό θα τους βοηθήσει σε:
 - καλύτερη αίσθηση ελέγχου πάνω στην άσκηση
 - αποφυγή βεβιασμένων μετρήσεων
 - επίτευξη μεγαλύτερης απόδοσης σε λιγότερο χρόνο
4. Πρέπει να είναι εφοδιασμένοι με το εργαστηριακό βιβλίο, την εργαστηριακή μπλούζα και την απαραίτητη γραφική ύλη.

5. Πρέπει να σέβονται τους κανόνες ασφαλείας του Εργαστηρίου και
6. Μετά το τέλος της άσκησης πρέπει να αφήσουν τη θέση τους καθαρή έχοντας τοποθετήσει τα χρησιμοποιημένα γυάλινα σκεύη στις προκαθορισμένες θέσεις. Σεβαστείτε τις συσκευές και τα υάλινα σκεύη της Βιοχημείας που είναι ακριβά.
7. Οι φοιτητές πρέπει οπωσδήποτε να έχουν προετοιμαστεί για την άσκηση από το σπίτι, διαφορετικά θα είναι σα να εκτελούν μία “συνταγή μαγειρικής”. Πρέπει δηλαδή να έχουν διαβάσει την άσκηση τουλάχιστον μία φορά πριν μπουν στο εργαστήριο. Αν το κάνουν αυτό θα μπορούν να λύσουν τυχόν απορίες με κατάλληλες ερωτήσεις στον επιβλέποντα, θα τους πάρει λιγότερο χρόνο να τελειώσουν την άσκηση και τέλος θα ευχαριστηθούν την άσκηση περισσότερο.
8. Οι παρατηρήσεις και τα αποτελέσματα πρέπει να καταγράφονται τη στιγμή που συλλέγονται και όχι μετά το εργαστήριο.
9. Οι φοιτητές δεν πρέπει να απογοητεύονται αν ένα πείραμα τους δώσει απρόσμενα αποτελέσματα. Η εργαστηριακή πείρα δείχνει ότι μερικές φορές το πείραμα αποτυγχάνει, για πολλούς και διάφορους λόγους, σε μια δυάδα, αλλά μπορεί να δουλεύει τέλεια σε μια άλλη δυάδα που βρίσκεται στην άλλη άκρη του εργαστηριακού πάγκου. Αν κάτι τέτοιο συμβεί προσπαθήστε να βρείτε με τη βοήθεια του επιβλέποντα την πηγή του λάθους και να την εξαλείψετε.

ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

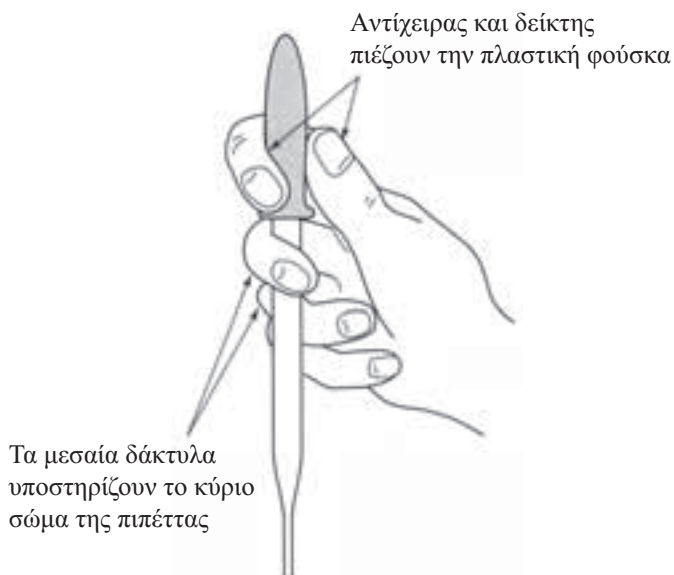
1. Δουλεύοντας και μεταγγίζοντας υγρά

Η επιλογή των συσκευών για τη μέτρηση υγρών εξαρτάται από τον όγκο, την απαιτούμενη ακρίβεια και από το πόσες φορές πρέπει να γίνει η συγκεκριμένη εργασία.

Πιπέτα Pasteur

Πρέπει να κρατιέται όπως δείχνει το Σχήμα 1.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται με μεγάλη προσοχή όταν μεταγγίζονται επικίνδυνα διαλύματα. Πρέπει να εισχωρεί μέσα στο διάλυμα ενώ ακόμη εφαρμόζουμε πίεση στον ωστήρα (φούσκα).



Σχήμα 1. Πως κρατούμε μια πιπέτα Pasteur.

Για να αποφεύγονται οι επιμολύνσεις από διάλυμα σε διάλυμα θα πρέπει η ποσότητα του προσλαμβανόμενου υγρού να μην ανέρχεται μέχρι τον ωστήρα της πιπέτας.

Ογκομετρικοί κύλινδροι και ογκομετρικές φιάλες

Πρέπει να τοποθετούνται σε οριζόντιο στήριγμα και να πληρούνται με το διάλυμα λίγο κάτω από τη ζητούμενη χαραγή. Στη συνέχεια, και με τη βοήθεια μιάς πιπέτας Pasteur, αργά-αργά να συμπληρώνεται ο όγκος έτσι ώστε ο μηνίσκος του υγρού να εφάπτεται της χαραγής.

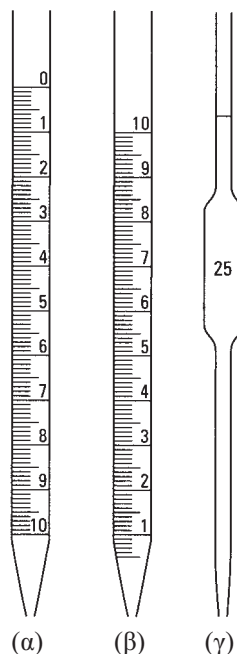
Προχοΐδες

Πρέπει να στηρίζονται σε κατάλληλες βάσεις και να βρίσκονται σε κάθετη θέση. Προσοχή, μη σφίγγετε πολύ τη λαβίδα της προχοΐδας. Βεβαιωθείτε ότι η στρόφιγγα της προχοΐδας είναι κλειστή και γεμίστε τη χρησιμοποιώντας ένα χωνί. Πριν από τη χρήση ανοίξτε τη στρόφιγγα και αφήστε να ρεύσει μία μικρή ποσότητα διαλύματος. Στη συνέχεια πάρτε την ανάγνωση του μηνίσκου καταγράφοντας την ένδειξη στις σημειώσεις σας. Μεταγγίστε μετά ανοίγοντας τη στρόφιγγα και στο τέλος πάρτε τη νέα ανάγνωση του μηνίσκου. Ο όγκος που μεταγγίστηκε ισούται με τη διαφορά ανάμεσα στις δύο αναγνώσεις. Οι τιτλοδοτήσεις συνήθως γίνονται χρησιμοποιώντας ένα μαγνητικό αναδευτήρα που εξασφαλίζει καλή ανάδευση.

Σιφώνια (πιπέτες)

Διατίθενται σε διάφορα σχήματα και όγκους και κατατάσσονται σε βαθμονομημένα και σε σιφώνια πληρώσεως (Σχήμα 2). Πριν τη χρήση, φροντίστε να παρατηρήσετε την κλίμακα του όγκου πάνω στο σιφώνιο.

Για λόγους ασφαλείας δεν πρέπει να γίνεται αναρρόφηση με το στόμα, αλλά να χρησιμοποιούνται οι ωστήρες (poire).

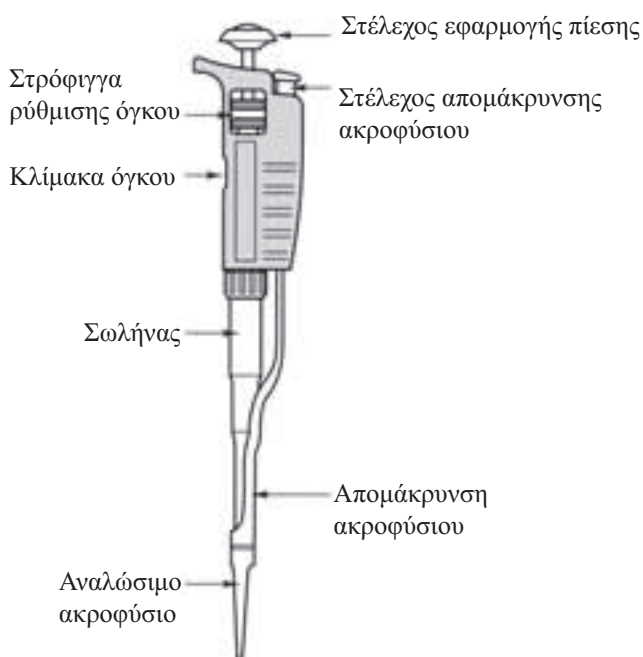


Σχήμα 2. Σιφώνιο πληρώσεως και βαθμονομημένα.

Αυτόματες πιπέτες

Υπάρχουν δύο τύποι:

- για δουλειά ρουτίνας με αραιά υδατικά διαλύματα. Η πιο διαδεδομένη αυτής της κατηγορίας είναι η πιπέτα Gilson (από 20 μ l – 1000 μ l) (Σχήμα 3).
- για πυκνά ή πτητικά υγρά ή για τεχνικές στη μοριακή βιολογία (PCR) (από 1 μ l – 20 μ l).



Σχήμα 3. Αυτόματη πιπέτα Gilson.

Πιπέτες της πρώτης κατηγορίας υπάρχουν αυτές που μεταγγίζουν σταθερό και δεδομένο όγκο, και αυτές στις οποίες ο όγκος ρυθμίζεται κάθε φορά. Σε όλους όμως τους τύπους, βεβαιωθείτε ότι έχετε καταλάβει την αρχή λειτουργίας τους όσον αφορά την κλίμακα του όγκου καθώς και πως ρυθμίζουμε κάθε φορά τους διαφορετικούς όγκους. Οι αυτόματες πιπέτες λειτουργούν πάντοτε με τα κατάλληλα αναλώσιμα ακροφύσια (tips).

2. Εκφραση της συγκέντρωσης και αλληλομετατροπές μονάδων

Η συγκέντρωση των ουσιών στις διάφορες βιοχημικές ασκήσεις εκφράζεται συνήθως ως μοριακότητα (M). Διάλυμα 1 M είναι αυτό που περιέχει 1 γραμμομόριο (mol) διαλυμένης ουσίας σε ένα λίτρο διαλύματος. Με άλλα λόγια μπορούμε να γράψουμε ότι ένα διάλυμα 1 M περιέχει 1 mol/L ή 1 mmol/ml ή 1 μmol/μl. Επιπλέον, ένα διάλυμα 1 mM περιέχει 1 mmol/L ή 1 μmol/ml. Άλλος τρόπος έκφρασης της συγκέντρωσης είναι η επί της εκατό περιεκτικότητα (%). Ένα διάλυμα 1% συνήθως σημαίνει 1 g/100 ml διαλύματος και θα έπρεπε ορθότερα να γράφεται 1% w/v. Επίσης ένα διάλυμα 1% w/w σημαίνει ότι διαλύσαμε 1 g ουσίας σε 100 g του διαλύματος. Ο φοιτητής θα πρέπει να μπορεί να κάνει αλληλομετατροπή από μοριακότητα σε εκατοστιαία αναλογία.

Ένας πολύ χρήσιμος τύπος στην εργαστηριακή πρακτική είναι ο τύπος:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (\text{νόμος αραιώσης})$$

που χρησιμοποιείται όταν θέλουμε να πάμε από τα πυκνότερα σε αραιότερα διαλύματα. Όπου C_1 και V_1 η αρχική συγκέντρωση και ο αρχικός όγκος ενώ C_2 και V_2 η τελική συγκέντρωση και ο τελικός όγκος αντίστοιχα.

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

1. Γενικές αρχές

Εδώ εκμεταλλευόμαστε την αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Όταν φωτόνια προσπέσουν πάνω στα ηλεκτρόνια μιας ένωσης, η ενέργεια των πρώτων διεγείρει τα δεύτερα σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες και η απορρόφηση αυτής της ενέργειας δίνει τα **φάσματα απορρόφησης** των διαφόρων ενώσεων.

Εάν όμως, για λόγους ενέργειας, ηλεκτρόνια διεγερθέντα μεταπίπτουν από υψηλότερες σε χαμηλότερες ενεργειακές στάθμες, τότε η εκπεμπόμενη ενέργεια δίνει τα **φάσματα εκπομπής**.

Οι διαφορετικές φασματοσκοπικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποικίλους λόγους:

- πιστοποίηση ενώσεων από τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής
- ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων είτε μεμονωμένα είτε με την παρουσία και άλλων ουσιών μετρώντας την ένδειξη ενός σήματος ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος.
- καθορισμό της μοριακής δομής
- παρακολούθηση χημικών αντιδράσεων, είτε μετρώντας την εξαφάνιση μιας ένωσης, είτε την εμφάνιση ενός προϊόντος με την πάροδο του χρόνου.

Η φασματομετρία ορατού – υπεριώδους αξιοποιεί την απορρόφηση της ακτινοβολίας με μήκος κύματος που κυμαίνεται από 200 έως 700 nm. Η αρχή αυτής της τεχνικής στηρίζεται στο νόμο Lambert-Beer ο οποίος ορίζει ότι η απορρόφηση εξαρτάται αφενός από τη συγκέντρωση της ουσίας που απορροφά και αφετέρου από το εύρος της διαδρομής του φωτός.

Εξ ορισμού, η απορρόφηση δίδεται από τον τύπο:

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

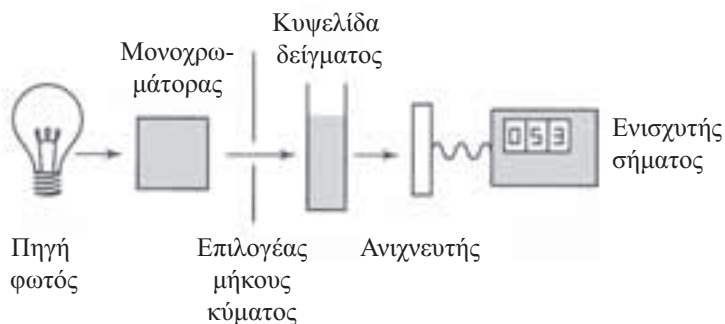
(επειδή είναι ένας λογάριθμος, γι' αυτό και δεν έχει μονάδες) όπου I_0 είναι η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και I η της διερχόμενης. Τώρα μπορούμε να γράψουμε το νόμο του Lambert - Beer ως:

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l$$

όπου ε είναι ένας **μοριακός συντελεστής απορρόφησης ή απόσβεσης** της μετρούμενης ουσίας σε καθορισμένο μήκος κύματος λ , C είναι η συγκέντρωση του απορροφώντος διαλύματος και l είναι το μήκος της διαδρομής του φωτός μέσα από το διάλυμα (ή διαφορετικά το πάχος της κυψελίδας κατά μήκος της διαδρομής του φωτός).

2. Το φασματόμετρο, ορατού/υπεριώδους

Τα κύρια μέρη του οργάνου φαίνονται στο Σχήμα 4. Λάμπες βολφραμίου χρησιμοποιούνται ως πηγή ακτινοβολίας στην περιοχή του ορατού (π.χ. 400-700 nm). Λάμπες δευτερίου χρησιμοποιούνται στη φασματοσκοπία του υπεριώδους (200-400 nm). Στη συνέχεια παρεμβάλλεται ο μονοχρωμάτορας που είναι ένα πρίσμα από τον οποίο βγαίνει μία στενή δέσμη από μήκη κύματος. Αυτή η περιοχή μηκών κύματος στα συνήθη φασματοφωτόμετρα είναι 5-10 nm. Στη συνέχεια αυτή η δέσμη του φωτός διέρχεται από μία σχισμή η οποία περιορίζει ακόμη περισσότερο το εύρος και την ένταση της ακτινοβολίας. Τα περισσότερα φασματοφωτόμετρα ορατού/υπεριώδους δέχονται κυψελίδες με οπτικό μήκος διαδρομής (l) 10 mm. Οι πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης είναι κατάλληλες για δουλειά ρουτίνας στην ορατή περιοχή, όταν χρησιμο-



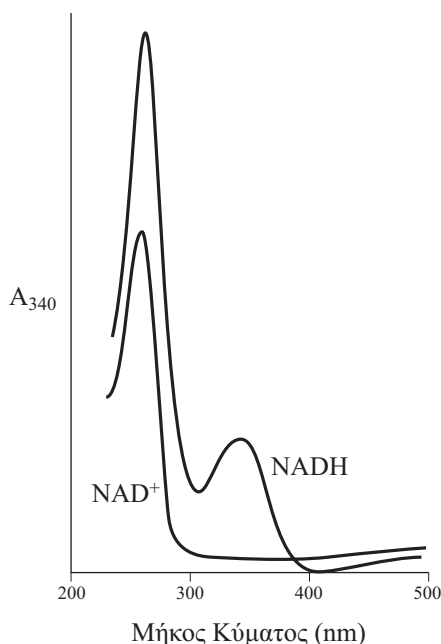
Σχήμα 4. Διάταξη ενός φασματοφωτομέτρου ορατού/υπεριώδους.

ποιούνται υδατικά ή αλκοολούχα διαλύματα, ενώ οι γυάλινες κυψελίδες είναι χρήσιμες για άλλους οργανικούς διαλύτες. Οι γυάλινες και πλαστικές κυψελίδες απορροφούν το υπεριώδες γι' αυτό για μήκη κύματος μικρότερα των 300nm χρησιμοποιούνται κυψελίδες από χαλαζία. Μετά τη διέλευση της μέσα από το δείγμα η δέσμη του φωτός προσπίπτει πάνω στον ανιχνευτή που συνήθως είναι ένα φωτοκύτταρο και έτσι η προσπίπτουσα ακτινοβολία μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα.

3. Ποσοτική φασματοσκοπική ανάλυση

Μία καθαρή ένωση σε διάλυμα μπορεί να προσδιορισθεί ποσοτικά χρησιμοποιώντας τον νόμο του Lambert-Beer, με την προϋπόθεση ότι γνωρίζουμε το συντελεστή μοριακής απόσβεσης ϵ .

Αυτή η απλή διαδικασία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα διάλυμα που περιέχει διάφορες ενώσεις που όλες απορροφούν στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Σε αυτήν την περίπτωση μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσόν της κάθε ένωσης μετρώντας την απορρόφηση σε διαφορετικά μήκη κύματος και εφαρμόζοντας κατάλληλο αλγόριθμο.



Σχήμα 5. Φάσματα απορρόφησης του νικοτιναμιδοαδενινο-δινουκλεοτιδίου στην οξειδωμένη (NAD^+) και στην αναγμένη ($NADH$) μορφή. Παρατηρείστε το μέγιστο απορρόφησης στα 340 nm (A_{340}) που χρησιμοποιείται για προσδιορισμό του $NADH$.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γενικά

Η χρωματογραφία είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει μεμονωμένα συστατικά μέσα σε ένα δείγμα, με βάση τις διαφορές τους σε ορισμένα φυσικά χαρακτηριστικά τους όπως π.χ. το μέγεθος του μορίου, το σχήμα, το φορτίο, την πτητικότητα, τη διαλυτότητα κ.λ.π.

Ιστορικά, το πρώτο πείραμα χρωματογραφίας έγινε από το Ρώσο χημικό Mikhail Tswett, ο οποίος το 1903 διαχώρισε χρωστικές φυτών χρησιμοποιώντας μία στήλη γεμάτη με ανθρακικό ασβέστιο.

Η βάση όλων των τύπων της χρωματογραφίας είναι ο λεγόμενος συντελεστής κατανομής (K_d) ο οποίος περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο μία ένωση κατανέμεται ανάμεσα σε δύο μη αναμίξιμες φάσεις Α και Β. Η τιμή του K_d για μία δεδομένη θερμοκρασία είναι σταθερή και δίνεται από τον τύπο:

$$K_d = \frac{\text{συγκέντρωση στη φάση Α}}{\text{συγκέντρωση στη βάση Β}}$$

Σε γενικές γραμμές όλα τα χρωματογραφικά συστήματα αποτελούνται από μία **στατική φάση** η οποία μπορεί να είναι στερεή, πηκτική (gel), υγρή ή ένα μείγμα στερεού-υγρού, και μια **κινητή φάση** η οποία μπορεί να είναι υγρή ή αέρια και η οποία ρέει πάνω ή διαμέσου της στατικής φάσης. Η επιλογή των δύο φάσεων γίνεται έτσι ώστε οι ενώσεις που θέλουμε να διαχωριστούν, να έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής.

Τύποι χρωματογραφίας

Μπορούμε να πετύχουμε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με δύο βασικές τεχνικές:

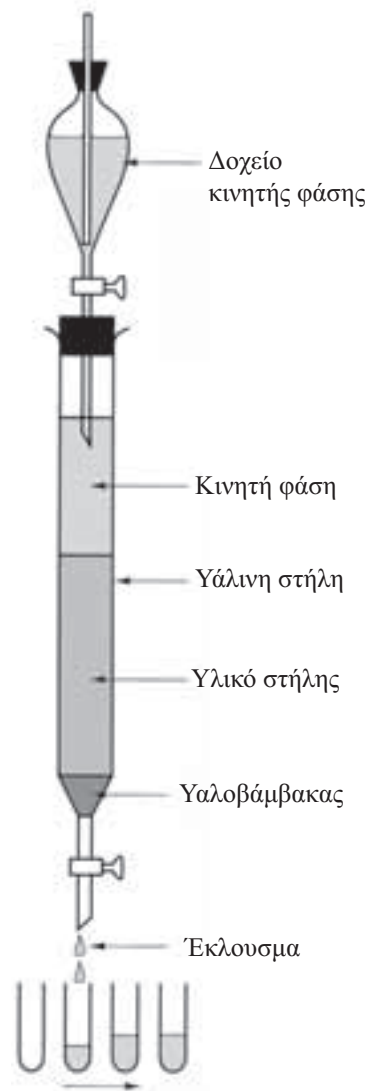
Χρωματογραφία στήλης: εδώ η στατική φάση βρίσκεται μέσα σε μία γυάλινη ή πλαστική ή μεταλλική στήλη, ενώ η κινητή φάση περνά δια μέσου της

στήλης είτε λόγω βαρύτητας ή με τη χρήση περισταλτικής αντλίας, με διοχέτευση αερίου υπό πίεση. Αυτός είναι ο συνηθέστερος τύπος χρωματογραφίας. Το προς διαχωρισμό δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης έτσι ώστε να δημιουργήσει μία διακριτή ζώνη. Στη συνέχεια το δείγμα εκλύεται από την κινητή φάση. Εάν οι διάφορες ουσίες του δείγματος έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής, θα διαχωριστούν μέσα στη στήλη, και θα εκλουσθούν (εξέλθουν) σε διαφορετικούς χρόνους όσο η κινητή φάση θα περνά δια μέσου της στήλης. Εάν κάτω από τη στήλη τοποθετηθεί κλασματοσυλλέκτης, χειροκίνητος ή αυτόματος, μπορούν να συλλεγούν τα διαφορετικά κλάσματα καθώς βγαίνουν από τη στήλη, με όγκο 2-5 % του όγκου του υλικού της στήλης (Σχήμα 6).

Ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό για να εξέλθει από τη στήλη ονομάζεται **χρόνος κατακράτησης t_R** (retention time), ενώ ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για την έκλυση ενός συγκεκριμένου συστατικού από τη χρωματογραφική στήλη, ονομάζεται **όγκος κατακράτησης V_R** (retention volume)

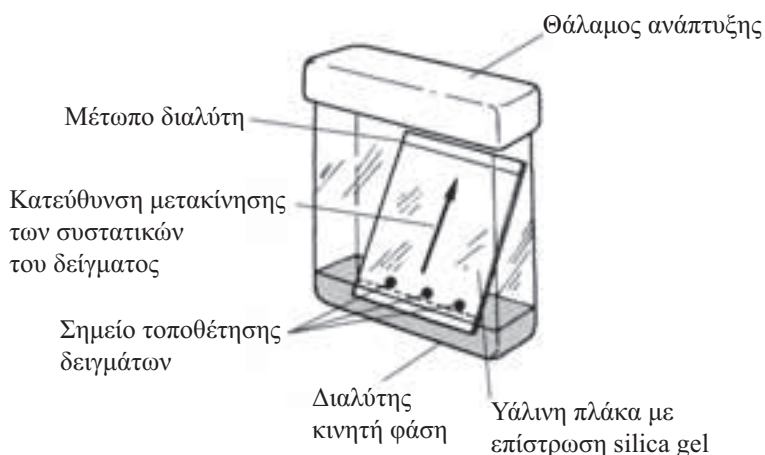
Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC) ή επίπεδη χρωματογραφία

Εδώ η στατική φάση ενσωματωμένη σε μία κατάλληλη μήτρα επιστρώνεται μια λεπτή στοιβάδα πάνω σε μία γυάλινη, πλαστική ή μεταλλική πλάκα. Η κινητή υγρή φάση διαπερνά κατά μήκος την πλάκα της λεπτής στοιβάδας που κρατιέται οριζόντια ή κατακόρυφα, ωθούμενη (η υγρή φάση) από τριχοειδή φαινόμενα. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνεται και η χρωματογραφία χάρτου



Σχήμα 6. Συσσκευή για χρωματογραφία στήλης

στην οποία η στατική υγρή φάση υποστηρίζεται από τις ίνες κυτταρίνης που περιέχει το χαρτί. Στην επίπεδη χρωματογραφία το δείγμα επιστάζεται με μικροσύριγγα ή τριχοειδή σωλήνα σαν μία κηλίδα στη μία άκρη της χρωματογραφικής πλάκας.



Σχήμα 7. Διάταξη ενός συστήματος TLC

Στη συνέχεια αφήνεται να στεγνώσει εντελώς και μεταφέρεται μέσα σε ειδικό χρωματογραφικό θάλαμο ο οποίος περιέχει στη βάση του μία λεπτή στρώση από το διαλύτη. (Σχήμα 7). Ο διαλύτης (κινητή φάση) αρχίζει να διατρέχει την πλάκα (ή το φύλλο) και συνήθως αφήνεται να διατρέξει μία απόσταση 15-18 cm από τη βάση της πλάκας (ή 80-90 % του μήκους της). Μπορούμε να περιγράψουμε την κίνηση ενός συγκεκριμένου συστατικού του δείγματος αναφερόμενοι στον **παράγοντα συγκράτησης** R_F όπου:

$$R_F = \frac{\text{απόσταση που διανύθηκε από το συστατικό}}{\text{απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη}}$$

Η τιμή του R_F είναι χαρακτηριστική για κάθε ένωση και συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών και αντανακλά την κατανομή της ένωσης αυτής ανάμεσα στη σταθερή και κινητή φάση. Μπορεί να βρει κανείς πίνακες με τιμές R_F για διάφορα βιολογικά μόρια.

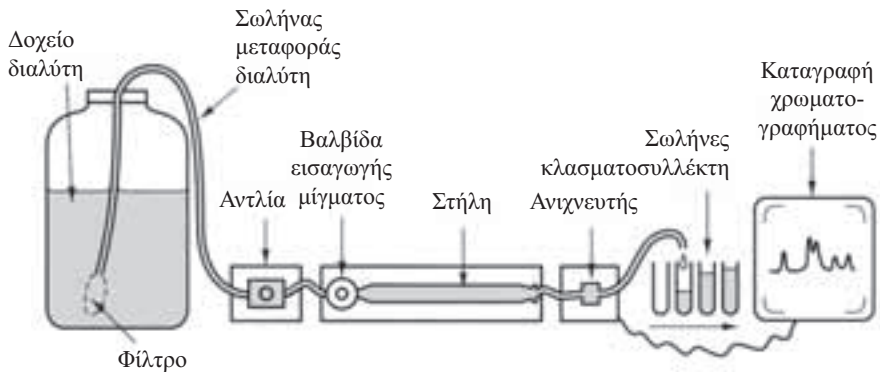
Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Η χρωματογραφία στήλης αρχικά χρησιμοποιούσε μεγάλες και μαλακές

στατικές φάσεις που απαιτούν ροή χαμηλής πίεσης για την αποφυγή συμπίεσης του υλικού. Έτσι οι διαχωρισμοί ήταν χρονοβόροι και χαμηλής ανάλυσης. Όμως, στη συνέχεια με την ανάπτυξη της τεχνολογίας παρήχθησαν μικρόκοκκα υλικά πλήρωσης που αντέχουν σε μεγάλες πιέσεις και σχεδιάστηκαν αντλίες μεγάλης πίεσης με σταθερή ροή. Σήμερα έχουν εξελιχθεί συστήματα υψηλής απόδοσης όπως η HPLC (High Pressure-Performance Liquid Chromatography). Τα συστήματα αυτά μπορούν να λειτουργούν με πίεση που φτάνει τα 10 MPa, υποχρεώνοντας την κινητή φάση να ρέει με μεγάλη ταχύτητα και έτσι να πετυχαίνουν μείωση του χρόνου και παράλληλα μειωμένο εύρος της κορυφής πράγμα που οφείλεται στα μικρόκοκκα υλικά πλήρωσης της στήλης.

Οι στήλες HPLC είναι συνήθως κατασκευασμένες από ανοξείδωτο ατσάλι και έχουν μήκος 15-50 cm και εσωτερική διάμετρο 1 έως 4 mm παρόλο που στο εμπόριο διατίθενται και ακόμη μικρότερα μεγέθη. Μπορούν να αγοραστούν έτοιμες με το υλικό πλήρωσης τοποθετημένο. Πολλοί όμως ερευνητές προτιμούν να πακετάρουν οι ίδιοι τις στήλες για λόγους οικονομικούς.

Ανάλογα με τη χρωματογραφική αρχή διαχωρισμού (απορρόφηση, κατανομή, ιοντοανταλλαγή, αποκλεισμός) χρησιμοποιούνται και τα ανάλογα υλικά πλήρωσης.



Σχήμα 8. Διάταξη ενός συστήματος HPLC

Στην **υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης**, η στατική φάση είναι μία πολική ένωση όπως π.χ αλκυλονιτρίλιο ή μία αλκυλαμίνη και η κινητή φάση είναι ένας μη πολικός διαλύτης π.χ εξάνιο.

Στην **υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)**, η στατική φάση είναι μία μη πολική ένωση π.χ οκτασιλάνιο (OS) και η κινητή φάση είναι ένας πολικός διαλύτης όπως π.χ νερό/ακετονιτρίλιο ή νερό/μεθανόλη.

Η επιλογή του συστήματος προώθησης του διαλύτη (κινητή φάση) διά μέσου της στήλης εξαρτάται από τον τύπο του διαχωρισμού που γίνεται:

- Ισοκρατικός διαχωρισμός: ένας μόνο διαλύτης ή μείγμα διαλυτών διατηρείται σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης.
- Διαχωρισμός διαβαθμισμένης συγκέντρωσης: η σύσταση της κινητής φάσης αλλάζει με την πάροδο του χρόνου με τη χρήση προγραμματιστή.

Οι στήλες στα συστήματα HPLC είναι συνδεδεμένες με έναν ανιχνευτή υψηλής ευαισθησίας, π.χ. οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν φασματοφωτομετρικά με ένα φωτόμετρο που ανιχνεύει την απορρόφηση στα 280 nm. Άλλοι ανιχνευτές μετρούν αλλαγές στο φθορισμό, στην αγωγιμότητα κλπ.

Η ταχύτητα, η ευαισθησία και η πολλαπλή χρησιμότητα της HPLC την καθιστούν ως την πιο κατάλληλη μέθοδο διαχωρισμού μικρών μορίων βιολογικού ενδιαφέροντος. Ο διαχωρισμός μεγαλομορίων, ιδιαίτερα πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων, απαιτεί στήλες από τιτάνιο ή γυαλί καθώς και τη χρήση χαμηλότερων πιέσεων για την αποφυγή της μετουσίωσης. Τα συστήματα αυτά είναι γνωστά ως FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography).

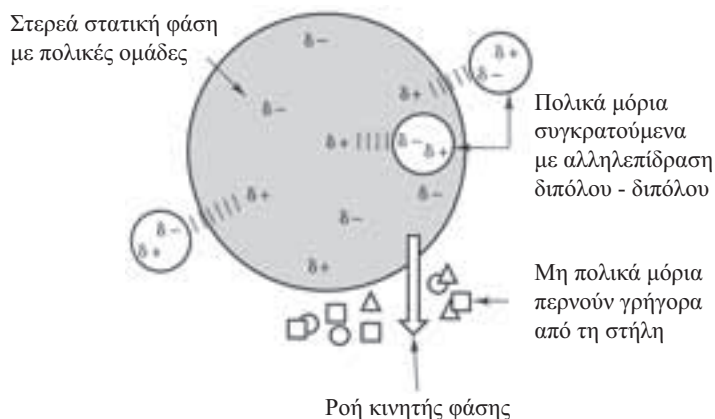
Χρωματογραφικοί μηχανισμοί διαχωρισμού

Ανάλογα με το μηχανισμό, σύμφωνα με τον οποίο γίνεται ο διαχωρισμός, προκύπτουν τα εξής είδη χρωματογραφίας:

1. Χρωματογραφία προσρόφησης

Είναι ο πιο κλασικός μηχανισμός χρωματογραφίας. Στηρίζεται στην ιδιότητα μερικών στερεών προσροφητικών ουσιών να συγκρατούν διάφορα μόρια πάνω στην επιφάνειά τους με ασθενείς μη ιοντικές ελκτικές δυνάμεις διπόλου-διπόλου, με δεσμούς υδρογόνου και με δεσμούς Van der Waals. Εδώ ο διαχωρισμός γίνεται ανάμεσα σε ουσίες με παρόμοια δομή αλλά διαφορετική πολικότητα. Καθώς ο διαλύτης (κινητή φάση) εκκλύει σταθερά το προσροφητικό υλικό (στατική φάση) οι διαφορές στη δύναμη της δέσμευσης είναι αυτές που δίνουν το διαχωρισμό.

Το συνθέστερο προσροφητικό υλικό είναι η πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (Silica gel) καθώς και το τριοξείδιο του αλουμινίου (Al_2O_3). Στο μηχανισμό προσρόφησης στηρίζονται τόσο η επίπεδη λεπτή στοιβάδα χρωματογραφία (TLC) όσο και η χρωματογραφία στήλης, ενώ ανάλογα με την πολικότητα στατικής και κινητής φάσης διακρίνουμε τις χρωματογραφίες κανονικής και αντίστροφης φάσης.



Σχήμα 9. Χρωματογραφία προσρόφησης

Η χρωματογραφία αυτή βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ουσιών με παρόμοια δομή αλλά διαφορετική πολικότητα.

Στη χρωματογραφία με κρυσταλλικό υδροξυαπατίτη ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) η σπουδαιότερη εφαρμογή είναι ο διαχωρισμός μονόκλωνου από δίκλωνο DNA.

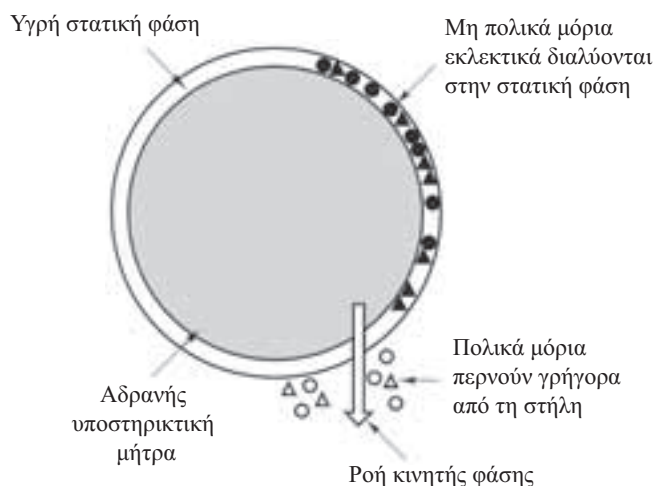
2. Χρωματογραφία κατανομής

Όπως και οι άλλοι τύποι χρωματογραφίας έτσι και η χρωματογραφία κατανομής στηρίζεται στις διαφορετικές τιμές του **συντελεστή κατανομής k_d** και του **παράγοντα κατακράτησης k'** των προς διαχωρισμό ουσιών. Εδώ και η στατική και η κινητή φάση είναι υγρές και μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο κατηγορίες: την **υγρή-υγρή χρωματογραφία** στην οποία η υγρή στατική φάση είναι υποστηριζόμενη από ένα στερεό ή μία πηκτή (μήτρα) με απλό φυσικό τρόπο, και στην **υγρή χρωματογραφία δεσμευμένης φάσης** στην οποία η στατική είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με μία μήτρα (matrix).

Ενώσεις οι οποίες είναι περισσότερο διαλυτές στην κινητή φάση θα εκλουσθούν γρηγορότερα ενώ εκείνες οι οποίες προτιμούν περισσότερο τη στατική φάση θα καθυστερήσουν. Στη χρωματογραφία κατανομής κανονικής φάσης η στατική φάση είναι ένας πολικός διαλύτης, κυρίως νερό, υποστηριζόμενος από μία στερεή μήτρα (π.χ. ίνες κυτταρίνης στη χρωματογραφία χάρτου) και η κινητή φάση είναι ένας μη πολικός οργανικός διαλύτης.

Στη χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης η στατική φάση είναι ένας μη πολικός διαλύτης (π.χ. ένας υδρογονάνθρακας C_{18} , όπως το δεκαοκτοσιλάνιο - $\text{Si} - \text{C}_{18}\text{H}_{37}$) το οποίο είναι χημικά συζευγμένο με ένα πορώδες υποστηρικτικό υλικό (π.χ. silica) ενώ η κινητή φάση μπορεί να επιλεγεί από ένα

ευρύ φάσμα πολικών διαλυτών, συνήθως νερό ή υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει ακετονιτρίλιο. Υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών, πολικών και ιοντικών βιομορίων, όπως πεπτιδίων, πρωτεϊνών, ολιγοσακχαριτών και βιταμινών.



Σχήμα 10. Χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού

3. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Αυτός ο τύπος της χρωματογραφίας βασίζεται στην έλξη ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα σωματίδια. Πολλά βιολογικά μόρια, π.χ τα αμινοξέα και οι πρωτεΐνες έχουν πάνω τους ομάδες που ιονίζονται και το γεγονός ότι μπορούν να φέρουν ένα καθαρό θετικό ή αρνητικό φορτίο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο διαχωρισμό αυτών των ενώσεων. Το καθαρό φορτίο που εμφανίζουν αυτές οι ενώσεις εξαρτάται από την τιμή pK_a και το pH όπως, ως γνωστόν, ορίζει η εξίσωση των Henderson –Hasselbalch.

Διαχωρισμοί με βάση την ιοντοανταλλαγή λαμβάνουν χώρα, κυρίως, μέσα σε στήλες οι οποίες είναι γεμάτες με έναν ιοντανταλλάκτη (π.χ. ρητίνη). Υπάρχουν δύο τύποι ιοντοαντάλακτη: ο κατιοντανταλλάκτης και ο ανιοντοαντάλακτης. Ο κατιοντοανταλλάκτης φέρει αρνητικά φορτισμένες ομάδες οι οποίες θα έλξουν θετικά φορτισμένα κατιόντα. Ο ανιοντοανταλλάκτης έχει θετικά φορτισμένες ομάδες που θα έλξουν αρνητικά φορτισμένα ανιόντα.

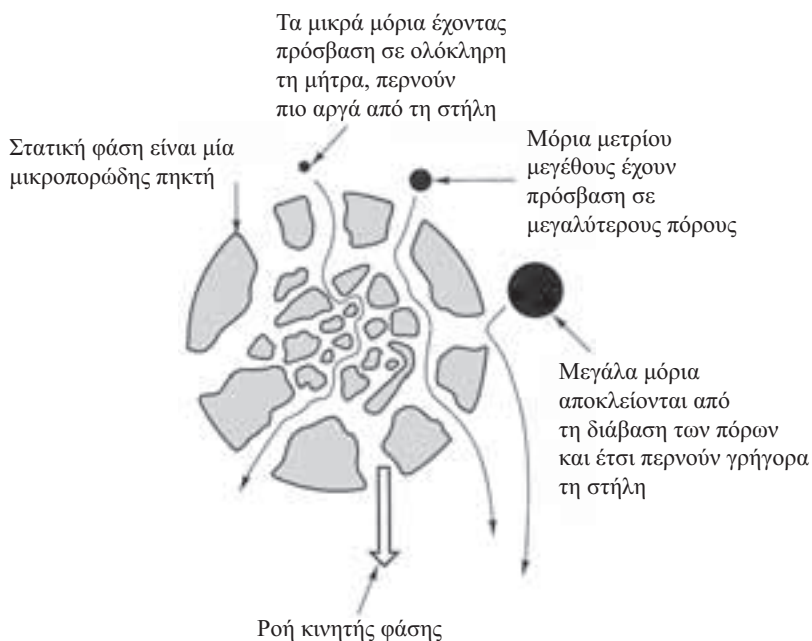
Για τις περισσότερες πρακτικές εφαρμογές επιλέγουμε μια ιοντοανταλλακτική ρητίνη και ένα ρυθμιστικό διάλυμα έτσι ώστε οι προς διαχωρισμό ενώσεις να δεσμευθούν πάνω στη ρητίνη με ηλεκτροστατικές δυνάμεις καθώς περ-

νούν μέσα από τη ρητίνη, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις του δείγματος εκλούνται γρήγορα. Στη συνέχεια οι ενώσεις που έχουν συγκρατηθεί εκλούνται από τη στήλη όταν διέλθει η κινητή φάση που έχει αυξανόμενες συγκεντρώσεις αλάτος. Μόρια που είναι ασθενώς συγκρατημένα από τη ρητίνη θα εκλουσθούν πρώτα, ενώ άλλα που είναι ισχυρότερα δεσμευμένα θα εκλουσθούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων.

4. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

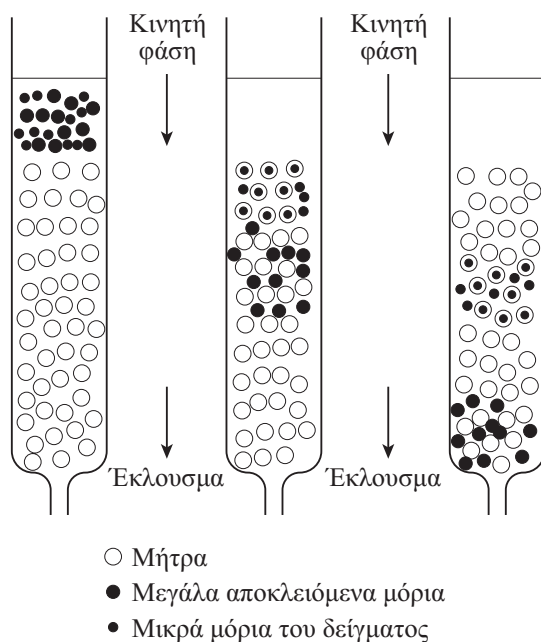
Εδώ η στατική φάση είναι υπό μορφή σφαιριδίων πηκτώματος που περιέχουν πόρους ορισμένου μεγέθους. Το μέγεθος των πόρων ελέγχεται έτσι ώστε, σε μοριακό επίπεδο, οι πόροι να συμπεριφερθούν σαν πύλες οι οποίες θα επιτρέψουν στα μικρά μόρια να περάσουν μέσα τους, ενώ παράλληλα θα αποκλείσουν τα μεγάλα. Εν τούτοις, αυτό το παράδειγμα της πύλης δεν είναι ένα φαινόμενο του “όλα ή τίποτα”. Μόρια με ενδιάμεσα μεγέθη διέρχονται μερικώς από τους πόρους.

Τα υλικά πλήρωσης που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν δεξτράνια (π.χ. Sephadex) αγαρόζη (Sephacrose, Bio-Gel) πολυακρυλαμίδιο (Bio-Gel P), πολυστερένια (Bio-Beads) κ.λ.π.



Σχήμα 11. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

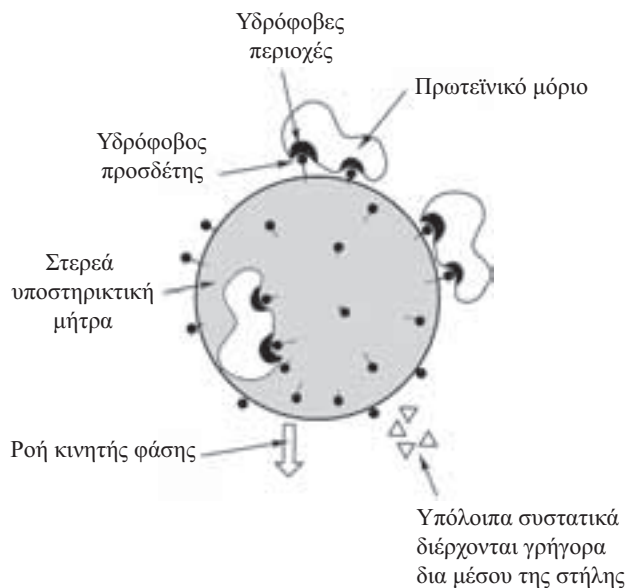
Η κύρια εφαρμογή της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης είναι ο καθαρισμός βιολογικών μακρομορίων, διευκολύνοντας το διαχωρισμό μεταξύ μεγάλων και μικρών μορίων. Εξ άλλου οι χρόνοι έκλουσης σφαιρικών πρωτεϊνών καθορίζονται κατά πολύ από τα σχετικά μοριακά τους βάρη. Έτσι έχει δειχθεί ότι για ένα μεγάλο εύρος μοριακών βαρών οι χρόνοι έκλουσης είναι μία περίπου γραμμική λογαριθμική συνάρτηση του Μ.Β. Εάν λοιπόν κατασκευάσουμε μία πρότυπη καμπύλη με πρωτεΐνες παρόμοιου μεγέθους και γνωστών Μ.Β. μπορούμε να βρούμε τα Μ.Β. άλλων πρωτεϊνών.



Σχήμα 12. Διαχωρισμός μορίων διαφορετικών διαστάσεων με την χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

5. Υδρόφοβη χρωματογραφία

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει πρωτεΐνες και εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι πολλές πρωτεΐνες έχουν επάνω στην επιφάνειά τους υδρόφοβες περιοχές, που τις δημιουργούν υδρόφοβα αμινοξέα (π.χ. λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, φαινυλαλανίνη). Οι πρωτεΐνες διαφέρουν ως προς τη φύση και την έκταση των υδρόφοβων περιοχών.



Σχήμα 13. Υδροφοβή χρωματογραφία

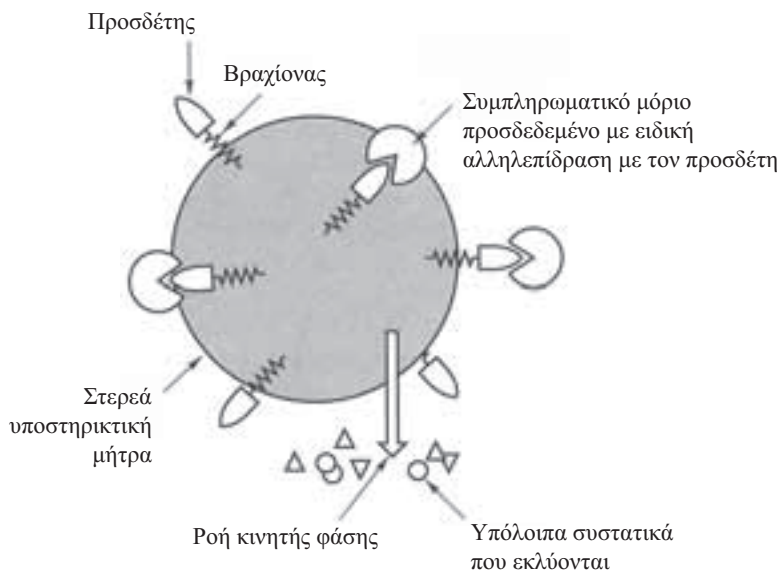
Η αρχή σε αυτόν το χρωματογραφικό μηχανισμό μοιάζει με την αρχή της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) κατά το ότι περιλαμβάνει υδροφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα συστατικά του δείγματος και στη μη πολική στατική φάση. Η διαφορά τους όμως είναι ότι στην RP-HPLC μετά το διαχωρισμό τους οι πρωτεΐνες χάνουν τη βιολογική τους δραστηριότητα (παρόλα αυτά μερικές επανακτούν τη δραστηριότητά τους όταν διαλυθούν σε υδατικά διαλύματα).

Οι υδροφοβικοί προσδέτες (ligands) που είναι τοποθετημένοι πάνω στη στατική φάση είναι και αραιότερα τοποθετημένοι και λιγότερο χημικά υδροφοβικοί απ' ό,τι στην RP-HPLC και αυτό το γεγονός προκαλεί ηπιότερη συγκράτηση των πρωτεϊνών. Η έκλουσή τους (των πρωτεϊνών) μπορεί τέλος να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας υδατικά διαλύματα, και οι πρωτεΐνες απομονώνονται με άθικτη την τρισδιάστατη δομή τους.

6. Χρωματογραφία αγγιστείας

Με τη μέθοδο αυτή τα βιομόρια καθαρίζονται με βάση τη βιολογική τους εξειδίκευση μάλλον, παρά τις διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, ενώ η απόδοση του καθαρισμού μπορεί να είναι μεγάλη (ως και 1000 φορές).

Η τεχνική περιλαμβάνει την ακινητοποίηση μιας συμπληρωματικής δεσμευμένης ουσίας (ligand) πάνω σε μία στερεά μήτρα με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρείται η ικανότητα του ligand να δεσμεύσει άλλες ενώσεις πάνω του. Όταν ένα βιολογικό δείγμα διέλθει μέσα από μία στήλη, που έχει πληρωθεί με αυτήν την ειδική μήτρα αγκιστείας, τότε το μόριο που μας ενδιαφέρει θα δεσμευτεί πάνω στον υποδοχέα (ligand), ενώ τα υπόλοιπα συνυπάρχοντα μόρια θα εκλουσθούν με το ρυθμιστικό διάλυμα. Η έκλυση του μορίου που μας ενδιαφέρει θα γίνει είτε αλλάζοντας το pH ή την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος. Αυτό θα έχει ως συνέπεια την εξασθένηση των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτού του μορίου και του υποδοχέα, ή με επακόλουθο τη δέσμευση άλλων ενώσεων που παρουσιάζουν μεγαλύτερη αγκιστεία για τον υποδοχέα.



Σχήμα 14. Χρωματογραφία αγκιστείας

Όπως έγινε κατανοητό ο υποδοχέας πρέπει να έχει εξειδικευμένη μεν, αντιστρεπτή δε, αλληλεπίδραση με το προς καθαρισμό μόριο. Θα πρέπει επίσης να έχει μία δραστική χημική ομάδα η οποία θα του επιτρέψει την ομοιοπολική του δέσμευση πάνω στη μήτρα. Η πιο ιδανική ουσία για να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα είναι η αγαρόζη.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού που βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Ανόμοια μόρια κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες, και τα συστατικά ενός μείγματος διαχωρίζονται εάν βρεθούν μέσα σε κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο. Είναι μία ευρύτατα χρησιμοποιούμενη τεχνική, ιδιαίτερα για την ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων ή για την απόδειξη της καθαρότητας (ομοιογένειας) βιομορίων που έχουν απομονωθεί.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα φορτισμένων μορίων εξαρτάται από:

- Το καθαρό φορτίο: Αρνητικά φορτισμένα μόρια (ανιόντα) μετακινούνται προς την άνοδο (+), ενώ θετικά φορτισμένα (κατιόντα) μετακινούνται προς την κάθοδο (-). Τα μόρια που φέρουν υψηλό σθένος μετακινούνται γρηγορότερα προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο από μόρια με μικρότερο σθένος.
- Το μέγεθος: η αντίσταση λόγω τριβής που υφίστανται τα μόρια που κινούνται μέσα σε ένα διάλυμα (η μία πηκτή) είναι η αιτία για το γεγονός ότι τα μικρά μόρια κινούνται γρηγορότερα από τα μεγάλα.
- Το σχήμα: η τριβή επηρεάζεται και από το σχήμα του μορίου και έτσι η κινητικότητα θα είναι διαφορετική ανάμεσα σε σφαιρίνες και ινώδεις πρωτεΐνες ή ανάμεσα σε γραμμικό και κυκλικό DNA.
- Ένταση ηλεκτρικού πεδίου: η κινητικότητα αυξάνει με αυξανόμενη τάση του πεδίου, αλλά στην πράξη υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση υψηλής τάσης για να μην αναπτυχθούν θερμικά φαινόμενα.

Αριθμητικά η κινητικότητα (μ) μίας ένωσης δίδεται από τον τύπο:

$$\mu = \frac{q \cdot E}{r}$$

όπου q είναι το καθαρό φορτίο του μορίου, r είναι η μοριακή ακτίνα και E η ένταση του πεδίου. Τη μεγαλύτερη της εφαρμογή η ηλεκτροφόρηση τη βρίσκει

στο διαχωρισμό μεγαλομορίων κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Επειδή, όπως έχουμε προαναφέρει, το καθαρό φορτίο μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από το pH γι' αυτό και η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών γίνεται πάντοτε σε ένα σταθερό και συγκεκριμένο pH, το οποίο εξασφαλίζεται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα.

Ο διαχωρισμός των ενώσεων γίνεται πάνω σε ένα υποστηρικτικό μέσο (υπόστρωμα) που συνήθως είναι χαρτί ή πηκτή (gel).

Η **ηλεκτροφόρηση χαρτού** συνήθως χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μικρών φορτισμένων μορίων. Ένα φύλλο διηθητικού χαρτού που έχει υγρανθεί με ένα ρυθμιστικό διάλυμα διατάσσεται ανάμεσα σε δύο υποδοχές (λεκάνες) στις οποίες καταλήγουν τα ηλεκτρόδια. Μία σταγόνα του δείγματος που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί επιστάζεται πάνω στο χαρτί και στη συνέχεια ανοίγουμε το διακόπτη του ρεύματος.



Σχήμα 15. Τοποθέτηση δείγματος σε συσκευή ηλεκτροφόρησης

Μετά από μερικές ώρες και καθώς τα μόρια έχουν μετακινηθεί πάνω στο χαρτί, το χαρτί αφαιρείται, ξηραίνεται και βάφεται με μία χρωστική η οποία εκλεκτικά χρωματίζει τις προς ανάλυση ενώσεις. Κάθε κηλίδα που εμφανίζεται πάνω στο χαρτί ταυτοποιείται μετά από σύγκριση με μία ομάδα προτύπων ουσιών.

Η **ηλεκτροφόρηση πηκτής** είναι μία τεχνική ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται για διαχωρισμό πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Παρασκευάζεται ένα φύλλο πηκτής (gel) από πολυακρυλαμίδιο ή αγαρόζη και τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια.

Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα δια μέσου της πηκτής ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης. Μετά το διαχωρισμό σε ζώνες για να αποφευχθούν φαινόμενα μεταηλεκτροφορητικής διάχυσης, γίνεται σταθεροποίηση των ζωνών με κατεργασία τους με τριχλωροξικό (TCA).

Στη συνέχεια ακολουθεί η χρώση του ηλεκτροφορήματος και η πλέον συνήθης χρωστική για πρωτεΐνες, είναι το Coomassie Blue S όταν πρόκειται για πηκτή, και το Ponceau S όταν πρόκειται για χρώση πρωτεϊνών πάνω σε οξική κυτταρίνη. Η τελευταία είναι μία λιγότερο υδρόφιλη δομή από την κυτταρίνη του χαρτιού με αποτέλεσμα καλύτερη ανάλυση.

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών μπορεί να γίνει είτε απευθείας με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 280nm είτε με διάφορες μεθόδους σχηματισμού χρώματος.

Φασματομετρικός προσδιορισμός πρωτεΐνης

Η μέθοδος του φασματομετρικού προσδιορισμού πρωτεΐνης στηρίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή με μέγιστο στα 280 nm, λόγω της παρουσίας των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνης και κυρίως τρυπτοφάνης. Η μέθοδος έχει αρκετά μειονεκτήματα όπως η μη ικανοποιητική ακρίβεια και εξειδίκευση, δεδομένου ότι και άλλες ουσίες εκτός από τις πρωτεΐνες απορροφούν στα 280 nm. Έχει όμως το μεγάλο πλεονέκτημα ότι κατά τη μέτρηση το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα δεν καταστρέφεται. Καθαρά διαλύματα πρωτεϊνών συγκέντρωσης 1 mg/ml πρωτεΐνης, παρουσιάζουν απορρόφηση στα 280 nm περίπου 1,0 όταν προσδιορίζονται σε κυψελίδα 1 cm. Τα νουκλεϊνικά οξέα με μέγιστο απορρόφησης στα 260 nm παρουσιάζουν σημαντική απορρόφηση και στα 280 nm. Μπορεί να γίνουν οι κατάλληλες διορθώσεις, δεδομένου ότι ξέρουμε για καθαρές πρωτεΐνες ο λόγος της απορρόφησης στο 280/260 nm είναι περίπου 1,75, ενώ για καθαρά νουκλεϊνικά οξέα ο λόγος 280/260 nm είναι 0,5. Υπάρχουν πίνακες που δίνουν τις ενδιάμεσες τιμές και αντιστοιχούν σε μίγματα πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων.

Μέθοδος διουρίας (Biuret)

Οι πεπτιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών όταν αντιδράσουν με αραιό διάλυμα θειϊκού χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζουν εσωτερικά σύμπλοκα με χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα. Η μέθοδος αναφέρεται ως Biuret μέθοδος διότι η διουρία δίνει θετική αντίδραση με το χαλκό.

Η ευαισθησία της μεθόδου δεν είναι πολύ ικανοποιητική και απαιτεί για το σχηματισμό συμπλόκου 1-20 mg πρωτεΐνης.

Μέθοδος Lowry ή Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος αυτή που χρησιμοποιείται από το 1951 απαιτεί την παρασκευή δύο διαλυμάτων και χρόνο περίπου 1,5-2 ώρες. Το χρώμα που δημιουργείται ύστερα από αντίδραση της πρωτεΐνης με το αλκαλικό διάλυμα του χαλκού, όπως στην περίπτωση διουρίας, και την περαιτέρω αναγωγή των φωσφορομολυβδαινικών και φωσφοροβολφραμικών αλάτων από την τυροσίνη και την τρυπτοφάνη των πρωτεϊνών έχει ένα μέγιστο απορρόφησης και μπορεί να μετρηθεί. Επειδή οι διάφορες πρωτεΐνες περιέχουν διάφορα ποσά τυροσίνης και τρυπτοφάνης θα πρέπει να αναφέρεται η πρωτεΐνη με την οποία σχεδιάζεται η πρότυπος ευθεία. Η ευαισθησία της μεθόδου απαιτεί μέχρι και 5 mg πρωτεΐνης.

Μέθοδος Bradford

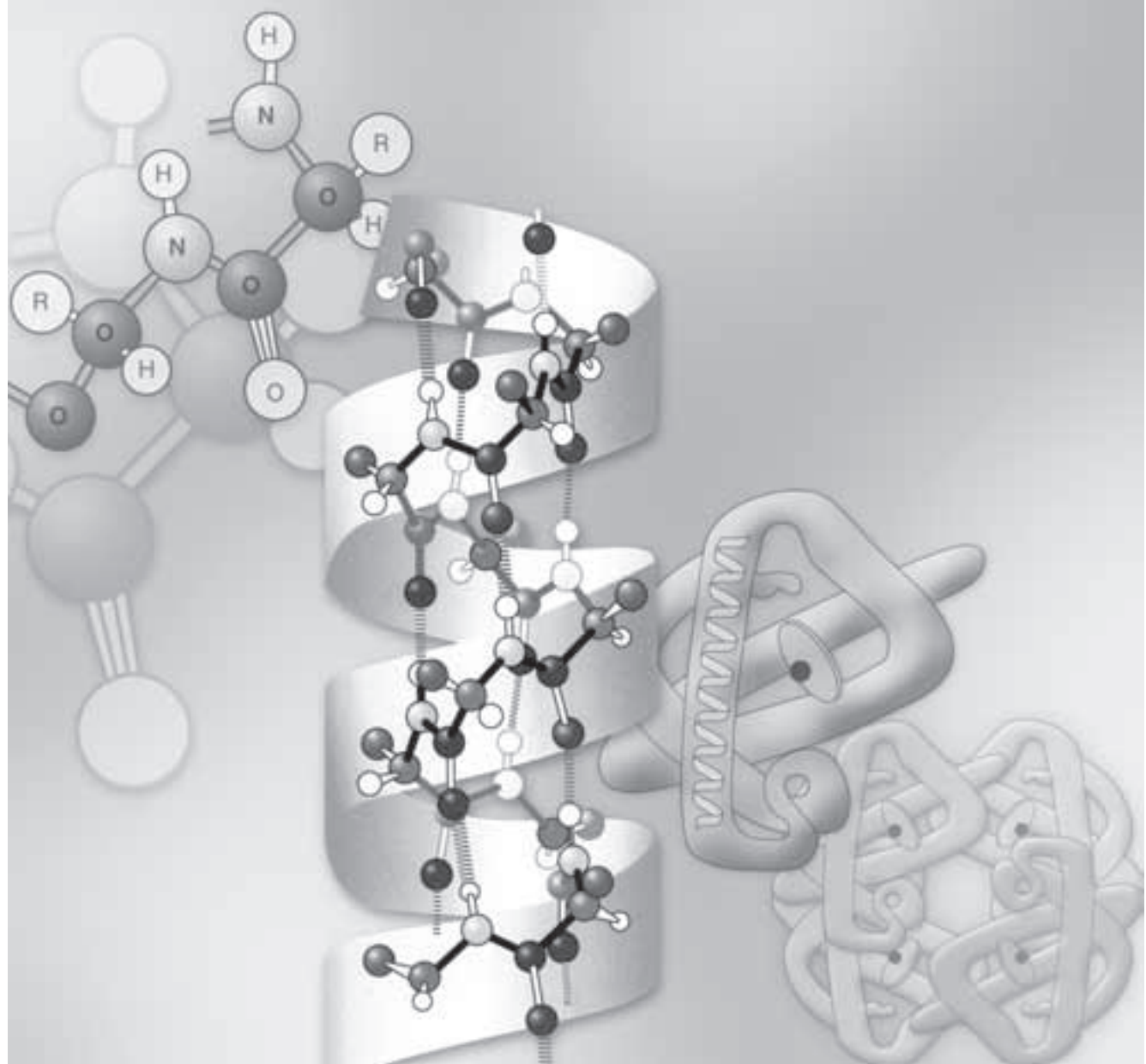
Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm. Η μέθοδος αυτή έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

- I. είναι απλή γιατί η μέτρηση γίνεται ύστερα από ανάμιξη του διαλύματος της πρωτεΐνης με ένα μόνο διάλυμα χρωστικής.
- II. είναι πολύ γρήγορη
- III. είναι πολύ ευαίσθητη γιατί επιτρέπει τον προσδιορισμό μέχρι και 5 μg πρωτεΐνης και
- IV. οι παράγοντες που την παρεμποδίζουν είναι πολύ λιγότεροι.

Από κάθε μίγμα μεταφέρονται ορισμένα ml (π.χ. 100 μl) ενζυμικού διαλύματος σε σωλήνα, συμπληρώνεται στα 2 ml με απεσταγμένο νερό και προστίθενται 2 ml αντιδραστήριου Bradford. Το τυφλό περιέχει 2 ml H₂O και 2 ml αντιδραστήριου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται και ύστερα από μερικά λεπτά μετριέται η απορρόφηση στα 595 nm. Τα δείγματα δεν πρέπει να μείνουν περισσότερο από 1 ώρα. Από την πρότυπη καμπύλη υπολογίζονται τα mg πρωτεΐνης του κάθε ενζυμικού παρασκευάσματος.

Παρασκευή του αντιδραστήριου Bradford: Διαλύονται 0,2 g Coomassie Brilliant Blue G250 σε 200 ml H₃PO₄ 85%. Αναδεύεται καλά για μία νύχτα και στη συνέχεια αραιώνεται με H₂O μέχρι 1 L. Διηθείται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

ΑΣΚΗΣΕΙΣ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

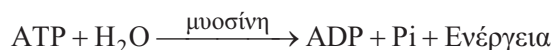




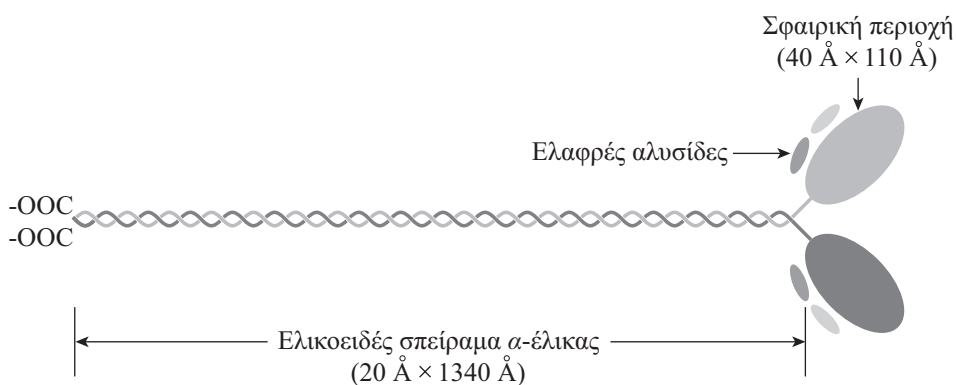
Πρωτεΐνες: Απομόνωση και Μελέτη Ιδιοτήτων Μυοσίνης

Σκοπός

Στην άσκηση αυτή θα μελετηθούν ορισμένες ιδιότητες της μυοσίνης, μιας πρωτεΐνης που αποτελεί μέρος του πρωτεϊνικού συστήματος συστολής των σκελετικών μυών. Η μυοσίνη εκτός από τις συσταλτές της ιδιότητες, παρουσιάζει και ενζυμική δράση, μια και υδρολύει τη γ-φωσφορική ομάδα του ATP κατά την αντίδραση:



Η μυοσίνη είναι μία πρωτεΐνη μεγάλης μοριακής μάζας (480 kDa) που αποτελείται από έξι πολυπεπτιδικές αλυσίδες: δύο όμοιες βαριές αλυσίδες (200 kDa) και τέσσερις ελαφριές αλυσίδες (20 kDa περίπου η κάθε μία).

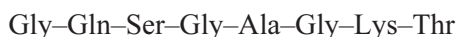


Σχηματική απεικόνιση μυοσίνης.

Ηλεκτρονιομικρογραφίες έχουν δείξει ότι το μόριο αποτελείται από μια σφαιρική περιοχή με διπλή κεφαλή η οποία συνδέεται με ένα πολύ μακρύ ραβδί. Το ραβδί είναι μία διπλή α-έλικα η οποία σχηματίζεται από τις βαριές αλυσίδες. Σε κάθε κεφαλή, δύο διαφορετικές ελαφριές αλυσίδες συνδέονται με

κάθε βαριά αλυσίδα. Η αλληλουχία των αμινοξέων για τις μυοσίνες πολλών ειδών είναι γνωστή είτε από μελέτες των ίδιων των πρωτεϊνών, είτε των αντίστοιχα κλωνοποιημένων γονιδίων. Οι μυοσίνες από τελείως διαφορετικά είδη οργανισμών, έχουν πολλά κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό, που είναι σημαντικό για τη λειτουργία του μορίου, είναι ο διαχωρισμός σε μια σφαιρική κεφαλή με το αμινο-τελικό άκρο και σε μια ουρά με το καρβοξυλικό άκρο των πεπτιδίων.

Όλες οι μυοσίνες εμπεριέχουν την αμινοξική αλληλουχία:



που είναι παρόμοια με τις αλληλουχίες που βρίσκονται στα ενεργά κέντρα άλλων ενζύμων που υδρολύουν ATP (ATPασών). Η λυσίνη σ' αυτήν τη διατηρημένη αλληλουχία συνδέεται με την α-φωσφορική ομάδα του ATP.

A. Παρασκευή μυοσίνης

Αρχή

Η μυοσίνη κατατάσσεται στις σφαιρίνες και είναι δυσδιάλυτη στο νερό και ευδιάλυτη σε αραιά διαλύματα ουδέτερων αλάτων. Έτσι η μυοσίνη εκχυλίζεται από σκελετικούς μυς με 0,5 M KCl, και καθιζάνει από το εκχύλισμα με προσθήκη μεγάλου όγκου ψυχρού αποσταγμένου νερού, διότι η ιονική ισχύς του διαλύματος γίνεται πια τόσο μικρή, ώστε η μυοσίνη να μη μπορεί να παραμείνει στο διάλυμα. Η διαδικασία αυτή της «εναλάτωσης» και καθίζησης της μυοσίνης είναι αμφίδρομη και μπορεί να επαναληφθεί αρκετές φορές ώστε να απομακρυνθούν από το διάλυμα άλλες ανεπιθύμητες πρωτεΐνες.

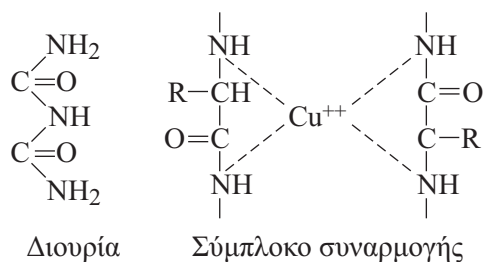
Εκτέλεση

Παίρνουμε καλοαλεσμένο κιμά από μυς μοσχαριού και εκχυλίζουμε τη μυοσίνη με 0,5 M KCl σε μια αναλογία 300 γρ. κιμά για κάθε ένα λίτρο αλατούχου διαλύματος. Το αιώρημα διηθείται μέσα από διπλή γάζα για να απομακρυνθούν δυσδιάλυτα κομμάτια ιστού και το διαυγές εκχύλισμα αραιώνεται έως οκτώ λίτρα με κρύο απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αφήνεται στο ψυκτικό θάλαμο έως την άλλη ημέρα. Η μυοσίνη που έχει πια κατακαθίσει, μαζεύεται με φυγοκέντρηση και αιωρείται σε αποσταγμένο νερό. Η μυοσίνη που παρασκευάζεται μ' αυτόν τον τρόπο είναι κατά 80-90% καθαρή.

B. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο της διουρίας

Αρχή

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



Να σημειωθεί ότι η διουρία δεν βρίσκεται στους ζωντανούς οργανισμούς, αλλά απλώς δίνει την ίδια αντίδραση όπως και ένα απλό πεπτίδιο. Τα φάσματα απορρόφησης των συμπλόκων διαφόρων πρωτεϊνών με χαλκό είναι παρόμοια, αλλά όχι και πανομοιότυπα. Έτσι μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την καζεΐνη του γάλακτος σαν πρότυπο για όλες τις συνηθισμένες πρωτεΐνες χωρίς να έχουμε σφάλμα μεγαλύτερο του 10% κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.

Εκτέλεση

Ετοιμάστε μια σειρά από 5 δοκιμαστικούς σωλήνες με αυξανόμενες ποσότητες διαλύματος καζεΐνης γάλακτος (2.5 mg/ml μέσα σε 4 mM NaOH) και 4 mM NaOH σύμφωνα με τον πίνακα 1.1.

Προσθέστε τελευταίο το αντιδραστήριο της διουρίας και ανακατέψτε καλά το περιεχόμενο των σωλήνων. Το χρώμα αναπτύσσεται στη μεγαλύτερη του ένταση μέσα σε 20 λεπτά και είναι σταθερό για 1 ώρα. Ο σωλήνας 1 είναι το τυφλό (δείγμα αναφοράς που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από πρωτεΐνη).

Τοποθετήστε στο φωτόμετρο μήκος κύματος 540 nm και μηδενίστε την κλίμακα της οπτικής πυκνότητας με το τυφλό στη θέση μετρήσεως. Προσδιορίστε την οπτική πυκνότητα του περιεχομένου των σωλήνων 2-5.

Πίνακας 1.1

Αριθμός σωλήνα	Καζεΐνη 2,5 mg/ml (ml)	4 mM NaOH (ml)	Αντιδραστήριο διουρίας (ml)
1 (τυφλό)	0,0	5,0	3,0
2	1,0	4,0	3,0
3	2,0	3,0	3,0
4	4,0	1,0	3,0
5	5,0	0,0	3,0

Κατασκευάστε πρότυπη καμπύλη από τις αναγνώσεις σας και από τη γνωστή περιεκτικότητα των σωλήνων σε πρωτεΐνη. Με βάση την καμπύλη αυτή θα μπορέσετε να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των διαλυμάτων της μυοσίνης.

Γ. Επίδραση της ιονικής ισχύος στη διαλυτότητα της μυοσίνης

Αρχή

Η διαλυτότητα όλων των ιονισμένων ενώσεων επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία άλλων ιόντων, μια και όλα τα ιόντα μέσα σ' ένα διάλυμα περιβάλλονται από μια «ιονική ατμόσφαιρα» με ιόντα αντίθετης φόρτισης.

Η διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης αναφέρεται συνήθως στο «ποσοστό κορεσμού» του πρωτεϊνικού διαλύματος από ένα ουδέτερο άλας όπως το θειικό αμμώνιο.

Στην πραγματικότητα δεν έχει τόση σημασία η συγκέντρωση του άλατος όσο η ιονική ισχύς (I) του διαλύματος που εκφράζεται με τον τύπο:

$$I = \frac{1}{2} \sum C Z^2$$

όπου C = μοριακή συγκέντρωση του ιόντος

Z = αριθμός φορτίων του ιόντος

Σ = το σύνολο των γινομένων CZ² για κάθε ιόν στο διάλυμα

Έτσι η ιονική ισχύς παίρνει υπόψη της όχι μόνο τη συγκέντρωση αλλά και το σθένος, με αποτέλεσμα η επίδραση της ιονικής ατμόσφαιρας δισθενών και τρισθενών ιόντων σε άλλα ιόντα, να είναι ανάλογη του τετραγώνου του αριθμού των φορτίων.

Η διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης μεγαλώνει παρουσία χαμηλών σχετικά συγκεντρώσεων ουδέτερων αλάτων (εναλάτωση), ενώ παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων των ίδιων αλάτων οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται σαν ιζήματα (εξαλάτωση). Οι αλβουμίνες είναι διαλυτές τόσο σε αποσταγμένο νερό όσο και σε αλατούχα διαλύματα χαμηλής ιονικής ισχύος. Κατακρημνίζονται όμως σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ουδέτερων αλάτων. Οι σφαιρίνες, πάλι, είναι δυσδιάλυτες σε καθαρά αποσταγμένο νερό, διαλύονται σε αραιά αλατούχα διαλύματα και κατακρημνίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων.

Στο πείραμα που ακολουθεί, η μυοσίνη αιωρείται σε διαλύματα θεικού αμμωνίου αυξανόμενης συγκέντρωσης. Μετά την ανάμιξη και εξισορρόπηση των μιγμάτων παίρνουμε με φυγοκέντρηση τη μυοσίνη που έμεινε αδιάλυτη και την προσδιορίζουμε με τη μέθοδο της διουρίας, αφού πρώτα τη διαλύσουμε σε 0,5 M KCl.

Εκτέλεση

Ετοιμάστε και αριθμήστε μια σειρά σωλήνων φυγόκεντρου, όπως στον πίνακα 1.2. Προσθέστε 3,0 ml αιωρήματος μυοσίνης (~12 mg/ml), που το έχετε

Πίνακας 1.2

Αριθμός σωλήνα	50% Θεικό αμμώνιο (ml)	Αποσταγμένο νερό (ml)
1	0,0	2,5
2	0,2	2,3
3	0,5	2,0
4	2,0	0,5
5	2,5	0,0

αναμίζει καλά μέσα σε κάθε σωλήνα. Αναμίξτε **ήπια** το περιεχόμενο των σωλήνων, αφήστε τους να παραμείνουν ήρεμοι για 1-2 λεπτά και φυγοκεντρήστε τους για 10 λεπτά. Ισοζυγίστε τον σωλήνα 3 με άλλον που περιέχει νερό και φυγοκεντρήστε τους τον έναν απέναντι στον άλλο. Αποχύστε τα υπερκείμενα υγρά και προσθέστε 3,0 ml 0.5 M KCl σε κάθε σωλήνα. Αναμίξτε **ήπια** το περιεχόμενο των σωλήνων έως ότου τα ιζήματα διαλυθούν επαρκώς. Ετοιμάστε μια άλλη σειρά δοκιμαστικών σωλήνων όπως στον πίνακα 1.3.

Πίνακας 1.3

Αριθμός σωλήνα	Διάλυμα από αντίστοιχο σωλήνα του πίνακα 1.2 (ml)	0,5 M KCl (ml)	Αντιδραστήριο διουρίας (ml)
1	2,0	3,0	3,0
2	2,0	3,0	3,0
3	2,0	3,0	3,0
4	2,0	3,0	3,0
5	2,0	3,0	3,0
6 (τυφλό)	0,0	5,0	3,0

Προσθέστε το αντιδραστήριο διουρίας τελευταίο και αναμιξτε. Μετά από 10 λεπτά τουλάχιστον, προσδιορίστε την οπτική πυκνότητα του περιεχομένου των σωλήνων 1-5 στα 540 nm, μηδενίζοντας το φωτόμετρο με το σωλήνα 6 (τυφλό).

Προσδιορίστε το ποσό της μυοσίνης που δεν διαλύθηκε στις διάφορες ιονικές συγκεντρώσεις, με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης. Ονομάστε τις τιμές αυτές Α. Επειδή η μυοσίνη είναι τελείως αδιάλυτη στο νερό, το ποσό της μυοσίνης στο σωλήνα 1 θα ισούται με το ποσό της μυοσίνης που προστέθηκε σε όλους τους σωλήνες. Ονομάστε την τιμή αυτή Β. Είναι φανερό ότι το ποσό της μυοσίνης που διαλυτοποιήθηκε σε κάθε σωλήνα είναι ίσο με Β-Α. Σε χιλιοστομετρικό χαρτί βάλτε στην τεταγμένη τις τιμές Β-Α και στην τετμημένη τις αντίστοιχες τιμές της ιονικής ισχύος. Υπολογίστε την ιονική ισχύ όπως μάθατε νωρίτερα στην άσκηση. Σας θυμίζουμε ότι 1 ml 50% διαλύματος θειικού αμμωνίου περιέχει 0,5 γρ. θειικό αμμώνιο.

Δ. Επίδραση του pH στη διαλυτότητα της μυοσίνης

Αρχή

Η τιμή εκείνη του pH που το μόριο μιας πρωτεΐνης δε θα μετακινηθεί προς την άνοδο ή την κάθοδο, όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο καλείται ισοηλεκτρικό σημείο. Το ισοηλεκτρικό σημείο όμως δεν εξαρτάται αποκλειστικά και μόνο από την κατάσταση του ίδιου του πρωτεϊνικού μορίου. Αντίθετα, εξαρτάται,

μέχρις ενός σημείου τουλάχιστον, και από τη φύση άλλων ιόντων μέσα στο διάλυμα. Σύμφωνα με τις αποδεκτές απόψεις για τους ηλεκτρολύτες, κάθε ιόν σε διάλυμα περιβάλλεται από μια ατμόσφαιρα ιόντων καθώς και από μόρια νερού που συμπεριφέρονται σαν διπολικά ιόντα. Έτσι πολλά θετικά και αρνητικά φορτία των πρωτεϊνικών μορίων έλκουν κατά κάποιο τρόπο, άλλα ιόντα, αντίθετης όμως φόρτισης και μ' αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μια «ιονική ατμόσφαιρα» που έχει ως αποτέλεσμα μερική εξουδετέρωση ή κάλυψη των φορτίων της πρωτεΐνης. Σε κάποιο φορτισμένο σημείο της πρωτεϊνικής επιφάνειας μπορεί για διάφορους λόγους να δεσμευτεί ισχυρά ένα ξένο ιόν. Μολονότι μια τέτοια δέσμευση είναι απόλυτα αμφίδρομη, εντούτοις όμως μπορεί να μεταβάλει τόσο την κατανομή των φορτίων όσο και το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης. Για τους λόγους αυτούς το ισοηλεκτρικό σημείο μιας πρωτεΐνης, όπου παρατηρείται η λεγόμενη **ισοηλεκτρική καταβύθιση**, θα διαφέρει κάπως, ανάλογα με τη φύση των υπόλοιπων ιόντων του διαλύματος. Για τις περισσότερες πρωτεΐνες η διαφορά στο ισοηλεκτρικό σημείο δεν θα είναι σημαντική, ενώ για άλλες, το ισοηλεκτρικό σημείο θα μεταβληθεί σημαντικά ανάλογα με την ιονική σύσταση του διαλύματος.

Εκτέλεση

Στο πείραμα που ακολουθεί, η μυοσίνη είναι διαλυμένη σε KCl 0,5 M. Ετοιμάστε μια σειρά από σωλήνες φυγόκεντρο όπως δείχνει ο πίνακας 1.4. Προσθέστε τα αντιδραστήρια με τη σειρά που γράφονται στον πίνακα, από τα αριστερά προς τα δεξιά.

Πίνακας 1.4

Αριθμός σωλήνα	1,0 M οξικό οξύ (ml)	1,0 M οξικό νάτριο (ml)	Αποσταγμένο H ₂ O (ml)	Διάλυμα KCl-μυοσίνη (ml)	pH
1	2,0	0,0	2,0	2,0	2,8
2	1,7	0,3	2,0	2,0	3,9
3	0,6	1,4	2,0	2,0	4,9
4	0,1	1,9	2,0	2,0	6,0
5	0,0	2,0	2,0	2,0	7,3

Προσθέστε τη μυοσίνη τελευταία. Ανακατέψτε το περιεχόμενο των σωλήνων και αφήστε τους να σταθούν για 2 λεπτά τουλάχιστον. Φυγόκεντρήστε

τους σωλήνες για 10 λεπτά. Αφαιρέστε 2,0 ml από το υπερκείμενο κάθε σωλήνα και μεταφέρετέ τα σε αντίστοιχους αριθμημένους δοκιμαστικούς σωλήνες όπως στον πίνακα 1.5.

Πίνακας 1.5

Αριθμός σωλήνα	Περιεχόμενο αντίστοιχου σωλήνα 1.4 (ml)	Διάλυμα KCl-μυοσίνη (ml)	0,5 M KCl (ml)	Αντιδραστήριο διουρίας (ml)
1	2,0	0,0	3,0	3,0
2	2,0	0,0	3,0	3,0
3	2,0	0,0	3,0	3,0
4	2,0	0,0	3,0	3,0
5	2,0	0,0	3,0	3,0
6 (τυφλό)	0,0	0,0	5,0	3,0
7	0,0	2,0	3,0	3,0

Προσθέστε τελευταίο το αντιδραστήριο διουρίας. Μετά από 10 λεπτά προσδιορίστε την οπτική πυκνότητα του περιεχομένου των σωλήνων στα 540 nm, μηδενίζοντας το φωτόμετρο με το περιεχόμενο του σωλήνα 6 (τυφλό). Από την πρότυπη καμπύλη προσδιορίστε το ποσό της πρωτεΐνης σε κάθε πειραματικό σωλήνα. Το ποσό της πρωτεΐνης στο σωλήνα 7 είναι ίσο με το ολικό ποσό της πρωτεΐνης που βάλατε σε κάθε πειραματικό σωλήνα. Από τα αποτελέσματα σας προσδιορίστε το ποσό της πρωτεΐνης που καθιζάνει στους πειραματικούς σωλήνες. Κατασκευάστε καμπύλη σε χιλιοστομετρικό χαρτί βάζοντας στην τεταγμένη τα ποσά της πρωτεΐνης και στην τετμημένη τις αντίστοιχες τιμές του pH.

Ε. Επίδραση της μετουσίωσης της μυοσίνης στη διαλυτότητα, στις ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες και στην ενζυμική της δράση

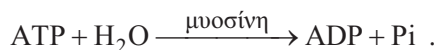
Αρχή

Η μετουσίωση των σφαιρικών πρωτεϊνών με θερμότητα, ουρία, ακραίες τιμές του pH κλπ., έχει ως αποτέλεσμα μεγάλες αλλαγές στις ιδιότητες τους.

Μεταξύ των άλλων, το «ξεδίπλωμα» που παθαίνουν τα πρωτεϊνικά μόρια κατά τη μετουσίωση, προκαλεί ελάττωση της διαλυτότητας του μορίου και εμφάνιση ορισμένων ομάδων, όπως σουλφυδρυλομάδων, που αλλιώς δε θα ήταν προσιτές σε χημικά αντιδραστήρια. Το πιο βασικό όμως κριτήριο για τη μετουσίωση μιας πρωτεΐνης είναι η απώλεια της βιολογικής της δράσης.

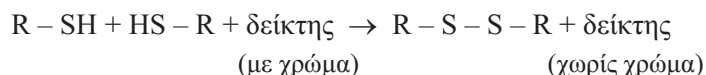
Στο πείραμα που θα κάνουμε τώρα θα μελετηθούν οι επιπτώσεις της μετουσίωσης της μυοσίνης 1) στη διαλυτότητα, 2) στη βιολογική δράση και 3) στην εμφάνιση σουλφυδρυλομάδων που πριν τη μετουσίωση δεν ήταν προσιτές σε χημικά αντιδραστήρια. Οι επιπτώσεις στην πρώτη ιδιότητα θα διαπιστωθούν με απ'ευθείας παρατήρηση διαλύματος μυοσίνης που έχει θερμοανθεί.

Η βιολογική δράση της μυοσίνης θα ελεγχθεί προσδιορίζοντας την απελευθέρωση ορθοφωσφορικών από το ATP παρουσία μυοσίνης, σύμφωνα με την εξίσωση



Το ποσό των φωσφορικών που απελευθερώνεται είναι ανάλογο της βιολογικής δράσης της μυοσίνης. Όπως είναι γνωστό, τα ανόργανα φωσφορικά αντιδρούν με μολυβδενικά ιόντα σε όξινο περιβάλλον και δημιουργούν φωσφομολυβδενικό σύμπλοκο. Παρουσία κάποιου αναγωγικού παράγοντα π.χ. αμινοναφθολσουφονικού οξέος (ANSA), το σύμπλοκο αυτό ανάγεται σε ένα μπλε παράγωγο που η ένταση του σε διάλυμα είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του φωσφομολυβδενικού συμπλόκου και ως εκ τούτου ανάλογη προς το ποσό των ανόργανων φωσφορικών.

Η ανίχνευση ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων στηρίζεται στην ιδιότητα τους να ανάγουν έναν οξειδοαναγωγικό δείκτη σύμφωνα με την αντίδραση:



Ο δείκτης που θα χρησιμοποιηθεί στην άσκηση είναι 2,6 διχλωροφαινόλ-ινδοφαινόλη που έχει έντονο μπλε χρώμα στην οξειδωμένη μορφή και γίνεται άχρωμος όταν αναχθεί.

Εκτέλεση

Ετοιμάστε μια σειρά από δοκιμαστικούς σωλήνες όπως στον πίνακα 1.6.

Αφήστε τους σωλήνες 1, 2 και 5 σε θερμοκρασία δωματίου. Τοποθετήστε τους σωλήνες 3 και 4 σε βραστό νερό για 4 λεπτά και μετά ψύξτε τους κάτω

από τη βρύση. Φυλάξτε τους σωλήνες 4, 5 και 6 για το πείραμα που ακολουθεί. Συγκρίνετε την ένταση του χρώματος του δείκτη στους σωλήνες 1, 2 και 3. Καταγράψτε τις παρατηρήσεις σας. Ετοιμάστε 4 σωλήνες φυγόκεντρου όπως δείχνει ο πίνακας 1.7.

Πίνακας 1.6

Αριθμός σωλήνα	Προσδιορισμός –SH			Προσδιορισμός ATP-άσης		
	1	2	3	4	5	6
	ml	ml	ml	ml	ml	ml
KCl-μυοσίνη	0,0	1,0	1,0	2,0	2,0	1,0
2,6 διχλωροφαινόλ- ινδοφαινόλη	0,2	0,2	0,2	0,0	0,0	–
Αποσταγμένο νερό	4,8	3,8	3,8	4,0	4,0	–
8M ουρία	–	–	–	–	–	1,0

Πίνακας 1.7

Περιεχόμενο σωλήνων	Αριθμός σωλήνα			
	1	2	3	4
	ml	ml	ml	ml
Ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M Tris-HCl pH 8.0	0,5	0,5	0,5	0,5
0,1 M CaCl ₂	0,2	0,2	0,2	0,2
Αποσταγμένο νερό	0,5	0,5	0,5	1,0
0,01 M ATP	0,3	0,3	0,3	0,3
Μυοσίνη που θερμάνθηκε (σωλήνας 4 του πίνακα 1.6)	–	0,5	–	–
Μυοσίνη (σωλήνας 5 του πίνακα 1.6)	0,5	–	–	–
Μυοσίνη με ουρία (σωλήνας 6 του πίνακα 1.6)	–	–	0,5	–

Βάλτε σε όλους τους σωλήνες πρώτα το ρυθμιστικό διάλυμα, μετά το χλωριούχο ασβέστιο και στη συνέχεια το αποσταγμένο νερό και το ATP. Στη συνέ-

χεια μεταφέρετε από 0,5 ml των διαλυμάτων μυοσίνης του πίνακα 1.6 όπως αναφέρεται στον πίνακα 1.7. Μετά από παραμονή 15 λεπτών ακριβώς σε υδατόλουτρο 37°C, προσθέστε σε κάθε σωλήνα 0,2 ml 50% τριχλωροξικό οξύ (TCA). Φυγοκεντρήστε τους σωλήνες για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα και ετοιμάστε μια νέα σειρά από δοκιμαστικούς σωλήνες όπως δείχνει ο πίνακας 1.8.

Πίνακας 1.8

Αριθμός σωλήνα	Όξινο μολυβ/κό (ml)	H ₂ O (ml)	Υπερκείμενο (ml)	Πρότυπο φωσφορικών 1 μmol/ml (ml)	ANSA (ml)
1	1,2	7,8	0,5	–	0,5
2	1,2	7,8	0,5	–	0,5
3	1,2	7,8	0,5	–	0,5
4	1,2	7,8	0,5	–	0,5
5 (τυφλό)	1,2	8,3	–	–	0,5
6	1,2	7,8	–	0,5	0,5
7	1,2	7,5	–	0,8	0,5
8	1,2	7,3	–	1,0	0,5
9	1,2	6,8	–	1,5	0,5

Προσθέστε πρώτα το διάλυμα H₂SO₄-μολυβδενικό και το νερό σε όλους τους σωλήνες. Στη συνέχεια μεταφέρετε από 0,5 ml στους σωλήνες 1 – 4 του πίνακα 1.8, από τους αντίστοιχους του πίνακα 1.7. Οι σωλήνες 6 – 9 του πίνακα 1.8 θα σας δώσουν τα στοιχεία να κατασκευάσετε την πρότυπη καμπύλη των φωσφορικών. Τελευταίο προσθέστε το διάλυμα του αμινοναφθολσουλφονικού οξέος (ANSA) Μετά από 30 λεπτά προσδιορίστε την οπτική πυκνότητα των διαλυμάτων στα 660 nm. Μηδενίστε το φωτόμετρο με το σωλήνα 5. Κατασκευάστε την πρότυπη καμπύλη των φωσφορικών και από αυτήν προσδιορίστε το ποσό των φωσφορικών που απελευθερώθηκαν στους σωλήνες 1 – 4 του πειράματος του πίνακα 1.7.