



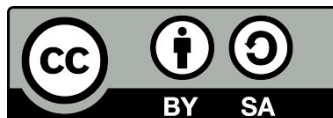
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΑΝΟΙΚΤΑ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ
ΜΑΘΗΜΑΤΑ**



Εργαστήριο Βιοχημείας

**Καθαρισμός όξινης φωσφατάσης
από σπερμάτα σίτου**

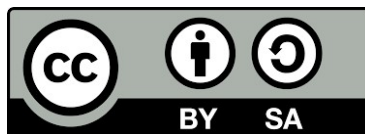
**Διδάσκοντες: Αναπλ. Καθ. Α. Ε.
Κούκκου, Καθ. Μ. Ε. Λέκκα, Αναπλ. Καθ.
Ε. Πάνου, Καθ. Ε. Παπαμιχαήλ, Καθ. Α.
Τσελέπης, Καθ. Δ. Τσουκάτος**



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



ΑΣΚΗΣΗ 6 και 7

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΟΞΙΝΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ ΑΠΟ ΣΠΕΡΜΑΤΑ ΣΙΤΟΥ

1. Γενικό μέρος: Μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού ενζύμων
2. Πειραματικό μέρος
 - A. Απομόνωση όξινης φωσφατάσης από σπέρματα σίτου (Άσκηση 6).
 - B. Προσδιορισμός δραστικότητας του ενζύμου (Άσκηση 7).
 - Γ. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο της διουρίας (Άσκηση 7).
3. Βιβλιογραφία

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΕΝΖΥΜΩΝ

Κλασματική καθίζηση με άλατα

Κλασματική καθίζηση με οργανικούς διαλύτες

Κλασματική προσρόφηση

Χρωματογραφία στήλης

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΘΞΙΝΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ ΑΠΟ ΣΠΕΡΜΑΤΑ ΣΙΤΟΥ

Εισαγωγή

Διαδικασία καθαρισμού

α. Εκχύλιση του ενζύμου

β. Κλασματική καταβύθιση με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και θερμική κλασμάτωση

γ. Συμπύκνωση του ενζύμου με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

δ. Καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (Sephadex G-100).

B. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ

Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΔΙΟΥΡΙΑΣ

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΕΝΖΥΜΩΝ

Επειδή τα ένζυμα μέσα στα κύτταρα βρίσκονται σε σύμπλοκη κατάσταση με άλλα ένζυμα ή ανενεργές πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, πολυσακχαρίτες ή λιποειδή, θα πρέπει για να μελετηθούν προηγουμένως να υποστούν ένα κατάλληλο καθαρισμό.

Όταν μιλάμε για καθαρισμό ενζύμων δίνουμε ιδιαίτερη σημασία στην αρχική πηγή από την οποία πρόκειται να απομονώσουμε το ένζυμο. Η μέθοδος αρχικής απομόνωσης από τη πηγή αυτή (π.χ. μια φυγοκέντρωση) δίνει συνήθως ένα υπολογίσιμο βαθμό καθαρισμού. Παράγοντες με ιδιαίτερη σημασία σε ένα τέτοιο διαχωρισμό είναι το pH του διαλύματος και η συνολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης, που όταν είναι σχετικά μικρή διευκολύνει το διαχωρισμό, αλλά προκαλεί μηχανικές δυσχέρειες και παράλληλα αυξάνει τον κίνδυνο της μετουσίωσης. Κατάλληλη συγκέντρωση θεωρείται η συγκέντρωση της

τάξης του 1%.

Μερικές από τις μάλλον ειδικές μεθόδους καταβύθισης των ανεπιθύμητων πρωτεϊνών, στα πρώτα κυρίως στάδια του καθαρισμού, είναι οι ακόλουθες:

α) Προσθήκη ιόντων βαρέων μετάλλων ή ανιονικών συμπλόκων, που μεταβάλλουν το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών αλλάζοντας το φορτίο τους.

β) Προσθήκη αρνητικών ιόντων μεγάλου μοριακού βάρους (τριχλωροξικό, φωσφοβολφραμικό, σουλφοσαλικυλικό οξύ), που αντιδρούν ισχυρά με τις πρωτεΐνες και προκαλούν αύξηση της οξύτητας και περιορισμό της διαλυτότητας τους.

γ) Προσθήκη πολυηλεκτρολυτών, ήπιων σχετικά αντιδραστηρίων για την καταβύθιση πρωτεϊνών, που αλλάζουν το ισοηλεκτρικό σημείο τους σχηματίζοντας μαζί τους αλατοειδείς δεσμούς.

δ) Προσθήκη απορρυπαντικών, με περιορισμένη όμως εφαρμογή στον καθαρισμό ενζύμων. Η δράση τους χαρακτηρίζεται από ισχυρή σύνδεση με το λιπόφιλο τμήμα της πρωτεΐνης, μοιάζει δηλαδή με όξινη μετουσίωση.

ε) Κλασματική μετουσίωση με θέρμανση, που εφαρμόζεται στην περίπτωση σχετικά σταθερού ενζύμου. Στηρίζεται στη θέρμανση του διαλύματος για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία μικρότερη από τη θερμοκρασία καταστροφής του ενζύμου, που μας ενδιαφέρει. Με τον τρόπο αυτό καταστρέφεται μεγάλος αριθμός άλλων πρωτεϊνών, που απομακρύνονται με φυγοκέντρηση.

Οι πιο συνηθισμένες όμως τεχνικές είναι η κλασματική καθίζηση με μεταβολή του pH ή της ιοντικής ισχύος, με προσθήκη διαλύτη, με κλασματική προσρόφηση ή με χρωματογραφία στήλης.

Κλασματική καθίζηση με άλατα

Η παρουσία μικρής συγκέντρωσης ιόντων αυξάνει τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών καθώς τα αντισταθμιστικά ιόντα τοποθετούνται ανάμεσα στα μόρια των πρωτεϊνών και παρεμποδίζουν έτσι τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση, αντιδρώντας και τα ίδια με τις πρωτεΐνες (Salting-in). Αντίθετα σε μεγάλες συγκεντρώσεις τα ιόντα ελαττώνουν τη διαλυτότητα με εξαλάτωση (salting-out) που ποσοτικά εκφράζεται από τη σχέση:

$$\log S = b' - k'_s \cdot \Gamma/2 \text{ όπου:}$$

S είναι η διαλυτότητα της πρωτεΐνης, $\Gamma/2$ είναι η ιοντική ισχύ του διαλύματος ($\Gamma/2 = 1/2 \sum (m \cdot z^2)$), m και z, η γραμμομοριακότητα και το σθένος του κάθε ιόντος, K_s είναι σταθερά εξαρτώμενη από τη φύση του άλατος (σταθερά εξαλάτωσης) και b' σταθερά εξαρτώμενη από το pH και τη θερμοκρασία του διαλύματος.

Έχει βρεθεί ότι η δύναμη εξαλάτωσης αυξάνεται με τη σειρά Li^+ , K^+ , Na^+ , ενώ από τα

ανιόντα σε όξινο διάλυμα αυξάνεται με τη σειρά κιτρικά, οξικά, σε ουδέτερο διάλυμα με τη σειρά P_2O_7 , B_4O_7 , PO_4 , CNS , HCO_3 , Cl .

Καταλληλότερο απ' όλα τα άλατα για κλασμάτωση έχει αποδειχθεί το θειϊκό αμμώνιο και αυτό οφείλεται αφενός μεν στην μεγάλη του διαλυτότητα στο νερό, αφετέρου δε στο ότι σαν άλας ισχυρού δισθενούς οξέος με ασθενή βάση δημιουργεί μεγάλη ιοντική ισχύ και έχει μερικώς όξινο χαρακτήρα. Το θειϊκό αμμώνιο μπορεί να προστεθεί στο διάλυμα των πρωτεϊνών, που πρόκειται να διαχωριστούν, με τρεις διαφορετικούς τρόπους: α) σαν στερεό. Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί στο ότι διατηρεί μικρό τον όγκο του διαλύματος. β) Με τη μορφή κεκορεσμένου διαλύματος, και γ) με διαπίδυση μέσα από ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης. Η τρίτη μέθοδος είναι η πιο αποτελεσματική. Συνήθως στη μεμβράνη τοποθετείται το διάλυμα των πρωτεϊνών και αυξάνεται βαθμιαία η συγκέντρωση του $(NH_4)_2SO_4$ στο εξωτερικό διάλυμα.

Επειδή, στην περίπτωση καθίζησης με $(NH_4)_2SO_4$ ακόμη και τα καθαρά παρασκευάσματα εμφανίζονται ελαφρώς όξινα, στη διάρκεια μιας τέτοιας κατεργασίας δίνεται μεγάλη σημασία στον έλεγχο του pH. Μια προκαταρκτική άλλωστε ρύθμιση του pH μπορεί να απομακρύνει από το διάλυμα τις ανεπιθύμητες νουκλεοπρωτεΐνες και άλλα ανάλογα συστατικά.

Κλασματική καθίζηση με Οργανικούς διαλύτες

Η καταβύθιση των πρωτεϊνών με προσθήκη οργανικών διαλυτών σε υδατικά διαλύματα τους, οφείλεται στη μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου, που προκαλεί έτσι αύξηση των ελκτικών δυνάμεων ανάμεσα στα μόρια των πρωτεϊνών και επομένως ελάττωση της διαλυτότητας τους. Παράλληλα όμως ο οργανισμός διαλύτης δρα και απευθείας σαν διαλύτης και όταν είναι διαλυτός στο νερό, το υποκαθιστά γύρω από τις πρωτεΐνες προκαλώντας τους έτσι αφυδάτωση. Επειδή οι οργανικοί διαλύτες έχουν την τάση να μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες, χρησιμοποιούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες, που έχουν παράλληλα το πλεονέκτημα να ελαττώνουν ακόμα περισσότερο τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Διαλύτες που αυξάνουν τη διηλεκτρική σταθερά (διμεθυλοφορμαμίδιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο), αυξάνουν τη διαλυτότητα και δρουν προστατευτικά ενάντια στην οριστική μετουσίωση.

Οι οργανικοί διαλύτες που κυρίως χρησιμοποιούνται για την καθίζηση των πρωτεϊνών είναι: η αιθανόλη, η μεθανόλη, η ακετόνη, ο αιθέρας, η διοξάνη και το τετραϋδροφουράνιο.

Κλασματική προσρόφηση

Η κλασματική προσρόφηση μπορεί να εφαρμοστεί με δύο διαφορετικούς τρόπους. α) Αν το ένζυμο που μας ενδιαφέρει, μπορεί να προσροφηθεί στο προσροφητικό μέσο που χρησιμοποιούμε, τότε είναι αυτό που απομακρύνεται από το διάλυμα για να ανακτηθεί στη συνέχεια με εκχύλιση ή έκλυση (θετική προσρόφηση). Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται η ελάχιστη δυνατή ποσότητα προσροφητού που να μπορεί όμως να δεσμεύει το 80% του ενζύμου. β) Αν το ένζυμο δεν προσροφάται, τότε απομακρύνονται με προσρόφηση άλλα συστατικά του διαλύματος (αρνητική προσρόφηση). Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιείται η μέγιστη δυνατή ποσότητα προσροφητού. Για τις προσροφήσεις αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως πηκτή φωσφορικού ασβεστίου και πηκτή αλουμίνιας, συνήθως σε ελαφρά όξινο pH (5-6), χαμηλή συγκέντρωση ηλεκτρολύτη στο διάλυμα και χαμηλή θερμοκρασία. Το διαχωρισμό επηρεάζουν ακόμα η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα και ο λόγος πηκτή/ένζυμο.

Για την έκλυση των προσροφημένων ενζύμων χρησιμοποιούνται $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, πυροφωσφορικό οξύ, φωσφορικό οξύ, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ρυθμιστικά διαλύματα βορικών (pH = 8,5 - 10,2), όξινο ανθρακικό νάτριο, 80% γλυκερίνη. Η μέθοδος παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα της ταχύτητας (αρκούν 10-15min επαφής με τον προσροφητή) και της απομόνωσης του ενζύμου σε ένα ή δύο μόνο κλάσματα.

Χρωματογραφία στήλης

Ο καθαρισμός ενζύμων με χρωματογραφία στήλης στηρίζεται ανάλογα με την περίπτωση σε φαινόμενα είτε προσρόφησης ιοντανταλλαγής είτε κατανομής είτε, τέλος σε μια διαδικασία μοριακής διήθησης.

1. Στην περίπτωση της προσρόφησης χρησιμοποιούνται ειδικές μορφές φωσφορικού ασβεστίου και συγκεκριμένα μίγματα φωσφορικού ασβεστίου με Super-Cel ή κυτταρίνη ή φωσφορικό ασβέστιο, που με κατάλληλη κατεργασία έχει μετατραπεί σε μικροκρυσταλλικό υδροξυαπατίτη και δεν χρειάζεται έτσι ανάμειξη με άλλο κοκκώδες υλικό πριν να τοποθετηθεί στη στήλη.

2. Στην περίπτωση της ιοντανταλλαγής χρησιμοποιείται σειρά ασθενών ιοντανταλλακτικών ρητινών, όπως η Amberlite IRC-50 και ορισμένα παράγωγά της κυτταρίνης και συγκεκριμένα η διαιθυλαμινοαιθυλο-κυτταρίνη (DEAE-Cellulose) και η καρβοξυμεθυλο-κυτταρίνη.

3. Η χρωματογραφία κατανομής των πρωτεϊνών στηρίζεται στην ιδιότητα μερικών γλυκολιθέρων να σχηματίζουν διφασικά συστήματα κατάλληλα για το διαχωρισμό

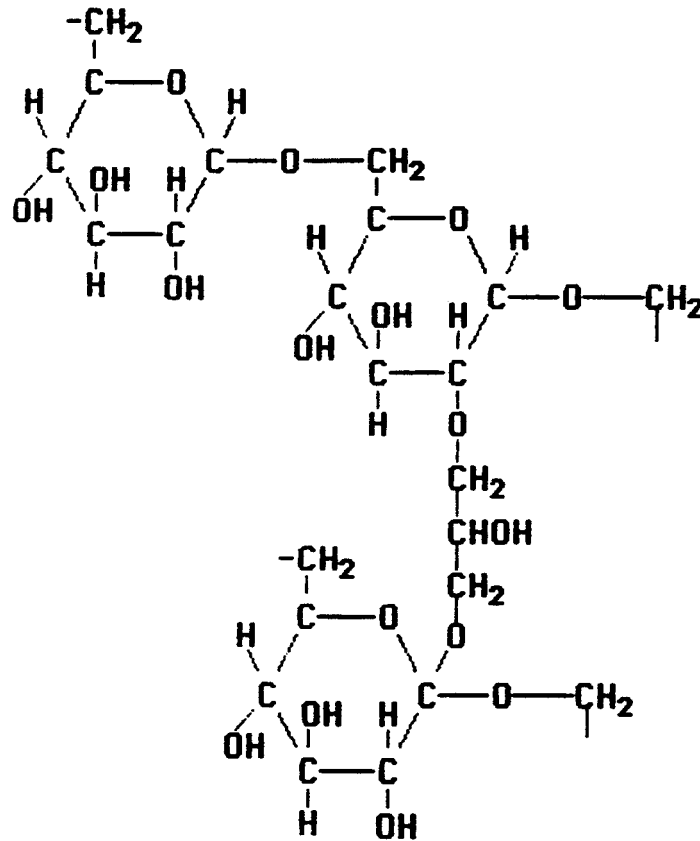
πρωτεϊνών με υδατικά διαλύματα αλάτων (K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$ κλπ), που διαλύονται μεν στο H_2O όχι όμως και στον οργανικό διαλύτη. Οι οργανικές φάσεις των συστημάτων αυτών συγκρατούνται από ένα κατάλληλο προσροφητικό υλικό (Hyflo Super Cel, Celite 545, συνθετικό πυριτικό ασβέστιο κλπ.) και αποτελούν συνήθως τη στατική φάση του συστήματος.

4. Μοριακή διήθηση

Η τεχνική του καθαρισμού ενζύμων με μοριακή διήθηση βασίζεται στην χρησιμοποίηση υλικών που διογκώνονται στο νερό και σχηματίζουν πηκτές με πόρους διαφόρων μεγεθών. Όταν χρησιμοποιηθεί ένα τέτοιο υλικό στη χρωματογραφική στήλη, μόρια που λόγω μεγέθους δεν μπορούν να εισχωρήσουν στους πόρους των σωματιδίων της πηκτής κυκλοφορούν μόνο στην «κινούμενη» φάση της στήλης και εκλύονται πρώτα. Τα μικρότερα μόρια όμως μπορούν να εισχωρήσουν στους πόρους των σωματιδίων της πηκτής, (κυκλοφορούν δηλαδή και στη «στατική» και στην «κινούμενη» φάση της στήλης), οπότε συγκρατούνται λιγότερο ή περισσότερο με το μέγεθος και το σχήμα τους, με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η κίνηση τους προς τα κάτω και να εκλούνται τόσο αργότερα, όσο μικρότερο είναι το μοριακό τους βάρος.

Για τον καθαρισμό ενζύμων με μοριακή διήθηση χρησιμοποιούνται στήλες κυρίως από Sephadex διαφόρων τύπων (G-10... G-200), αλλά και στήλες πηκτής πολυακρυλαμιδίου (Bio-Gel P-2... P-300), άγαρ, αγαρόζης (sagavac, sepharose, Bio-Gel A Gelarose), πορώδους γυαλιού (Bio-Glas) κλπ.

Το Sephadex είναι πολυσακχαρίτης που προέρχεται από επίδραση σε αλκαλικό περιβάλλον επιχλωρυδρίνης σε πολυμερές της γλυκόζης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία γεφυρών γλυκερίνης, ενωμένων με τα πολυμερή με αιθερικούς δεσμούς.



Επειδή περιέχει υδροξυλομάδες είναι ισχυρά υδρόφιλο και σχηματίζει εύκολα πηκτή, αδιάλυτη στο νερό και σε διαλύματα αλάτων και είναι σταθερή απέναντι σε βάσεις και ασθενή οξέα. Σημαντικό είναι ακόμα το ότι είναι ουδέτερη (δεν περιέχει καρβοξυλομάδες) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό ανιονικών, κατιονικών ή μη ιονικών ουσιών.

Κάθε ουσία, που περνά από τη στήλη Sephadex, κατανέμεται ανάμεσα στη «στατική» (νερό που συγκρατείται στους πόρους της πηκτής με όγκο V_i) και την «κινούμενη» φάση (νερό έξω από την πηκτή, με όγκο V_0) της στήλης, σύμφωνα με ένα συντελεστή κατανομής K_d που είναι συνάρτηση του μοριακού βάρους της ουσίας. Αν V_t είναι ο συνολικός όγκος της στήλης του μοριακού βάρους της ουσίας τότε $V_t = V_i + V_0 + V_g$. Το V_0 ονομάζεται νεκρός όγκος της στήλης (void volume) και είναι ο όγκος που μπορεί να απομακρύνει τελείως από τη στήλη την ουσία εκείνη που δεν συγκρατείται καθόλου από την πηκτή. Αν V_0 είναι ο όγκος που απαιτείται για την απομάκρυνση μιας ουσίας από τη στήλη (όγκος έκλουσης της ουσίας), τότε

$$V_e = V_0 + K_d \cdot V_i \text{ και } K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i}$$

Το K_d μπορεί να θεωρεί ότι παίρνει τιμές από μηδέν (όταν $V_e = V_0$) μέχρι 1 όταν η ουσία έχει τόσο μοριακό βάρος ώστε να κυκλοφορεί ελεύθερα ανάμεσα στη στατική και

την κινούμενη φάση.

Στην πράξη το Kd μπορεί να πάρει τιμές μέχρι 0,8 επειδή ένα μέρος του συγκρατημένου στην πηκτή νερού χρησιμοποιείται για εφυδάτωση.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΞΙΝΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ ΑΠΟ ΣΠΕΡΜΑΤΑ ΣΙΤΟΥ.

Εισαγωγή: Οι φωσφατάσες (φωσφοϋδρολάσες ορθοφωσφορικών μονοστέρων) έχουν απομονωθεί από κύτταρα βακτηρίων αλλά και από ζωικούς και φυτικούς ιστούς.

Αν και είναι υδρολάσες δείχνουν σχετικά υψηλή εξειδίκευση. Επίσης καταλύουν και αντιδράσεις τρανσφωσφορλίωσης.

Με το ίδιο συστηματικό όνομα, αλλά με διαφορετικό EC (κωδικό) και διαφορετικό κοινό όνομα, υπάρχουν δύο ένζυμα.

Η EC 3.1.3.1. (αλκαλική φωσφατάση) και η EC 3.1.3.2 (όξινη φωσφατάση). Δρουν σε διαφορετικές περιοχές βέλτιστου pH. Σε pH = 8 ως 9, η πρώτη και pH = 4 ως 6 η δεύτερη. Καμιά όμως δεν καταλύει την υδρόλυση φωσφοδιεστέρων. Τα σπέρματα σίτου είναι μια πλούσια και «εύκολη» πηγή της όξινης φωσφατάσης.

Διαδικασία καθαρισμού

Όλα τα στάδια πρέπει να εκτελεστούν από 0 έως 4°C εκτός αν έχουν καθοριστεί διαφορετικά.

α. Εκχύλιση του ενζύμου. Σε 30ml κρύου νερού προσθέτουμε 15g κοπανισμένα σπέρματα σίτου (μοιρασμένα σε δύο σωλήνες), ανακατεύουμε το μίγμα μέχρι να γίνει ομοιόμορφο αιώρημα και το αφήνουμε για 15 λεπτά αναδεύοντας περιοδικά. Κατόπιν φυγοκεντρούμε το μίγμα για 10 λεπτά σε 5500xg, παίρνουμε το υπερκείμενο υγρό και μετράμε τον όγκο του (κλάσμα I).

β. Κλασματική καταβύθιση με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και θερμική κλασμάτωση. Προσθέτουμε 0,2 ml MnCl_2 1M σε κάθε 10ml του προηγούμενου διαλύματος, φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στα 5500xg και μετράμε τον όγκο του υπερκείμενου υγρού (απορρίπτουμε το ίζημα).

Μεταφέρουμε το υπερκείμενο υγρό σε ένα ποτήρι (π.χ. 100 ml) μέσα σε πάγο, προσθέτουμε 5,4 ml κρύου κεκορεσμένου διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH = 5,5) για κάθε 10 ml του διαλύματος και αναδεύουμε για 10 λεπτά. Κατόπιν φυγοκεντρούμε το μίγμα για

10 λεπτά σε 5500xg και παίρνουμε το υπερκείμενο υγρό. Σ' αυτό προσθέτουμε με ανάδευση 7,9ml κορεσμένου διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ για κάθε 10ml όγκου του υπερκείμενου υγρού της πρώτης φυγοκέντρωσης.

Τοποθετούμε το μίγμα σε λουτρό νερού θερμοκρασίας $65^\circ - 70^\circ\text{C}$, αναδεύοντας συνέχεια. Όταν η θερμοκρασία του μίγματος φτάσει τους 60°C , διατηρούμε το μίγμα σ' αυτή τη θερμοκρασία για 2 λεπτά ακριβώς. Στη συνέχεια τοποθετούμε το μίγμα σε λουτρό πάγου και το αναδεύουμε μέχρι να φτάσει η θερμοκρασία τους 5°C . Φυγοκεντρούμε το μίγμα για 10 λεπτά σε 5500xg, παίρνουμε το ίζημα και το επανααιωρούμε σε ένα όγκο κρύου νερού τόσο όσο το $1/3$ του όγκου του υπερκείμενου υγρού της πρώτης φυγοκέντρωσης. Φυγοκεντρούμε το θολό αιώρημα για 15 λεπτά σε 10000xg και παίρνουμε το υπερκείμενο υγρό το οποίο φυλάσσεται παγωμένο (κλάσμα II).

Σαν γενικός κανόνας στην εκχύλιση ενζύμων θεωρείται ότι κανένα κλάσμα δεν πετάγεται πριν αποδειχθεί η δραστηκότητά του.

γ. Συμπύκνωση του ενζύμου με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Εάν ο όγκος του κλάσματος II είναι μεγάλος πρέπει να συμπυκνωθεί πριν τον καθαρισμό με χρωματογραφία Sephadex. Το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ καταβυθίζει ποσοτικά το ένζυμο ακόμη και σε αραιή συγκέντρωση πρωτεΐνης στο κλάσμα. Για κάθε λοιπόν 10ml του κλάσματος II προσθέτουμε με ανάδευση 4 g στερεού $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Μετά από ανάδευση 10 λεπτών φυγοκεντρούμε το αιώρημα για 10 λεπτά σε 10000xg. Παίρνουμε το ίζημα και το επαναδιαλύουμε σε 1ml διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2M περιέχοντος 1mM EDTA και pH = 5,8. Απομακρύνουμε τα αδιάλυτα συστατικά με φυγοκέντρωση για 10 λεπτά σε 10000xg και παίρνουμε το υπερκείμενο υγρό το οποίο το φυλάσσουμε στην κατάψυξη.

δ. Καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (Sephadex G-100)

Η όξινη φωσφατάση είναι σχεδόν σταθερή στη θερμοκρασία, ιδίως με την παρουσία $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Έτσι ο καθαρισμός της με χρωματογραφική στήλη Sephadex μπορεί να γίνει στη θερμοκρασία δωματίου χωρίς να χάσει δραστηκότητα οφειλόμενη σε θερμική απενεργοποίηση. Γεμίζουμε μια στήλη 2,5 x 35cm με Sephadex G-100*, την εξισορροπούμε με 0,2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ περιέχοντος 1mM EDTA (pH = 5,8). Αφήνουμε το διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - EDTA να περάσει στη στήλη μέχρι η κορυφή της να είναι σχεδόν στεγνή.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Δεν αφήνουμε τη στήλη να στεγνώσει

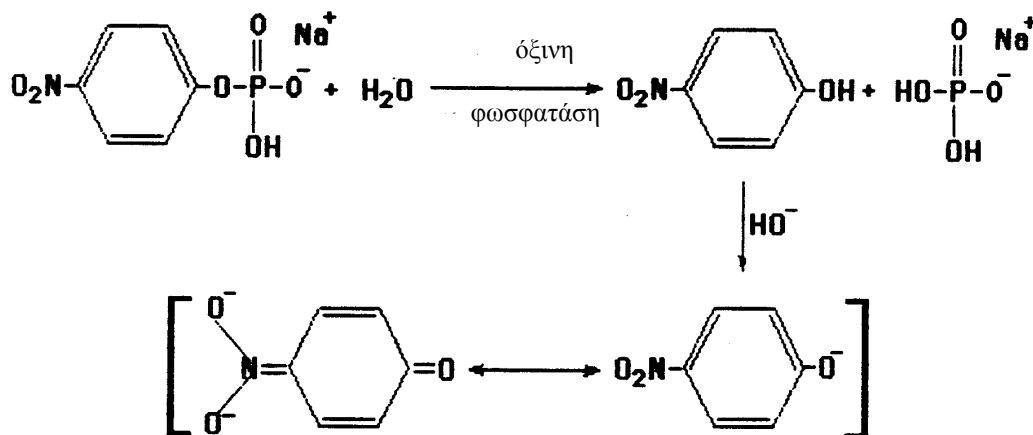
Κατόπιν προσθέτουμε αργά και προσεκτικά το διάλυμα του ενζύμου στην κορυφή της

στήλης και το αφήνουμε να προχωρήσει στη στήλη. Προσθέτουμε προστατευτική στοιβάδα 5ml διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -EDTA στην κορυφή της στήλης αφήνοντάς το και πάλι να προχωρήσει στη στήλη. Τέλος γεμίζουμε τη στήλη με διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -EDTA και την συνδέουμε με μια δεξαμενή που περιέχει επίσης διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - EDTA. Για τη στήλη αυτού του μεγέθους μαζεύουμε 20 κλάσματα των 5ml στα οποία μπορούμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης είτε με τη μέθοδο της διουρίας είτε με τη μέθοδο των Warburg-Christian. Επίσης μπορούμε να προσδιορίσουμε τη δραστικότητα του ενζύμου σε όλα τα κλάσματα ή σε μερικά από αυτά οπότε βλέπουμε σε ποιιά κλάσματα εκλούεται το ένζυμο. Στη συνέχεια συγκεντρώνουμε τα κλάσματα που περιέχουν το ένζυμο και προσδιορίζουμε πάλι σ' αυτά δραστικότητα του ενζύμου και συγκέντρωση πρωτεΐνης.

B. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στην υδρόλυση του π-νιτρο-φαινυλο-φωσφορικού νατρίου (SNPP) παρουσία όξινης φωσφατάσης από σπέρματα σίτου και στον φωτομετρικό προσδιορισμό της π-νιτρο-φαινόλης που ελευθερώνεται από την αντίδραση. Σε αλκαλικό περιβάλλον το έγχρωμο ιόν της π-νιτρο-φαινόλης, έχει μέγιστο απορρόφησης στα 405nm.



Αντιδραστήρια

α. Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου 0,05M pH 4,8: Διαλύονται 7,35gr κιτρικού νατρίου σε 400ml νερό, ρυθμίζεται το pH στα 4,8 με προσθήκη 1N NaOH (έλεγχος με πεχάμετρο) και αραιώνεται ο όγκος στα 500ml. Ξαναελέγχεται το pH του τελικού διαλύματος.

β. Διάλυμα π-νιτρο-φαινυλο-φωσφορικού νατρίου 0,006M: Διαλύονται 0,1578 gr

SNPP σε 100ml νερού.

γ. **Διάλυμα καυστικού νατρίου 0,1M:** Διαλύονται 2gr NaOH σε 500ml νερού.

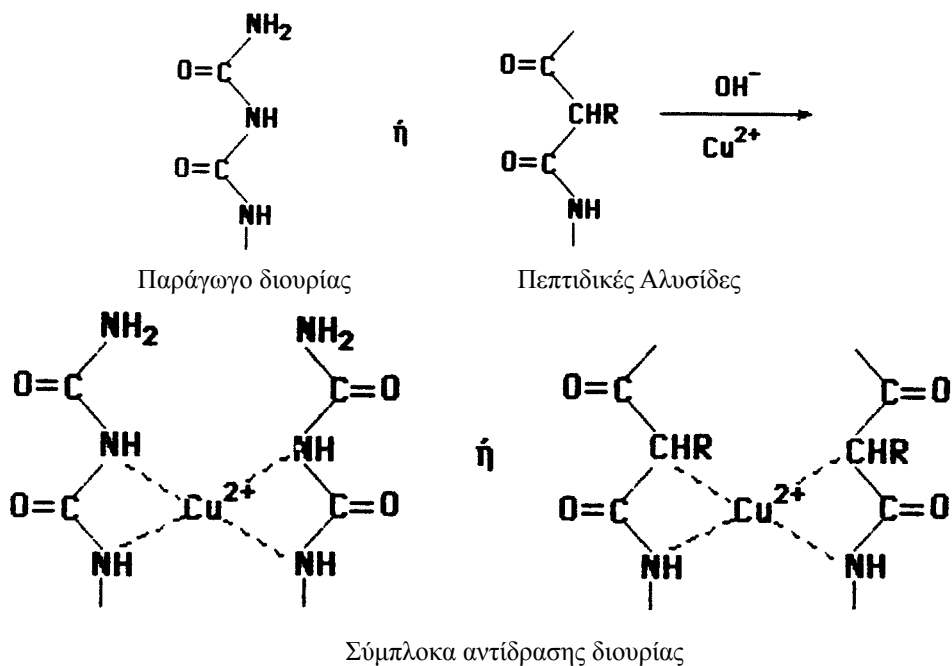
Προσδιορισμός

Παίρνουμε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτουμε στον καθένα από 1ml διαλύματος SNPP 0,006M, 1ml ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών και αφού τους αφήσουμε 5min στους 37°C για εξισορρόπηση, προσθέτουμε στον ένα 0.1ml (+ 0,9ml H₂O) διαλύματος ενζύμου και στον άλλο 1ml νερού (τυφλό). Ύστερα από παραμονή 15 λεπτών στους 37°C προσθέτουμε από 3ml NaOH 0,1N. Μετρούμε την οπτική πυκνότητα στα 405nm, και από την πρότυπη καμπύλη υπολογίζουμε τα moles της νιτροφαινόλης που σχηματίστηκαν και επομένως το ποσό του υποστρώματος που υδρολύθηκε. Υπολογίζουμε την ταχύτητα της αντιδράσεως (μoles υποστρώματος που υδρολύθηκε/min/mg ενζύμου).

Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΔΙΟΥΡΙΑΣ

Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πεπτιδίων και πρωτεϊνών (όχι όμως και των ελεύθερων αμινοξέων), βασίζεται στο αν αυτά κατεργαστούν με Cu⁺⁺ σε αλκαλικό περιβάλλον δίδουν ιώδες σύμπλοκο Cu⁺⁺-πρωτεΐνης ή Cu⁺⁺-πεπτιδίου που μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά στα 550nm. Η μέθοδος λέγεται της διουρίας γιατί η απλούστερη ένωση που δίνει την αντίδραση αυτή είναι η διουρία.



Αντιδραστήρια

α) Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης συγκεντρώσεως 10mg/ml: Διαλύουμε 0,5gr αλβουμίνης σε 50ml H₂O.

β) Αντιδραστήριο διουρίας: Διαλύουμε 0,75gr CuSO₄ · 5 H₂O και 3 gr NaKC₄H₄O₆·4 H₂O (τρυγικό καλιονάτριο) σε 250ml H₂O. Το διάλυμα αυτό αναμιγνύεται με 150ml NaOH 10% και συμπληρώνεται ο όγκος του ως τα 500ml.

Χάραξη πρότυπης καμπύλης

Παίρνουμε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους τοποθετούμε ποσότητες H₂O, διαλύματος αλβουμίνης και αντιδραστηρίου διουρίας ως φαίνεται στον πίνακα I. Μετά παραμονή 30 min στη θερμοκρασία περιβάλλοντος φωτομετρούμε στα 550nm. Σχεδιάζουμε την καμπύλη απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης αλβουμίνης. Περιοχή 1-10mgr.

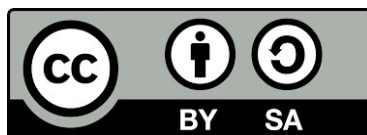
ΠΙΝΑΚΑΣ I

Αντιδραστήρια	T	1	2	3	4	5
H ₂ O ml	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Αλβουμίνη 10 mg/ml (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Αντιδραστήριο διουρίας (ml)	4	4	4	4	4	4
Απορρόφηση 550 nm						

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Proteolytic enzymes, a practical approach by R. J. Beynon and J. S. Bond, IRL Press 1990.
2. Experiments and Methods in Biochemistry by D. C. Wharton and R. E. Mc Carty, Macmillan publishing CO., INC. N. Y., Collier Macmillan publishers, London.
3. Protein purification methods, a practical approach by E. L. V. Harris and S. Angal, IRL Press, 1990.
4. Biochemical calculations by I. H. Segel, John Wiley and sons, Inc. N. Y., London, Sydney, Toronto.

Τέλος Ενότητας



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Σημειώματα

Σημείωμα Ιστορικού Εκδόσεων Έργου

Το παρόν έργο αποτελεί την έκδοση 1.0.

Έχουν προηγηθεί οι κάτωθι εκδόσεις:

- Έκδοση 1.0 διαθέσιμη εδώ.

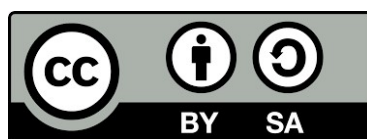
<http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1374>.

Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
Διδάσκοντες: Αναπλ. Καθ. Α. Ε. Κούκκου,
Καθ. Μ. Ε. Λέκκα, Αναπλ. Καθ. Ε. Πάνου,
Καθ. Ε. Παπαμιχαήλ, Καθ. Α. Τσελέπης,
Καθ. Δ. Τσουκάτος. «Εργαστήριο
Βιοχημείας. Καθαρισμός όξινης
φωσφατάσης από σπέρματα σίτου».
Έκδοση: 1.0. Ιωάννινα 2014. Διαθέσιμο
από τη δικτυακή διεύθυνση:
<http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1374>.

Σημείωμα Αδειοδότησης

- Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά Δημιουργού - Παρόμοια Διανομή, Διεθνής Έκδοση 4.0 [1] ή μεταγενέστερη.



- [1] <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.