



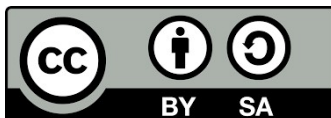
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΑΝΟΙΚΤΑ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ
ΜΑΘΗΜΑΤΑ**



Εργαστήριο Βιοχημείας

Συνθετάση της γλουταμίνης στο
ζυμομύκητα *Schizosaccharomyces
pombe*

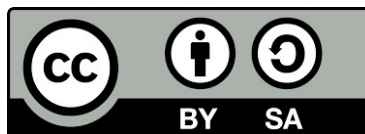
Διδάσκοντες: Αναπλ. Καθ. Α. Ε. Κούκκου,
Καθ. Μ. Ε. Λέκκα, Αναπλ. Καθ. Ε. Πάνου,
Καθ. Ε. Παπαμιχαήλ, Καθ. Α. Τσελέπης, Καθ.
Δ. Τσουκάτος



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 10

ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ της ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗΣ

στο ζυμομύκητα

Shizosaccharomyces pombe

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
 - A. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ
 - B. ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ
 - Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

α. Η γλουταμίνη στον διάμεσο μεταβολισμό.

Η γλουταμίνη είναι ένα από τα ένδεκα μη απαραίτητα αμινοξέα για τον άνθρωπο (τη βιοσυνθέτει ο ίδιος ο οργανισμός) και ένα από τα είκοσι αμινοξέα των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση άλλων αμινοξέων με απόσπαση αμινομάδας (απαμίνωση) ή με μεταφορά αμινομάδας (τρανσαμίνωση). Προσφέρει την ω-αμινομάδα για τη βιοσύνθεση φωσφοκαρδαμικικού οξέος στο κυτταρόπλασμα, που χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση των πυριμιδινών. Η γλουταμίνη προσφέρει επίσης την ω-αμινομάδα για την βιοσύνθεση των πουρινών και από αυτές των νουκλεϊνικών οξέων. Συνεισφέρει την αμιδική ομάδα του τμήματος του νικοτιναμιδίου στο NAD^+ . Χρησιμοποιείται ως καύσιμο, όπως όλα τα αμινοξέα, για βιοσύνθεση ATP.

β. Βιοσύνθεση της γλουταμίνης.

Η γλουταμίνη βιοσυντίθεται σε όλους τους οργανισμούς μόνο με την αντίδραση $\text{NH}_4\text{OH} + \text{Glu} + \text{ATP} \rightarrow \text{Gln} + \text{ADP} + \text{Pi}$ (1), η οποία καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση της γλουταμίνης (L-glutamate: ammonia ligase, EC 6.3.1.2) (Tyller, 1978), γεγονός που καθιστά αυτό το ένζυμο πολύ σημαντικό. Σε πολλούς μικροοργανισμούς έχει βρεθεί ότι ρυθμίζεται η βιοσύνθεση αυτού του ενζύμου.

γ. Προσδιορισμός της τιμής της ενζυμικής δραστηριότητας της GS.

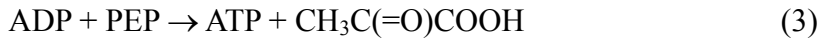
Η παρούσα μέθοδος εισήχθη από τους Speck (1949) και Elliot (1951) (Elliot, 1955) και βασίζεται στο γεγονός ότι το ένζυμο GS είναι ικανό να σχηματίζει L-γ-GH αν το ιόν του αμμωνίου της αντίδρασης (1) αντικατασταθεί από υδροξυλαμίνη σύμφωνα με τη γενική

αντίδραση: $\text{RCOOH} + \text{ATP} + \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{RCONHOH} + \text{ADP} + \text{Pi}$ (2) όπου $\text{RCOOH} = \text{Glu}$ και $\text{RCONHOH} = \text{L-}\gamma\text{-γλουταμινικό υδροξαμικό (L-}\gamma\text{-GH)}$.

Τα υδροξαμικά οξέα προσδιορίζονται με τη μέθοδο, η οποία περιγράφεται από τους Lirmann και Tuttle (1945), κατά την οποία σχηματίζουν πορφυρό χρώμα με FeCl_3 .

Η μέθοδος αυτή της γ-γλουταμυλοτρανσφεράσης χρησιμοποιείται ευρύτατα λόγω της απλότητας, της ικανοποιητικής ακρίβειας και της συντομίας της σε αντίθεση με τη μέθοδο της συνθετάσης (κατάλυση της αντίδρασης 1), η οποία λόγω της πολυπλοκότητάς της εμφανίζει αρκετές δυσκολίες και είναι δυσχερής και επίπονη.

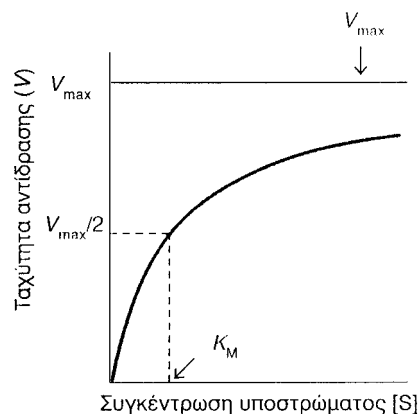
Στον *S. pombe* ο λόγος των δραστηριοτήτων τρανσφεράσης προς συνθετάση της GS βρέθηκε σταθερός σε όσες συνθήκες ανάπτυξης του οργανισμού μετρήθηκαν οι τιμές αυτών των δραστηριοτήτων (Van Andel and Brown, 1977). Ο προσδιορισμός της GS (ιδιότητα συνθετάσης), αντίδραση (1), γίνεται με μέτρηση της ελάττωσης του NADH της δεύτερης (4) εκ των συζευγμένων αντιδράσεων της (1) (Kingdon et al, 1968).



όπου PEP = φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ.

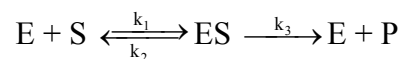
δ. Ερμηνεία των κινητικών ιδιοτήτων πολλών ενζύμων με το πρότυπο των Michaelis-Menten.

Σε πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης, V , μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$, με τον τρόπο που παρουσιάζεται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1

Το μοντέλο Michaelis-Menten παρέχει πληροφορίες για τις κινητικές ιδιότητες μερικών ενζύμων. Σ' αυτό το πρότυπο, ένα ένζυμο (E) συνδυάζεται με ένα υπόστρωμα (S) για να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES), το οποίο μπορεί να σχηματίσει ένα προϊόν (P) ή να διασπαστεί σε E και S.



Η ταχύτητα σχηματισμού προϊόντος (V) δίνεται από την εξίσωση

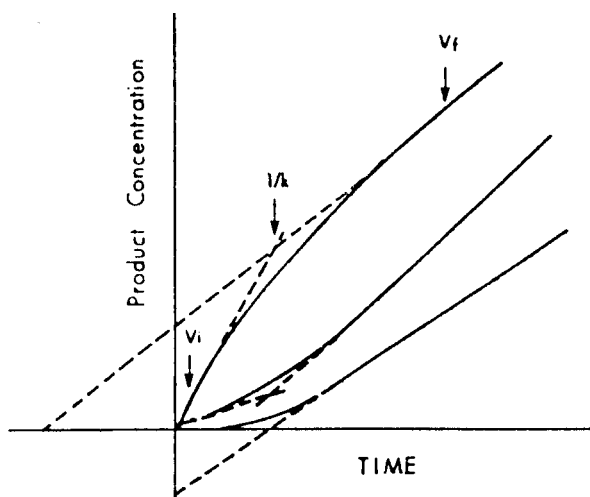
$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

στην οποία V_{\max} είναι η ταχύτητα όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα και η σταθερά Michaelis (K_m) είναι η συγκέντρωση κατά την οποία η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης ταχύτητας. Η μέγιστη ταχύτητα V_{\max} είναι

ίση με το γινόμενο της k_3 και της ολικής συγκέντρωσης του ενζύμου. Η κινητική σταθερά k_3 , που ονομάζεται αριθμός μετατροπής, είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου σε μία μόνο καταλυτική περιοχή, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Ο αριθμός μετατροπής για τα περισσότερα ένζυμα είναι μεταξύ 1 και 10^4 ανά δευτερόλεπτο.

ε. Το φαινόμενο της αργής μετάπτωσης και συμπεριφοράς υστέρησης στα ένζυμα.

Ο Frieden χρησιμοποίησε τον όρο **υστέρηση** για να περιγράψει το φαινόμενο κατά το οποίο ένζυμα ανταποκρίνονται αργά (από πλευράς κινητικής συμπεριφοράς) σε μεταβολές στη συγκέντρωση ενός προσδέτη (ligand), όπως λ.χ. στην προσθήκη υποστρώματος, για να αρχίσει η αντίδραση. Τέτοια ένζυμα παρουσιάζουν είτε αύξηση του ρυθμού εμφάνισης προϊόντων, είτε καθυστέρηση (βλέπε Σχήμα 2). Δεν υπάρχει μόνο ένας μηχανισμός που μπορεί να ερμηνεύσει την υστερική συμπεριφορά. Όλοι όμως προϋποθέτουν ισομερίωση του ενζύμου ή των συμπλόκων ενζύμου-υποστρώματος και ενζύμου-προϊόντων.



Σχήμα 2. Καμπύλη προόδου μιας ενζυμικής αντίδρασης που η υστερητική συμπεριφορά εκφράζεται σαν καθυστέρηση στο ρυθμό εμφάνισης προϊόντων ή σαν αύξηση. V_i είναι η αρχική ταχύτητα πριν από την υστερητική μετάπτωση και V_f η ταχύτητα μετά τη μετάπτωση. Η τομή των ευθέων τμημάτων των καμπύλων μας δίνει την τιμή της σταθεράς ταχύτητας των αντιδράσεων. (Frieden, 1979).

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

(Περυσινάκης, 1992, Perysinakis και συνεργάτες, 1995)

A. Υλικά - Μέθοδοι.

1. Μικροβιακά στελέχη.

Χρησιμοποιούνται ο φυσικός τύπος, στέλεχος 975 h⁺ του ζυμομύκητα *Shizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) και το μεταλλαγμένο στέλεχος του *gln1-1h⁺*, αυξότροφο μόνο ως προς το θρεπτικό μέσο γλουταμίνη, δηλ. αναπτύσσεται μόνο αν περιέχεται γλουταμίνη (Gln) στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης..

2. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης (Gutz και συνεργάτες, 1977).

YEL: Πλήρες υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αφυλετικών κυττάρων. 0,5% (w/v) Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) και 3% (w/v) γλυκόζη.

YEA: Πλήρες στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αφυλετικών κυττάρων. Στο YEL προστίθεται 1,5% (w/v) άγαρ.

MML: Χημικά καθορισμένο ελάχιστο υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αφυλετικών κυττάρων:

Πηγή άνθρακα:	Γλυκόζη	3% w/v.
Πηγή αζώτου:	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 mM.
Άλατα:	Υδατ. διάλυμα αλάτων*	5% v/v.
Συμπληρώματα:	» ιχνοστοιχείων I*	0,1% v/v.
	» » II*	0,1% v/v.
	» » III	0,1% v/v.
	» τριών βιταμινών*	0,1% v/v.
	» βιοτίνης*	0,1% v/v.

* Διάλυμα αλάτων:

KH ₂ PO ₄	20 g/l.
MgSO ₄ .7H ₂ O	10 ».
NaCl	2 ».
CaCl ₂ .2H ₂ O	2 ».

*Διάλυμα ιχνοστοιχείων I:

CuSO ₄ .5H ₂ O	4mg/100ml.
KI	10 ».
MnSO ₄ .H ₂ O	40 ».

	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	40 ».
* Διάλυμα ιχνοστοιχείων II:		
	H ₃ BO ₃	50 ».
	H ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O(Na)	16(19) ».
* Διάλυμα ιχνοστοιχείων III:		
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	20 ».
* Υδατικό διάλυμα βιταμινών (αποστείρωση με φίλτρο):		
	Πανθοθενικό ασβέστιο	0,1 g/100ml.
	Νικοτινικό οξύ	1 ».
	m-Ινοσιτόλη	1 ».
* Υδατικό διάλυμα Βιοτίνης με 50% αιθανόλη: (αποστείρωση με φίλτρο)		1mg/100ml.

Η τιμή pH αυτού του θρεπτικού μέσου είναι 4,5.

MMA: Χημικά καθορισμένο ελάχιστο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αφυλετικών κυττάρων. Στο MML προστίθεται 2% (w/v) άγαρ. Στο θρεπτικό μέσο προστίθεται γλουταμίνη σε χαμηλή συγκέντρωση (1-2 mM) όταν απαιτείται η κάλυψη των τροφικών απαιτήσεων του μεταλλαγμένου στελέχους gln1-1 h⁺.

Τα θρεπτικά μέσα αποστειρώνονται σε ≈ 14,5 psi (1 bar) (121°C) για 15 min, εκτός των διαλυμάτων των βιταμινών και συμπληρωματικών αμινοξέων, τα οποία αποστειρώνονται με φίλτράρισμα, μέσω φίλτρων νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,45μm.

3. Συνθήκες ανάπτυξης.

Η επιτρεπτή θερμοκρασία ανάπτυξης του *S. pombe* κυμαίνεται μεταξύ 25°C έως 30°C. Τα κύτταρα επωάζονται στους 30°C για αφυλετική αναπαραγωγή και στους 25°C για σποριογονία.

Ο *S. pombe* είναι μη αυστηρά αερόβιος ζυμομύκητας. Αναπτύσσεται σε μη συνεχείς (Batch) καλλιέργειες των 200 ml σε κωνικές φιάλες των 500 ml υπό ανάδευση (180 rpm) σε ανακινούμενο επωαστήρα New Brunswick τύπου G76, N. J. USA (για εμβολιασμό υγρών καλλιεργειών βλέπε άσκηση καλλιεργιών). Αυτά τα πειράματα προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας γίνονται μετά από ανάπτυξη του *S. pombe* σε MML, με πηγή αζώτου (NH₄)₂SO₄ συμπληρωμένο με το αμινοξύ γλουταμίνη.

Ο πληθυσμός των κυττάρων μετά τον εμβολιασμό, είναι της τάξεως του 10⁶ ανά ml (απορρόφηση/540nm = 0.030 έως 0.040, με φασμαφωτόμετρο Bausch & Lomb

spectronic 20). Μετά από επώαση 13 έως 15 h η ανάπτυξη των κυττάρων βρίσκεται εντός της εκθετικής φάσης, κατά την οποία ο πληθυσμός φθάνει τα $1,5 \times 10^7$ κύτταρα ανά ml (Απορρόφηση στα 540nm = 0,5). Από αυτό το σημείο ανάπτυξης συλλέγονται τα κύτταρα για να ακολουθήσει η φάση της εκχύλισης. Η τιμή του pH, από 4,5 κατά την έναρξη της καλλιέργειας, μειώνεται σε 2,8 όταν η ανάπτυξη έχει φθάσει στην ανώτερη τιμή απορρόφησης (0,5). Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων του φυσικού και του μεταλλαγμένου στελέχους *gln1-1 h⁺* στις ανωτέρω συνθήκες ανάπτυξης με πηγή αζώτου 5mM θειϊκό αμμώνιο (με ή χωρίς γλουταμίνη) είναι 220 ± 10 min.

4. Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης.

Τα κύτταρα καλλιέργειας 200ml εκχυλίζονται με 4ml Tris.HCl συγκέντρωσης 50mM pH 7,5, το οποίο περιέχει και 1mM διθειοθρεϊτόλη (DTT) ως σταθεροποιητικό παράγοντα (τροποποίηση της μεθόδου Barel et al, 1988).

5. Εκχύλιση των κυττάρων και συνθήκες προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας G.S.

Περιγράφονται στην εκτέλεση του πειράματος.

6. Προσδιορισμός πρωτεϊνών (Μέθοδος Lowry).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Lowry και συνεργατών (1951) με ελάχιστες τροποποιήσεις ως ακολούθως:

Δύο βήματα οδηγούν σε σχηματισμό μπλε χρώματος λόγω της παρουσίας πρωτεϊνών.

α) Η αντίδραση των πρωτεϊνών με δισθενή χαλκό σε αλκαλικό περιβάλλον και β) η αναγωγή του φωσφομολυβδαινικού-φωσφοβολφραμικού αντιδραστηρίου από τις πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν υποστεί την επίδραση του δισθενούς χαλκού (για μηχανισμό βλέπε Peterson, 1979). Η μέτρηση του μπλε χρώματος γίνεται φωτομετρικά στα 750nm.

Το παραδεκτό όριο ανιχνευσιμότητας της μεθόδου, για τους ανωτέρω όγκους, είναι τα 25μg. Η μέθοδος έχει τα εξής πλεονεκτήματα: απλότητα, ακρίβεια και ευαισθησία. Μειονεκτήματα είναι τα: α) σχετικά μεγάλος αριθμός ουσιών επηρεάζει την ένταση του χρώματος, όπως: 2-μερκαπτοαιθανόλη, φωσφορικά, EDTA, DTT και Tris (υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο) (Tris) (Peterson, 1979), ενώ τα σφάλματα λόγω των παρεμβολών αυτών των ουσιών είναι της τάξεως του 3% έως 6%. β) Η ένταση του χρώματος ποικίλει για τα διάφορα είδη πρωτεϊνών. γ) Το σχηματιζόμενο χρώμα δεν είναι

αυστηρά ανάλογο προς τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης (Lowry et al., 1951) και

δ) ο σχετικά μεγάλος χρόνος αντίδρασης και η αστάθεια ορισμένων αντιδραστηρίων.

B. Εκτέλεση του πειράματος.

1. Ανάπτυξη των κυττάρων του ζυμομύκητα *S. pombe*.

Από κυτταρική καλλιέργεια του φυσικού τύπου (975 h⁺) σε MMA [+ 5mM(NH₄)₂SO₄] και του μεταλλαγμένου στελέχους (gln1-1h⁺) σε MMA [+5 mM (NH₄)₂ SO₄] + 2mM Gln γίνεται ανανέωση στα ίδια θρεπτικά υλικά αντιστοίχως, ~ 3x24h πριν την διεξαγωγή της άσκησης, και τα κύτταρα αναπτύσσονται για ~2x24h σε περιβάλλον 30⁰C.

Προκαλλιέργειες θρεπτικού μέσου ανάπτυξης MML [+ 5mM(NH₄)₂SO₄] + 2mM Gln όγκου περί τα 30 έως 40 ml σε κωνικές φιάλες των 250ml για κάθε ένα από τα δύο στελέχη, εμβολιάζονται με πληθυσμό κυττάρων ~ 1,5x10⁶ ανά ml (OD~0,05Abs/540nm)~1x24h πριν την έναρξη της άσκησης και επωάζονται υπό ανακίνηση σε 150 - 180 rpm σε θερμοκρασία 30°C.

Οι τελικές καλλιέργειες του ίδιου θρεπτικού μέσου ανάπτυξης όγκου 220ml εκάστη σε κωνικές φιάλες των 500ml εμβολιάζονται με πληθυσμό κυττάρων ~ 1,5x10⁶ ανά ml (OD~0,050 Abs/540 nm) ~ 12h πριν την έναρξη της άσκησης και επωάζονται ως ανωτέρω.

Μετά το τέλος του καθορισμένου χρόνου ανάπτυξης οι καλλιέργειες φωτομετρούνται στα 540nm (οι τιμές των οπτικών απορροφήσεων πρέπει να είναι στην περιοχή 0,500 Abs) και φυλάσσονται υπό ψύξη (σε πάγο).

2. Παρασκευή των ακατέργαστων κυτταρικών εκχυλισμάτων.

Κατά τη διάρκεια όλων των διεργασιών της εκχύλισης τα παρασκευάσματα διατηρούνται στους 0°C εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά εντός του κειμένου. Μετά την ανάπτυξη ποσότητες κυτταρικών αιωρημάτων, των οποίων το γινόμενο του όγκου επί την οπτική απορρόφηση είναι ~ 100, φυγοκεντρώνται σε 2300g (~ 4000 rpm) για 3-5min υπό ψύξη. Το κάθε ίζημα των κυττάρων εκπλένεται με 5-10ml αποσταγμένο νερό και μετά από νέα φυγοκέντρωση ακολουθεί η φάση της εκχύλισης.

Το ίζημα των εκπλυμένων κυττάρων, των οποίων το κάθε δείγμα καταλαμβάνει όγκο περίπου 0,35ml, επαναιωρούνται σε 0,7 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης και τοποθετούνται σε ειδικά πλαστικά φιαλίδια (χωρητικότητας 2,0ml) εντός των οποίων έχουν προστεθεί γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 0,5mm και ποσότητας τέτοιας ώστε να

καλύπτεται το 1/2 του όγκου. Τα φιαλίδια τοποθετούνται εναλλάξ στο σφαιρόμυλο (Mini-Beadbeater, model 3110 BX, Biospec products, Bartlesville Oklahoma USA) και σε παρόνερο 5-6 φορές για χρονικό διάστημα 1 min κάθε φορά. Μετά από φυγοκέντρηση ενός λεπτού σε μικροφυγόκεντρο, το υπερκείμενο διάλυμα, το οποίο είναι περίπου 1ml, απομακρύνεται με πιπέτα pasteur, αραιώνεται για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας έως 4ml ($\approx 4\text{mg}$ πρωτεΐνη ανά ml) και φυγοκεντρείται εκ νέου σε 20.000 g ($\sim 16.000\text{ rpm}$) για 15 min. Το νέο υπερκείμενο φυλάσσεται υπό ψύξη ως ενζυμικό παρασκεύασμα.

3. Προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Lowry.

Αντιδραστήρια:

A: 2% υδατικό διάλυμα Na_2CO_3 .

B: 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε υδατικό διάλυμα κιτρικού νατρίου 1% (αντί τρυγικού κατά Lowry).

Γ: Ανάμιξη των A και B σε αναλογία 50:1 λίγο πριν τη χρήση (διατηρείται για μια ημέρα).

Δ: Αντιδραστήριο φαινόλης [Folin and Ciocalteu's Phenol Reagent 2,0 N, Sigma F - 9252 (Folin and Ciocalteu, 1927, Lowry et al, 1951)], αραιώση 1:2, λίγο πριν τη χρήση, με τελική συγκέντρωση 1 N.

E: Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης από ορό βοοειδών (BSA) 200 $\mu\text{g/ml}$ 0,5N NaOH.

Z: Διαλύματα 0,5N και 1,0N NaOH.

Διαδικασία:

Διαλύματα όγκου 0,2ml άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεϊνών, από το ανωτέρω αναφερόμενο ενζυμικό παρασκεύασμα, αραιώνονται 1:5 με 0,2ml 1N NaOH και 0,6ml 0,5N NaOH και επωάζονται για τουλάχιστον 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Σε σειρά 6 ζευγών δοκιμαστικών σωλήνων (17mm x 150mm) τοποθετούνται χωριστά: α) σε δυο ζεύγη τα άγνωστα δείγματα πρωτεΐνης (0,1ml από κάθε δείγμα και 0,9ml 0,5N NaOH ανά δοκ. σωλήνα) και β) σε τέσσερα ζεύγη τα γνωστά (πρότυπα) δείγματα BSA τελικού όγκου 1ml, και συγκέντρωσης ως προς NaOH 0,5N, των οποίων η ποσότητα σε πρωτεΐνη πρέπει να είναι εντός της περιοχής των 25 έως 150 μg (αναλυτικότερα 2x0, 2x50, 2x100 και 2x150 μg BSA).

Προστίθενται 5ml αντιδραστηρίου Γ ανά δοκιμαστικό σωλήνα και ακολουθεί καλή ανάδευση. Μετά από παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10min προστίθενται 0,5ml

αντιδραστηρίου Δ (φαινόλης 1N) ανά δοκιμαστικό σωλήνα, αναδεύεται **αμέσως** και μετά από παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30min μετράται η απορρόφηση στα 750nm. Οι τιμές καταχωρούνται στον Πίνακα 2.

4. Ενζυμικοί προσδιορισμοί.

α. Μεταβολή ενζυμικής δραστηριότητας G.S. συναρτήσει της συγκέντρωσης του ενός εκ των υποστρωμάτων και

β. Σύγκριση των τιμών των ενζυμικών δραστηριοτήτων G.S. φυσικού και μεταλλαγμένου τύπου κυττάρων.

Χρησιμοποιούνται 20 φυγοκεντρικοί σωλήνες των 5ml και στον καθένα από αυτούς προσθέτουμε τις ποσότητες των αντιδραστηρίων του Πίνακα 1 εκτός της υδροχλωρικής εκτός της υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (NH₂OH.HCl), της οποίας οι ποσότητες ποικίλουν ως ακολούθως. Χρησιμοποιούμε 4 σωλήνες χωρίς υδροξυλαμίνη, σε 4 σωλήνες προσθέτουμε από 200μl και στους άλλους 12 από 4, 8, 12, 16, 20, 28, 40, 60, 80, 100, 120 και 160 μl αντίστοιχα. Ο υπόλοιπος όγκος έως τα 200μl (εκτός της σταθερής ποσότητας των 0,900ml) συμπληρώνεται με τις Tris-μηλεϊνικό 0,110M, pH 6,35

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας GS

(ιδιότητα τρανσφεράσης)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ		ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (M)
	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (M)	ΟΓΚΟΣ (ml)	
Tris-μηλεϊνικό	0,110	0,900	0,050
Gln	0,300	0,600	0,090
NH ₂ OH.HCl	0,500	0,200	0,050
MnCl ₂	0,060	0,100	0,003
Na ₂ HAsO ₄	0,400	0,100	0,020
Ενζυμικό παρασκ.		0,100	–

Συνολικός όγκος αντίδρασης

2,000 ml

Οι φυγοκεντρικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40°C. Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα του ενζυμικού παρασκευάσματος με διαφορά χρόνου 30sec από σωλήνα σε σωλήνα. Σε δύο από τους 4 σωλήνες χωρίς και σε δυο με 200 μl υδροξυλαμίνη προστίθεται 0,1ml ενζυμικό παρασκεύασμα του μεταλλαγμένου στελέχους (*gln1-1 h⁺*) ενώ σε όλους τους υπόλοιπους

0,1ml του φυσικού τύπου ($975h^+$). Η αντίδραση τερματίζεται μετά από 15min ακριβώς με την προσθήκη 0,5ml αντιδραστήριου $FeCl_3$. Αν χρειασθεί ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3.500 rpm για 4-5 min και γίνεται φωτομέτρηση του υπερκειμένου στα 500nm χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα για τα δείγματα του κάθε στελέχους τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς υπόστρωμα (υδροξυλαμίνη). Οι τιμές καταχωρούνται στον Πίνακα 4.

γ. Αργή μετάπτωση και συμπεριφορά υστέρησης του ενζύμου G.S.

- Ποσότητα περί τα 6 έως 8mg L-γ-G.H. διαλύεται σε περίπου 4ml 0,110M Tris-Μηλεϊνικό και ο όγκος συμπληρώνεται έως τα 5ml σε ογκομετρική φιάλη (πυκνό διάλυμα G.H.). Σημειώνεται το μοριακό βάρος η καθαρότητα του G.H.
- Σε κάθε ένα από τα δυο δοχεία αντίδρασης χωρητικότητας μεγαλύτερης των 40ml το καθένα προσθέτουμε τα αντιδραστήρια του πίνακα 1 σε 15πλάσιες ποσότητες, με τη διαφορά ότι στο δεύτερο από αυτά προστίθεται 1,5ml πυκνού διαλύματος G.H. αντί ίσου όγκου Tris-μηλεϊνικού. Αυτό γίνεται για να εξασφαλίσουμε ίσους όγκους στα δυο δοχεία. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας $40^{\circ}C$, και η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος του φυσικού τύπου με διαφορά χρόνου 30sec. από δοχείο σε δοχείο.
- Σε χρονικά διαστήματα 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, και 45 min ακριβώς μετά τις ενάρξεις των δύο ανωτέρω αντιδράσεων λαμβάνονται δείγματα 2,000ml και μεταφέρονται σε ισάριθμους (22) φυγοκεντρικούς σωλήνες των 5ml που ο καθένας περιέχει 0,5ml αντιδραστήριο $FeCl_3$, με το οποίο σταματά η αντίδραση.
- Για τους χρόνους μηδέν (0) ετοιμάζουμε δύο χωριστούς φυγοκεντρικούς σωλήνες των 5ml και προσθέτουμε τις ποσότητες των αντιδραστηρίων του πίνακα 1 αφού προηγουμένως προσθέσουμε από 0,5 ml αντιδραστήριο $FeCl_3$. Στον ένα από αυτούς προσθέτουμε 0,1ml πυκνού διαλύματος G.H. αντί ίσου όγκου Tris-μηλεϊνικού.
- Αν απαιτηθεί γίνεται φυγοκέντρηση για 4-5 min σε 3500 rpm και ακολουθεί φωτομέτρηση όπως στην παράγραφο 4.α, με μάρτυρα τα δείγματα χρόνου μηδέν χωρίς G.H. Οι τιμές καταχωρούνται στον πίνακα 5.

δ. Πρότυπη καμπύλη οπτικής απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης του G.H.

Δυο (2) ml από το παρασκευασθέν πυκνό διάλυμα G.H. αραιώνεται έως 10ml με 0,110M Tris-μηλεϊνικό σε ογκομετρική φιάλη. Σε δυο σειρές από 5 δοκιμαστικούς σωλήνες των 5ml φέρονται κατά ζεύγη οι ποσότητες: 0, 0,4, 0,8, 1,2 και 1,6ml, συμπληρώνονται έως 2ml με 0,110M Tris-μηλεϊνικό και προστίθεται 0,5ml αντιδραστήριο $FeCl_3$. Γίνεται φωτομέτρηση στα 500nm (δεν απαιτείται φυγοκέντρηση). Οι τιμές καταχωρούνται στον Πίνακα 3.

Γ. Αποτελέσματα - Υπολογισμοί

1. Υπολογισμός των ολικών πρωτεϊνών των αγνώστων δειγμάτων.

Επειδή η σχέση των τιμών των οπτικών απορροφήσεων συναρτήσει των τιμών των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών δεν είναι γραμμική αλλά είναι δυνατό να θεωρηθεί ως γραμμική τοπικά χωρίς σημαντικά σφάλματα στο τελικό αποτέλεσμα, γι' αυτό υπολογίζουμε τις τιμές των αγνώστων δειγμάτων των πρωτεϊνών χωρίζοντας την πρότυπη καμπύλη σε επιμέρους γραμμικές περιοχές μεταξύ των συγκεντρώσεων 0, 50, 100 και 150μg BSA που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν και την αραίωση που έχει γίνει στο κάθε άγνωστο δείγμα (1:5) υπολογίζουμε τις ολικές πρωτεΐνες τους σε mg ανά ml του κάθε αρχικού ενζυμικού παρασκευάσματος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

ΠΡΟΤΥΠΑ
ΑΓΝΩΣΤΑ

μgBSA	Πρώτη μέτρηση (Abs)	Δεύτερη μέτρηση (Abs)	Διορθωμένος* μέσος όρος (Abs)	Ολική πρωτεΐνη αγνώστων δειγμάτων	
				μg/δοκιμαστικό σωλήνα	mg/ml (αρχικ.διαλ.)
0	0,000	0,00 x	0,000 (=A ₀)	$x_1 = 50$ $x_2 = 50+50$ $x_3 = 100+50$	$\frac{Ax_1 - A_0}{A_{50} - A_0}$ $\frac{Ax_2 - A_{50}}{A_{100} - A_{50}}$ $\frac{Ax_3 - A_{100}}{A_{150} - A_{100}}$
50		A ₅₀ =			
100		A ₁₀₀ =			
150		A ₁₅₀ =			
g75h ⁺			A _i =	x _i = (π.χ. = x ₂ άν. A ₅₀ < A _i < A ₁₀₀)	y _i =
gln1-1h ⁺			A _j =	x _j = (π.χ. = x ₂ άν. A ₁₀₀ < A _j < A ₁₅₀)	y _j =

* Αν για μηδέν (0) μg BSA η πρώτη μέτρηση είναι 0,000 (ρύθμιση του οργάνου με αυτό το δείγμα-μάρτυρα) και η δεύτερη 0,00 x τότε ο μέσος όρος (0,000 + 0,00 x)/2 αφαιρείται από όλους τους μέσους όρους.

2. Πρότυπη καμπύλη L-γ-G.H.

Από τη γραμμική σχέση Abs = f[L-γ-G.H.] υπολογίζεται η τιμή της κλίσης (K) και από αυτή η τιμή του αντιστρόφου της (1/K) σε μmole L-γ-G.H./Abs.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Πρότυπο διάλυμα G.H (ml)	0	0,4	0,8	1,2	1,6
μmole G.H./δοκ. Σωλ.					
Abs/500nm (α. σειρά)	0,000				
Abs/500nm (β. σειρά)	0,00x				
Abs/500nm (μέσ. όρ)	*Πιν.2				

3. Ενζυμικές δραστηριότητες φυσικού και μεταλλαγμένου τύπου.

Με βάση τις τιμές των απορροφήσεων υπολογίζουμε τις τιμές των ενζυμικών δραστηριοτήτων σε μmoles L-γ-G.H./(min. mg πρωτεΐνης) (Πίνακας 4).

Πίνακας 4

NH ₂ OH.HC 1		Abs/500 nm						ENZYMIKH ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ G.S. μmole G.H./(min.mg πρωτ.)	
μL	mM	975 h ⁺			gln1-1h ⁺			975 h ⁺	gln1-1h ⁺
0	0	0,000	0,00x	0,000*	0,000	0,00y	0,000*	0,000	0,000
4	1								
8	2								
12	3								
16	4								
20	5								
28	7								
40	10								
60	15								
80	20								
100	25								
120	30								
160	40								
200	50			*			*		

* βλέπε σημείωση Πίνακα 2.

Λαμβάνονται υπ' όψιν οι τιμές των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών των αντιστοίχων δειγμάτων καθώς και οι ποσότητες του L-γ-G.H. που προκύπτουν από την πρότυπη καμπύλη του L-γ-G.H. και συγκρίνονται οι τιμές των ενζυμικών δραστηριοτήτων του φυσικού και του μεταλλαγμένου τύπου, για τα δείγματα ίδιων συγκεντρώσεων

υποστρώματος.

4. Μεταβολή της ενζυμικής δραστηριότητας με τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

Από τα ζεύγη τιμών των ενζυμικών δραστηριοτήτων του φυσικού τύπου για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$), κατασκευάζεται το διάγραμμα της ταχύτητας (V) της αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος (S) και σχολιάζεται η μορφή της καμπύλης.

Από τις τιμές των μεγεθών V και S υπολογίζονται οι τιμές των αντιστρόφων τους ($1/V$) και ($1/S$) και κατασκευάζεται το διάγραμμα $1/V = f(1/S)$. Με βάση την εξίσωση των Lineweaver-Burk [$1/V = 1/V_{\max} + (K_m/V_{\max}) \cdot 1/S$] υπολογίζονται οι σταθερές V_{\max} και K_m (Lineweaver-Burk, 1934).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Για τον υπολογισμό των σταθερών V_{\max} και K_m

S(mM)												
V												
1/S												
1/V												

5. Αργή μετάπτωση και συμπεριφορά υστέρησης του ενζύμου G.S.

Υπολογίζονται οι τιμές των ενζυμικών δραστηριοτήτων ως $\mu\text{moles L-}\gamma\text{-G.H./mg}$ πρωτεΐνης για τους αντίστοιχους χρόνους επώασης και για τις δύο σειρές δειγμάτων (με ή χωρίς G.H. στο μείγμα της αντίδρασης) (Πίνακας 6).

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Τιμές απορρόφησης και ποσότητες $\mu\text{mole G.H.}$ για την κατασκευή της καμπύλης συμπεριφοράς υστέρησης

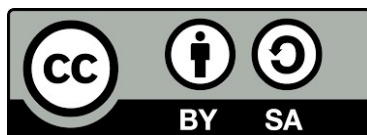
Απορρόφηση ή $\mu\text{mole G.H.}$ και συνθήκες αντίδρασης	Χρόνος αντίδρασης (min)											
	0	3	6	9	12	15	20	25	30	35	40	45
Abs/χωρίς G.H.	0,000											
$\mu\text{moleG.H.mg}^{-1}$ (χωρίς G.H.)												
Abs/με G.H.												
$\mu\text{moleG.H.mg}^{-1}$ (με G.H.)												

Γίνεται το διάγραμμα των δύο σειρών δειγμάτων στο ίδιο σχήμα ως V_1 ($\mu\text{moles G.H./mg}$ πρωτεΐνης) = $f(t)$ και σχολιάζεται η μορφή των διαγραμμάτων καθώς και η μεταξύ τους σχέση.

3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Barel, I. Bignell, G. Simpson, A. and MacDonald, D. (1988). Isolation of DNA fragment which complements glutamine synthetase deficient strains of *S. pombe*. *Current Genetics*. 13:487-494.
2. Elliot, W.H. (1951). Enzymic synthesis of glutamine. *The Biochemical Journal*. 49:106-112.
3. Elliot, W.H. (1955). Glutamine synthesis. *Methods in Enzymology*. vol. II. § [44], pp. 337-342.
4. Folin, O. and Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 73:627-650.
5. Frieden, C. (1979). Slow transitions and hysteretic behavior in enzymes. *Annual Review of Biochemistry*. 48:471-489.
6. Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U. and Loprieno, N. (1977). *Schizosaccharomyces pombe*. *Handbook of Genetics*. vol. 1. Chap. C. The Fungi. pp. 395-446 (1974, first printing). Ed: R. C. King, Plenum London.
7. Kingdon, H. S., Hubbard, J. S. and Stadtman, E. R. (1968). Regulation of glutamine synthetase. XI. The nature and implications of a lag phase in the *Escherichia coli* glutamine synthetase reaction. *Biochemistry*. 7:2136-2142.
8. Lineweaver, H. and Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*. 56:658-666.
9. Lipmann, F. and Tuttle, I. C. (1945). A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. *The Journal of Biological Chemistry* 159:21-28.
10. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
11. Περυσινάκης Α. (1992). Γενετικός έλεγχος επί του μεταβολισμού του γλουταμινικού οξέος στο ζυμομύκητα *Schizosaccharomyces pombe*. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
12. Perysinakis, A, Kinghorn, J. R. & Drainas C (1995). Glutamine Synthetase/Glutamate Synthase . Ammonium-Assimilating Pathway in *Schizosaccharomyces pombe*.
13. CURRENT MICROBIOLOGY. 30 367-372.
14. Peterson, G. L. (1979). Review of Folin phenol quantitation method of Lowry, Rosenbrough, Farr and Randall *Analytical Biochemistry*. 100: 201-220.
15. Speck, J. F. (1949). The enzymatic synthesis of glutamine, a reaction utilizing adenosine triphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*. 179: 1405-1426.
16. Tyler, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annual Review of Biochemistry*. 47: 1127-1162.
17. Van Andel, J. G. and Brown, C. M. (1977). Ammonia assimilation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972. *Archives of Microbiology*. 111: 265-270.

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



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
Πρόγραμμα για την ανάπτυξη
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.

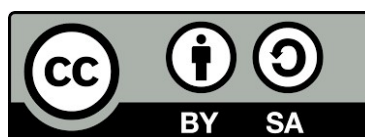
<http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1374>.

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. Συνθετάση της γλουταμίνης
στο ζυμομύκητα *Schizosaccharomyces
pombe*». 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/>.