



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ
ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ

Βιοχημεία - Αρχές Βιοτεχνολογίας

Εργαστηριακές ασκήσεις

Γεώργιος Παπαδόπουλος, Καθηγητής Τμ. Τεχνολόγων Γεωπόνων Τ.Ε.

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.



Χρηματοδότηση

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα. Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο ΤΕΙ Ηπείρου**» 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.

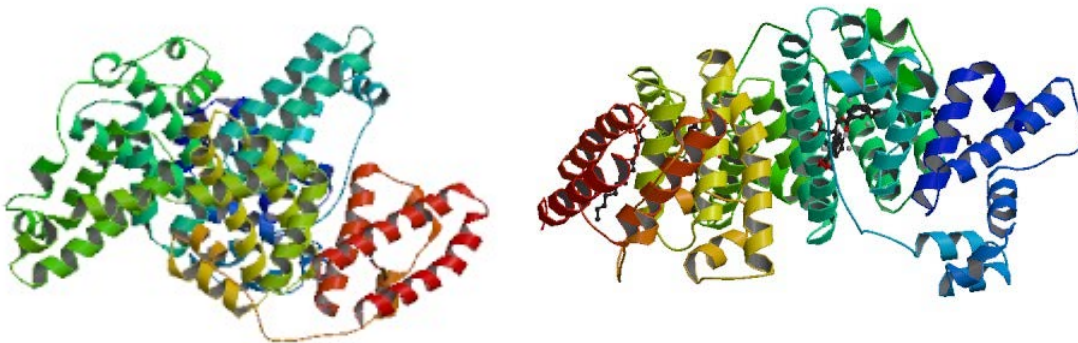


Εργαστήριο 3^ο : Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Βασιλική Καραγιάννη, Παρασκευή Μητλιάγκα, Αγγελική Ζαρλαχά, Γεώργιος Κ. Παπαδόπουλος

Μέχρι στιγμής, είδατε στη διάλεξη και στο εργαστήριο απεικόνισης μορίων και μακρομορίων τι είναι οι *πρωτεΐνες*. Όμως, έχει μεγάλη σημασία να μπορούμε να προσδιορίσουμε τη *συγκέντρωση των πρωτεϊνών*, είτε ως σύνολο είτε τη κάθε μια ξεχωριστά, σε ένα οποιοδήποτε παρασκεύασμα, βιολογικό υγρό, ιστό ή σύνολο κυττάρων. Τόσο σε ένα σύνολο πολλών και διαφορετικών πρωτεϊνών, όσο και όταν έχουμε μια και μόνο πρωτεΐνη (σε διάλυμα) σε καθαρή μορφή.

Οι πρωτεΐνες 50 χρόνια πριν, και παλαιότερα, ονομαζόταν και λευκώματα, μάλιστα η κυριότερη πρωτεΐνη στο πλάσμα αίματος ζώων λέγεται *λευκωματίνη*, επειδή έχει *άσπρο* χρώμα, σε αντίθεση με την κύρια πρωτεΐνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, την *αιμοσφαιρίνη*, που έχει *κόκκινο* χρώμα. Μάλιστα, ακούμε και σήμερα κόσμο να λέει ότι έχει *λεύκωμα στα ούρα*, δηλ. *πρωτεΐνη στα ούρα*, πράγμα που σημαίνει ότι το φίλτρο του αίματος, που είναι οι νεφροί, δεν λειτουργεί τόσο καλά.



A.

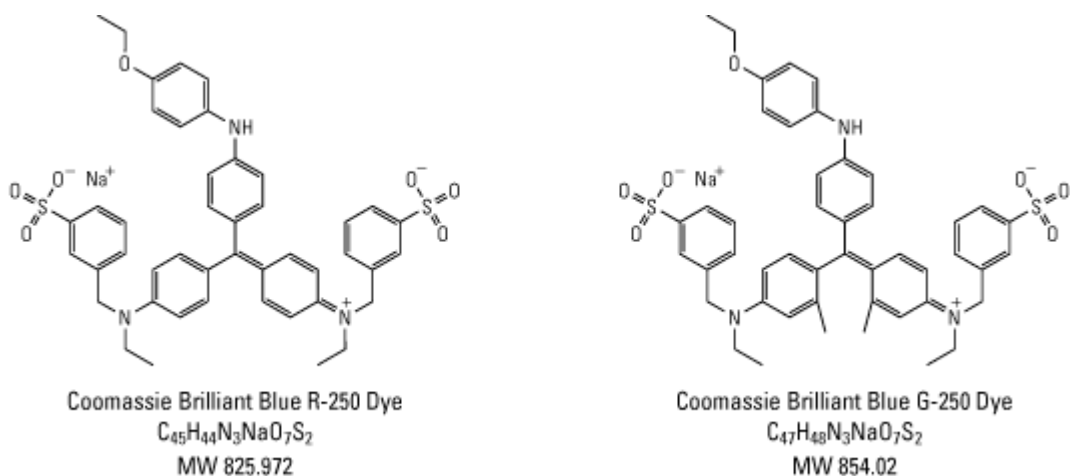
B.

Εικόνα 1. Α. Τριδιάστατη δομή βόειας λευκωματίνης ορού και Β. ανθρώπινης λευκωματίνης ορού. Υπάρχει μία μόνον πολυπεπτιδική αλυσίδα που αποτελείται από 7 δομικές περιοχές (με τρεις α -έλικες η κάθε μια), με διαφορετικό χρώμα για τη κάθε δομική περιοχή: **κόκκινη, πορτοκαλί, λαδί, πράσινη, ανοιχτή πράσινη, πετρόλ, μπλε**. Η βιολογική λειτουργία της λευκωματίνης είναι η ωσμωτική ισορροπία και η μεταφορά λιπαρών οξέων και άλλων σχετικά λιπόφιλων ουσιών μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Στην Β. με λίγη προσπάθεια μπορείτε να διακρίνετε αλυσίδες μυριστικού οξέος (επίμηκες λιπαρό οξύ) και τρι-ιωδοβενζοϊκού οξέος (αρωματικός δακτύλιος), χαρακτηριστιές των ουσιών που μεταφέρονται από τη λευκωματίνη. Από <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=4F5S> , πρόσβαση στις 23-05-14, και

<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1bke>, πρόσβαση στις 26-05-14.

Οι τρόποι μέτρησης των πρωτεϊνών που αναπτύχθηκαν είναι πάρα πολλοί, εμείς θα εστιάσουμε τη προσοχή μας σε έναν που έχει καταστεί πολύ δημοφιλής εξ αιτίας της απλότητάς του. Η μέθοδος ονομάζεται *Μέθοδος Bradford*, από τον επιστήμονα που την επινόησε, και υπάρχει μια εταιρεία η οποία έχει και εμπορικό αντιδραστήριο που επιτρέπει την διεξαγωγή αυτής της μεθόδου.

Η λευκωματίνη του βόειου ορού (bovine serum albumin, BSA) μπορεί να αντιδράσει με μια χρωστική ουσία που ονομάζεται κυανούν του Coomassie (Coomassie Brilliant Blue) και ανήκει στην κατηγορία των όξιων χρωμάτων (Εικόνα 2). Η χρωστική αυτή περιέχει σουλφοομάδα που στην ανιοντική μορφή δεσμεύει τα αμινοξέα αργινίνη, θρυπτοφάνη, τυροσίνη, ιστιδίνη και φαινυλαλανίνη. Κυρίως όμως δεσμεύει αργινίνη οκτώ φορές περισσότερο από τα άλλα αμινοξέα. Έτσι, μια πρωτεΐνη που είναι πλούσια σε αργινίνη θα δεσμευθεί από την χρωστική στην ανιοντική μορφή. Σε αυτή την μορφή η χρωστική έχει χρώμα μπλε και απορροφά στα 595 nm. Όταν η χρωστική βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή έχει καφεκόκκινο χρώμα και απορροφά στα 470 nm.



Εικόνα 2. Δύο ελαφρώς διαφορετικές μορφές της χρωστικής κυανούν του Coomassie, η R-250 (αριστερά) και η G-250 (δεξιά). Όταν σχηματίσουν σύμπλοκο με πρωτεϊνικά μόρια, η πρώτη δίνει ανοιχτό μπλε χρώμα, και η δεύτερη πιο έντονο. Από <http://www.piercenet.com/product/coomassie-brilliant-blue-r-250-g-250>. Πρόσβαση στις 23-05-2014.

Ουσιαστικά όλες οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες αντιδρούν με τη χρωστική κυανούν του Coomassie και σχηματίζουν ένα γαλάζιο σύμπλοκο. Αλλά, η αντίδραση εξαρτάται και από τη περιεκτικότητα της κάθε πρωτεΐνης σε αργινίνη και άλλα αμινοξέα που αντιδρούν με τη χρωστική, καθώς και από την υδροφοβικότητά της. Οπότε, σε μείγμα πολλών πρωτεϊνών, η πρότυπη πρωτεΐνη πρέπει να έχει ιδιότητες αντίδρασης με την χρωστική παρόμοιες με αυτές του συνόλου των άγνωστων πρωτεϊνών στο μείγμα. Ως δύο άκρα μεγάλης υδροφιλικότητας και μεγάλης υδροφοβικότητας μπορούμε να έχουμε την ανοσοσφαιρίνη Γ (κύρια κατηγορία αντισωμάτων στον ορό) και τη λευκωματίνη ορού.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός : Προσδιορισμός την άγνωστης συγκέντρωσης της λευκωματίνης του βόειου ορού (BSA, Bovine Serum Albumin) φασματοφωτομετρικά με την δοκιμή Bradford.

2. Αρχή της μεθόδου : Αντίδραση πρότυπων διαλυμάτων της πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο Bradford της εταιρείας Biorad. Μετριέται η απορροφητικότητα του συμπλόκου των διάφορων παρασκευασμάτων στα 595 nm. Από την απορροφητικότητα των γνωστών διαλυμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη. Από την πρότυπη καμπύλη προσδιορίζεται η συγκέντρωση ενός άγνωστου διαλύματος.

Οι φοιτητές θα ετοιμάσουν τα πρότυπα διαλύματα BSA στα οποία θα προστεθεί το αντιδραστήριο Bradford (της Biorad), θα μετρήσουν την απορροφητικότητα στα 595 nm, θα κατασκευάσουν την πρότυπη καμπύλη (ή καμπύλη αναφοράς) και θα προσδιορίσουν τη συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος.

3. Σκεύη – Όργανα

- α) Φασματοφωτόμετρο
- β) κυψελίδες
- γ) ογκομετρικές φιάλες
- δ) ποτήρια ζέσεως των 100 ml
- ε) σιφώνια μετρήσεως
- στ) δοκιμαστικοί σωλήνες

4. Αντιδραστήρια

- α) BSA
- β) Αντιδραστήριο Bradford (εταιρείας Biorad)

5. Πορεία εργασίας

- α) Παρασκευή διαλύματος BSA 0,1 mg/ml, να παρασκευαστούν 5 ml.
- β) Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων BSA 20, 40, 60, 80, 100, 120 μL σε συνολικό όγκο 1800 μL (σε δοκιμαστικούς σωλήνες)
- γ) Παρασκευή τυφλού διαλύματος (1,8 ml απιοντισμένου νερού)
- δ) Προσθέτουμε 200 μL Biorad στον κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και ανακινούμε.
- ΠΡΟΣΟΧΗ! Το διάλυμα αυτό είναι ισχυρό διαβρωτικό!**
- ε) Μετράμε την απορρόφηση των προτύπων διαλυμάτων στα 595 nm
- στ) Μετράμε την απορρόφηση του αγνώστου

Αφήνοντας να τρέχει άφθονο νερό αδειάζουμε στον νεροχύτη όλα τα διαλύματα και πλένουμε με σαπούνι και νερό βρύσης και μετά απιοντισμένο νερό όλα τα σκεύη και τα αφήνουμε να στεγνώσουν.

- στ) Κατασκευή καμπύλης αναφοράς (απορροφητικότητα συναρτήσει της συγκέντρωσης)
- ζ) Υπολογισμός της άγνωστης συγκέντρωσης σε pg/ml
- η) Υπολογισμός του συντελεστή μοριακής απόσβεσης

6. Ερωτήσεις

1. Αν στο παραπάνω πείραμα η τιμή της μετρούμενης απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων ξεπερνούσε το 1.9, περιγράψτε τι θα κάνατε και δικαιολογείστε την απάντησή σας.
2. Στο παραπάνω πείραμα ποιο είναι το τυφλό διάλυμα ; Δικαιολογείστε την απάντησή σας.
3. Ποιο είναι το κατώτατο όριο συγκέντρωσης που μετρήσατε με τη μέθοδο αυτή; Πώς λέγεται αυτή η ποσότητα;

Παραπομπές

1. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976, 72:248-254.
2. John Clark, Robert Switzer. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ. Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992, 2^η εκτύπωση, 2001.
3. ΙΓ Γεωργιάτσου, Δ. Κυριακίδης, Τ. Γιουσάνης, κ.ά. Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας. Εκδόσεις Ζήτη. Θεσσαλονίκη, 2004.
4. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, 5^η έκδοση, Α τόμος, Παν/κές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2004. Βλέπε και διαδικτυακό τόπο του βιβλίου www.whfreeman.com/Berg7e/.
5. Διαμαντίδη Γρ., ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, 3^η έκδοση, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 2007/2010.
6. Campbell NA, Reece JB. *Βιολογία*, τόμος Ι. 8^η έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2010.