

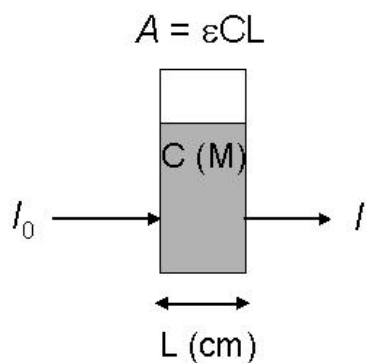
Πείραμα 1: Μέτρηση της ενεργότητας της Φωσφατάσης

Η ενεργότητα της φωσφατάσης μετρείται με μία ενζυμική αντίδραση που μετατρέπει την φωσφορική νιτροφενόλη (pNPP) (υπόστρωμα) σε νιτροφενόλη (pNP) (προϊόν) ελευθερώνοντας φωσφορικά ιόντα. Το προϊόν της αντίδρασης, η p-νιτροφενόλη (pNP) απορροφά φως μήκους κύματος 400 nm, με συντελεστή απορροφητικότητας $\epsilon_{400\text{ nm}} 19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ σε ψηλό pH.

Επειδή όμως το διάλυμα της αντίδρασης με τη φωσφατάση είναι ελαφρά όξινο, για να μπορέσουμε να ποσοτικοποιήσουμε το προϊόν της αντίδρασης, τη pNP, με απορρόφηση, πρέπει πρώτα να κάνουμε το διάλυμα αλκαλικό.

Στο πρώτο πείραμα θα παρακολουθήσετε την εξέλιξη της αντίδρασης παίρνοντας τακτικές μετρήσεις απορρόφησης για κάθε λεπτό για 1 ml ακαθάριστο εκχύλισμα. Για κάθε μέτρηση θα μπορείτε μετά να μετατρέψετε την απορρόφηση σε συγκέντρωση προϊόντος.

Πιο κάτω βλέπετε την κυψελίδα όπου:



A, Απορρόφηση (απόλυτος αριθμός, χωρίς μονάδες)
 ϵ , Συντελεστής απορρόφησης ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

C, συγκέντρωση διαλύτη υπό μελέτη ($\text{M} = \text{mol litre}^{-1}$).

L, μήκος διαδρόμου του φωτός (cm) (η απόσταση που θα ταξιδέψει η δέσμη φωτός μέσα στο διάλυμα σας)

I_0 , Ένταση του φωτός που προσπίπτει. (αριστερά)

I , Ένταση του φωτός που διαπερνά το διάλυμα (δεξιά), Μεταδίδεται. (Είναι πάντα πιο μικρή από την προσπίπτουσα αν υπάρχει απορρόφηση).

Η απορρόφηση φωτός είναι μια φυσικοχημική ιδιότητα ενός διαλύματος που εκφράζει το βαθμό στον οποίο ένας διαλύτης απορροφά φως σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η απορρόφηση είναι πάντα ανάλογη της συγκέντρωσης του διαλύτη (C) και της απόστασης (L) την οποία διανύει το φως στο διάλυμα. Η σταθερά στην εξίσωση είναι ο συντελεστής απορρόφησης ϵ που σχετίζεται με το είδος του διαλύτη δηλαδή τα ειδικά του χαρακτηριστικά. Έτσι η σχέση τυποποιείται ως εξής: $A = \epsilon C L$. Η απορρόφηση A (ABS) είναι απόλυτος αριθμός!!! μετατρέπεται εύκολα σε συγκέντρωση (mol / Litre) αφού το ϵ δίνεται σε μονάδες (M) ή (mol/L) ή (mol.litre^{-1}) επειδή η τιμή της απορρόφησης είναι αριθμός απλός χωρίς μονάδες αφού έχετε την τιμή του ϵ για τη pNP = $19000 \text{ mol. Litre}^{-1}$, όπως και το L που είναι 1 cm.

Θα κάνετε μετρήσεις για δύο διαφορετικές αραιώσεις του εκχυλίσματος - ενζύμου στο πείραμα 1. Θα βρείτε ένα σωλήνα με την ετικέτα "1x enzyme" που θα περιέχει ακαθάριστο εκχύλισμα πατάτας που περιέχει το ένζυμο φωσφατάση. Μετά θα βρείτε ένα σωλήνα 15-ml που περιέχει 3% NaCl. Χρησιμοποιώντας τη μικροπιπέτα $\rho 1000$ να αφαιρέσετε 1 ml από τα 10ml διαλύματος NaCl. Τώρα έχετε 9 ml NaCl. Σε αυτά τα 9 ml να προσθέσετε 1ml από το διάλυμα του ενζύμου με την ετικέτα "1x enzyme". Με αυτό τον τρόπο έχετε δημιουργήσει ένα διάλυμα ενζύμου αραιωμένο 10 φορές δηλαδή "0.1x en-

zyme” (όπως βλέπετε το σήμα x σημαίνει πόσες φορές αραιωμένο ή συγκεντρωμένο είναι το μίγμα του ενζύμου). Να ξανά ονομάσετε – να βάλετε νέα ετικέτα σε αυτό το σωλήνα “0.1x enzyme” που πριν έγραφε 3% NaCl. Μετά θα βρείτε άλλους 6 άδειους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Να τους ονομάσετε όπως αναφέρεται πιο κάτω με την ένδειξη της συγκέντρωσης του ενζύμου και το χρόνο αντίδρασης:

- “0.1x”, 20 min
- “1x”, 20 min
- “0.1x”, 10 min
- “1x”, 10 min
- “0.1x”, 1 min
- “1x”, 1 min

Q.1.1. Να περιγράψετε το χρονοδιάγραμμα του πειράματος έτσι ώστε να μπορέσετε να κάνετε όλες τις αντιδράσεις δείχνοντας με (○) την έναρξη του πειράματος και (●) για τη λήξη του πειράματος, για κάθε αντίδραση στο φύλλο απαντήσεων. Να δώσετε τουλάχιστο 1 λεπτό μεταξύ της εκκίνησης του κάθε πειράματος.

Q.1.2. Να κάνετε τα πειράματα για την ενζυμική αντίδραση όπως περιγράφει το **πρωτόκολλο** μέθοδος πιο κάτω και με βάση το χρονοδιάγραμμα που ετοιμάσατε πιο πάνω, στην ερώτηση Q.1.1. Για κάθε τι καινούριο που κάνετε να αλλάζετε το ρύγχος της πιπέτας για να αποφύγετε την επιμόλυνση. Αμέσως μόλις ετοιμάζετε ένα μίγμα να αναμιγνύετε καλά το σωλήνα κτυπώντας τον ελαφρά με το δάκτυλο σας το κάτω μέρος του. Μην το κουνήσετε πάνω κάτω. Μόλις ολοκληρώσετε τις αντιδράσεις μπορείτε να μετρήσετε την απορρόφηση A_{400} για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα (κάθε αντίδραση). Να καταγράψετε όλες τις μετρήσεις σας στους ανάλογους πίνακες στο Φύλλο Απαντήσεων και μετά να βάλετε τις μετρήσεις σας σε γραφική παράσταση. Προσέξτε όμως! Επειδή για να μηδενίσουμε το σπεκτροφωτόμετρο χρησιμοποιήσαμε μόνο νερό (και όχι τυπικό μάρτυρα) η γραφική παράσταση δε θα περνάει από το μηδέν (0).

Πρωτόκολλο για μέτρηση της ενεργότητας της φωσφατάσης.

1. Να αναμίξετε 0.12 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα του Οξικού Νατρίου 0.5 M (pH 5.6) και 0.24 ml από το υπόστρωμα pNPP 5 mM σε ένα άδειο δοκιμαστικό σωλήνα. Η αντίδραση θα αρχίσει μόλις προσθέσετε 0.24 ml του ενζυμικού διαλύματος (του εκχυλίσματος δηλαδή, αυτό πρέπει να γίνει για όλες τις αραιώσεις που έχετε κάνει και για τους διαφορετικούς χρόνους της αντίδρασης).
2. Μετά την πάροδο του χρόνου αντίδρασης 1, 10 και 20 λεπτά μπορείτε να τερματίσετε την αντίδραση προσθέτοντας 0.6 ml από το διάλυμα NaOH 0.5 M. Το NaOH σταματά την αντίδραση και μετατρέπει το pNP (το προϊόν της αντίδρασης), σε κίτρινο χρώμα που απορροφά φως σε μήκος κύματος 400 nm A_{400nm} .
3. Όταν έχετε τερματίσει όλες τις αντιδράσεις, να μετρήσετε την απορρόφηση ABS στα 400 nm (A_{400}) για όλα τα δείγματα. Προσέξτε. Καλύτερα είναι να πάρετε τις μετρήσεις σας με τη σειρά από την πιο μικρή συγκέντρωση προϊόντος (τα δείγματα για το 0.1 x) στη μεγαλύτερη (τα δείγματα για το 1 x). Επίσης μεταξύ μετρήσεων να στραγγίζετε καλά την κυψελίδα πριν να τη ξαναχρησιμοποιήσετε. Απλά αδειάστε την, τινάζτε την

και στραγγίστε την ανάποδα σε ένα κομμάτι απορροφητικό χαρτί. Μην αγγίξετε μέσα στην κυψελίδα.

Πως θα κάνετε την Ενζυμική Αντίδραση της Φωσφατάσης

0.5 M Οξικό Νάτριο (pH 5.6)	0.12	ml
5 mM pNPP	0.24	ml
Ένζυμο	0.24	ml
0.5 M NaOH	0.6	ml
Συνολικός όγκος	1.2	ml

Q.1.3. Ποια ενζυμική συγκέντρωση δίνει καλύτερη ευθεία γραμμική σχέση χρόνου t και απορρόφησης A_{400} ; Να βρείτε την κλίση της καλύτερης ευθείας που έχετε επιλέξει. (θα τη χρησιμοποιήσετε πιο κάτω).

Q.1.4. Χρησιμοποιώντας την κλίση που υπολογίσατε πιο πάνω στην Q. 1.3, να υπολογίσετε την ενεργότητα του ενζύμου στη μορφή της μεταβολής-Διαφορά (Δ) της απορρόφησης A_{400} ανά λεπτό ανά ml ($\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) για τη διάλυμα του ενζύμου που ήταν «1x enzyme».

Q.1.5. Να μετατρέψετε την Διαφορά –Μεταβολή της Απορρόφησης που πήρατε στη Q.1.4 σε Διαφορά Συγκέντρωσης. Να χρησιμοποιήσετε τη σταθερά ϵ { ϵ_{400} pNP ($19000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)} όπως έχει περιγραφεί νωρίτερα. Η απάντησή σας πρέπει να εκφράζεται σε: Μεταβολή συγκέντρωσης του pNP, ανά λεπτό ανά ml ($\text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$) για το διάλυμα “1x enzyme”.

Q.1.6. Να μετατρέψετε την Διαφορά Συγκέντρωσης που υπολογίσατε στη **Q.1.5** σε Διαφορά-Μεταβολή στον αριθμό των μορίων του pNP. Να χρησιμοποιήσετε τη σταθερά ϵ { ϵ_{400} pNP ($19000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)} όπως έχει περιγραφεί νωρίτερα. Η απάντησή σας πρέπει να εκφράζεται σε: moles, ανά λεπτό ανά ml ($\text{moles min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$) για το διάλυμα “1x enzyme”.

Q.1.7. Να υπολογίσετε τη συνολική ενεργότητα σε ($\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) για τα 4 ml του ΑΡΧΙΚΟΥ διαλύματος “1x enzyme”.

Πείραμα 2: Καθορισμός της συγκέντρωσης της Πρωτεΐνης

Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις μίας γνωστής στάνταρ πρωτεΐνης όπως της αλβουμίνης στο αίμα μοσχαριού (BSA). Στο δεύτερο πείραμα, θα υπολογίσετε τη συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης στο διάλυμα "1x enzyme" σε σχέση με τη συγκέντρωση της στάνταρ πρωτεΐνης BSA, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η απορρόφηση σε $\lambda=595$ nm, της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue αυξάνεται όταν η χρωστική είναι συνδεδεμένη με πρωτεΐνη έτσι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυξάνεται και η απορρόφηση $A_{595\text{ nm}}$

Πέντε διαφορετικά δείγματα BSA σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.4, 0.2, 0.1, and 0.05 mgπρωτεΐνης. ml⁻¹) ετοιμάστηκαν και έτυχαν της ίδιας επεξεργασίας με ένα επιπρόσθετο δείγμα με άγνωστη συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης! Το άγνωστο δείγμα είναι το "0.1x enzyme". Το πείραμα έγινε και πήραμε απορροφήσεις για κάθε δείγμα γνωστής και άγνωστης πρωτεΐνης, όπως φαίνονται στον πιο κάτω πίνακα:

Πίνακας		
Sample /Δείγμα	[BSA] (mg · ml ⁻¹)	Απορρόφηση ηOD ₅₉₅
	0	0.000
	0.05	0.070
	0.1	0.143
	0.2	0.261
	0.4	0.521
'0.1x enzyme' solution / 0.1x (10φορές αραιωμένο διάλυμα από εκχύλισμα, με		0.180

Q.2.1. Να φτιάξετε μία γραφική παράσταση που να απεικονίζει τη γραμμική σχέση απορρόφησης OD₅₉₅ και συγκέντρωσης του BSA. Να βάλετε τα σημεία με όση μεγαλύτερη ακρίβεια, να ονομάσετε τους άξονες και να βάλετε τις ανάλογες μονάδες, η απορρόφηση είναι απλός αριθμός. Να σχεδιάσετε την καλύτερη ευθεία.

Q.2.2. Με βάση την ευθεία που πήρατε στο Q.2.1. να υπολογίσετε τη συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης στο δείγμα "0.1x enzyme" και από αυτό να υπολογίσετε τη συγκέντρωση στο "1x enzyme"

Q.2.3. Τώρα μπορείτε να υπολογίσετε την ειδική ενεργότητα του ενζύμου (ενεργότητα ανά λεπτό ανά mg συνολικής πρωτεΐνης, για το δείγμα "1x enzyme").